

***KERATİNOLİTİK *Bacillus* sp. SUŞLARININ İZOLASYONU, KERATİNAZ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

Isolation of Keratinolytic *Bacillus* sp. Strains, Keratinase Production and Characterization

Sina AKAN
Biyoloji Anabilim Dalı

Hatice GÜVENMEZ
Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, tavuk üretim çiftliği toprağından 21 proteolitik *Bacillus* suşu izole edilmiş, bunlardan 8 tanesi keratin-azüre substratı ile keratinolitik aktivite göstermiştir. HSK-21 nolu suş en iyi keratinaz üreticisi olarak seçilmiş ve VITEK-2 bakteri tanılama sistemi ile *Bacillus* sp. olarak tanılanmıştır. Keratinaz üretimi için temel tüylü besiyeri kullanılmış ve maksimum enzim aktivitesi pH=8.0'de, de gözlenmiştir. Enzim pH 5.0-13.0 ve 20-60°C aralıklarında aktivite göstermiş ancak optimum aktivite pH=12.0 ve 40°C'de saptanmıştır. Enzim farklı tamponlarla (pH=7.0-13.0) 30 dk muamele edildiğinde ortalama %50-100 oranında aktifliğini korumuş ve pH 11.0 ve 12.0'de aktivite %100 korunmuştur. Enzim 20-100°C'lerde 30 dk inkübe edildiğinde 20-60°C'lerde yaklaşık %34-86 oranında kalan aktivite saptanmış ve 30°C'de aktivite %100 korunmuştur.

Sonuç olarak; *Bacillus* sp. HSK-21 nolu izolattan üretilen keratinaz; keratinoliz gerektiren biyoteknolojik uygulamalarda mezofil ve yüksek alkali koşullar için uygundur ve şimdiye kadar literatürlerde bildirilen bakteriyel keratinazlardan daha yüksek pH'da aktif bir enzimdir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus* sp. HSK-21, alkali keratinaz, dehairing

ABSTRACT

In this study, 21 proteolytic *Bacillus* strains were isolated from poultry soil. 8 strains of these bacteria were showed keratinolytic activity when keratine azure used as substrat. HSK-21 strain was chosen the best keratinase producer and identified as *Bacillus* sp. via VITEK-2 bacteria identification system. The basal feather medium was used for keratinase production and maximum enzyme activity measured at pH=8.0 and 30°C. The enzyme was active at pH 5.0-13.0 and at 20-60°C, though optimum activity was obtained at pH=12.0 and 40°C. When the enzyme tested at different buffers (pH 7.0-13.0) for 30 sec., 50-100% activity remained and the activity (100%) was stable at pH=11.0 and pH=12.0. When the enzyme incubated at 20-100°C for 30 sec., 34-86% activity retained at 20-60°C, while 100% activity was seen at 30°C.

The results showed that, the keratinase from *Bacillus* sp. HSK-21 is useful for mesophilic and highly alkaline conditions in biotechnological applications requiring in keratinolysis and the enzyme was the only bacterial keratinases working high pH conditions documented in the literatures so far.

* Yüksek Lisans Tezi MSc. Thesis

Key Words: *Bacillus* sp. HSK-21, keratinase, dehairing

Giriş

Proteazlar, protein hidrolizini katalizleyen katabolik enzimlerdir. Proteazlar, endüstriyel enzimlerin en önemli gruplarından biridir. Keratinolitik proteazlar, büyük ticari öneme sahip, spesifik proteazlardır (Paul ve ark, 2007).

Keratinolitik enzimler, fungi, actinomycetesler ve bakteriler tarafından üretilmektedir. *Bacillus* spp. önde gelen keratinaz üreticilerindendir (Brandelli, 2010).

Materyal ve Metod

Materyal

Bu araştırmada Çukurova Üniversitesi tavuk işletme çiftliğinden izole edilen *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar kullanılmıştır. Mikroorganizmanın izolasyonu, tanımlanması, enzim üretici suşun saptanması, enzimin karakterizasyonu amacıyla besiyerleri, çeşitli tamponlar, kimyasallar, VITEK-2 (bioMerieux) bakteri identifikasyon sistemi, shaker, santrifüj, parçalayıcı (Grindomix, RETSCH-GM200), spektrofotometre (Cecil 5500) ve temel laboratuvar ekipmanları kullanılmıştır.

Metot

Bakteri İzolasyonu

Bakteri izolasyonu Anonymous (1978) ve Lateef ve ark (2010)'dan alınan metotla yapılmıştır.

Bakterilerin Tanımlanması

21 suş keratinolitik aktivite tayini için keratin azure ile test edilmiş ve bunlardan 8 suş keratinolitik aktivite göstermiş ve en yüksek keratinolitik aktivite gösteren 3 suş VITEK-2 (bioMerieux) bakteri tanımlama sistemi ile tanımlanmıştır.

Keratinaz Enziminin Üretilmesi

Riffel ve ark (2003)'den alınan metot ile gerçekleştirilmiştir

Enzimin Etanol (Et-OH) İle Çöktürülmesi

Hoq ve ark (2005) ve Esawy (2007)'den alınan metot ile gerçekleştirilmiştir.

Keratinolitik Aktivitenin Belirlenmesi

Keratinaz aktivitesi Esawy (2007); Suntornsuk ve Suntornsuk (2003) tarafından Letourneau ve ark (1998)'den modifiye edilmiş metot ile belirlenmiştir.

Keratinaz Üretiminde En Uygun Besiyeri pH'sının Saptanması

Temel tüylü besiyeri 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 pH'larda hazırlanmıştır. Kim ve ark (2001)'den alınan metot ile belirlenmiştir.

Keratinaz Üretiminde Uygun İnkübasyon Sıcaklığının Belirlenmesi

Temel tüylü besiyerine inoküle edilmiş HSK-21 nolu izolat 20, 30, 40, 50 ve 60°C sıcaklıklarda üretilmiştir. Üretilen ve kısmi saflaştırılan enzimin keratinolitik

aktivitesi standart yöntemle saptanarak en yüksek aktivitenin görüldüğü sıcaklık belirlenmiştir (Kim ve ark, 2001; Esawy, 2007).

Keratinaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

pH 5.0-13.0 arasındaki aktiviteyi saptamak amacıyla Temizkan ve Arda (2008)'dan alınan 5 farklı tampon kullanılmıştır. Letourneau ve ark (1998); Gradisar ve ark (2000); Balaji ve ark (2008); Lateef ve ark (2010)'dan alınan metod ile belirlenmiştir.

Sıcaklığın Keratinaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Enzim 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C'lerde 30 dakika bekletildikten sonra, standart yöntemle keratinolitik aktivite ölçülmüştür. Enzimin orijinal aktivitesini saptamak amacıyla ön inkübasyona tabii tutulmamış enzim ve substrat karıştırılmış ve optimum sıcaklıkta (40°C) aktivite tayini yapılmıştır. En yüksek değer 100 alınarak, elde edilen sonuçlara göre enzimin kalan aktivitesi saptanmıştır (Letourneau ve ark, 1998; Esawy, 2007)

Sıcaklığın Enzim Kararlılığına Etkisi

Enzim aktivitesi 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100°C sıcaklıklarda (keratinaz için verilen standart yöntemle) test edilmiş ve keratinaz aktivitesinin en yüksek olduğu değer saptanmıştır (Bockle ve ark, 1995; Letourneau ve ark, 1998; Gradisar ve ark, 2000; Balaji ve ark, 2008; Lateef ve ark, 2010).

pH'nın Enzim Kararlılığına Etkisi

Enzim örneği farklı pH'lardaki tamponlar ile karıştırılarak (pH; 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0, 13.0) 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Keratinolitik aktivite tayini standart yöntemle göre yapılmış, orijinal aktivite için kontrol hazırlanmış ve spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. En yüksek değer 100 kabul edilerek kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır (Esawy, 2007).

Araştırma Bulguları

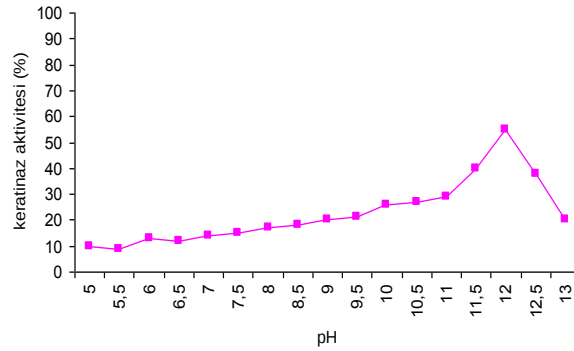
Çukurova Üniversitesi tavuk üretme çiftliği, hayvanların yaşam alanından alınan toprak örneklerinden (ısısal ön işlemden sonra), jeloz besiyerine ekim yapılmıştır. İnkübasyonu takiben tek koloni şeklinde üreyen suşların ön tanımlanması; koloni morfolojileri sonuçlarına göre yapılmıştır. *Bacillus* olduğu saptanan 116 adet bakteri suşunun eğik katı jelozda stok kültürü yapılmıştır.

Keratin azure substrat olarak kullanılarak, keratinolitik aktivite gösteren organizmalar saptanmış ve en yüksek keratinaz aktivitesi gösteren 3 izolat (GS-1, 9-1 ve 21-1) VITEK-2 tanımlama sistemi prosedürü doğrultusunda tanımlanmıştır. Bu izolatlar içerisinde en yüksek keratinolitik aktivite gösteren 21-1 nolu izolat **HSK-21** olarak isimlendirilmiş ve bu çalışma için enzim üreticisi olarak kullanılmıştır. HSK-21 nolu izolatın *Bacillus* genusuna ait olduğu VITEK-2 ile doğrulanmıştır (%99).

Bacillus sp. HSK-21 nolu suştan maksimum keratinaz üretebilmek için besiyeri pH'sı ve üretim sıcaklığı belirlenmiştir.

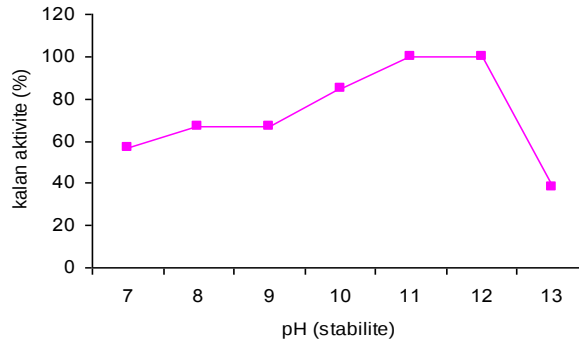
pH 4.0-9.0 aralığında temel tüylü besiyeri hazırlanmış ve 20-60°C'lerde inkubasyon yapılmıştır. En yüksek enzim üretimi başlangıç pH'sı **8.0** olan

besiyerinde ve **30°C**'lik inkübasyon sıcaklığında gözlenmiştir. Mikroorganizmaların özellikle *Bacillus*'ların fizyolojik sınırları çok geniş olduğundan pek çok araştırmacı benzer ve farklı sonuçlar elde etmişler ve bunları literatürlerde bildirmişlerdir. *Bacillus* sp. HSK-21 suşundan üretilen keratinaz pH **5.0-13.0** aralığında keratinolitik aktivite göstermiş ancak en yüksek aktivite **pH=12.0'de** saptanmıştır. Bu sonuçlar söz konusu enzimin yüksek pH koşullarında başarıyla kullanılabileceğini göstermektedir



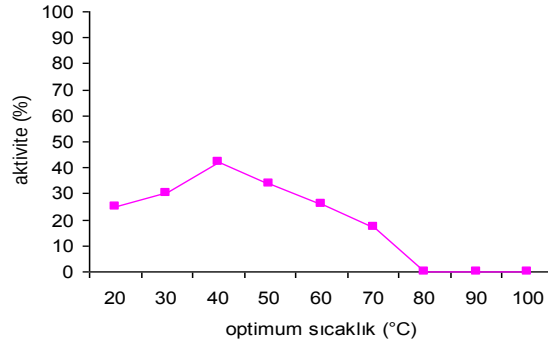
Şekil 1. pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzim pH 7.0-12.0 aralığında aktivitesini %50-100 oranında korumuş, pH 13'te aktivitesini hızlıca kaybetmiştir (%38 kalan aktivite). pH 11.0 ve 12.0'de, 30 dakikada aktivite %100 korunurken, pH 7.0'de %57, pH=10.0'da %85 kalan aktivite saptanmıştır .



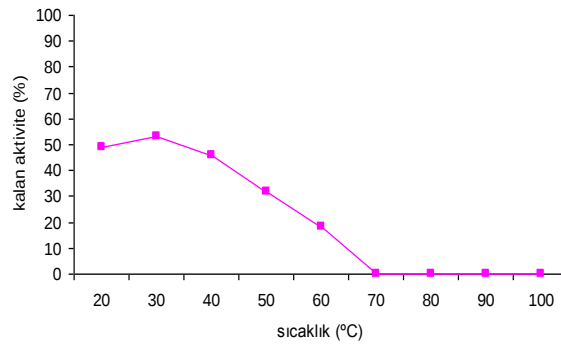
Şekil 2. pH'nın enzim kararlılığına etkisi

Bacillus sp. HSK-21 nolu suştan üretilen keratinaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi amacıyla, 20-100°C'de keratinolitik aktivite test edilmiş ve enzimin optimum aktiviteyi 40°C'de gösterdiği saptanmıştır.



Şekil 3. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzim 20-100°C arasındaki sıcaklıklarda, 30 dakika muamele edilmiş ve keratinaz aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Enzim 60°C'ye kadar aktivitesini korumuş fakat 70-100°C arasında aktivitesini tamamen kaybetmiştir. 30°C'de en yüksek (%100), 60°C'de en düşük (%34) aktivite saptanmıştır. 20, 30, 40°C'lerdeki uygulamalarda kullanılabilir özelliktedir. Optimum aktivite sıcaklığı olan 40°C'de 30 dakikalık inkübasyondan sonra %86 kalan aktivite göstermesi enzimin sıcaklık kararlılığının artırılarak çeşitli termofil uygulamalarda da kullanılabilirliğini göstermektedir.



Şekil 4. Sıcaklığın enzim kararlılığına etkisi

Tartışma ve Sonuçlar

Keratinazlar (E.C.3.4.4.25), çözünmeyen proteinler grubunda olan keratinleri parçalama yeteneğinde çok değerli proteolitik enzimlerdir. Hem keratinöz substratlar hemde çözünmez diğer protein substratlar üzerindeki hidroliz etkilerinden dolayı araştırmacıların özel ilgi alanına girmiştir (Raju ve ark, 2007). Keratinazlar, biyokimyasal ve biyofiziksel özellikleri yönünden geniş bir çeşitlilik göstermektedir. Çoğu keratinaz nötral pH'dan alkali pH'ya kadar ve 40°C'den 60°C'ye kadar geniş aralıklarda aktivite göstermekte ve bu koşullara uygun biyoteknolojik proseslerde kullanılmaktadır. Mikrobiyal keratinolizlerin genellikle alkalifilik ve termofilik şartlarda daha iyi gerçekleştiği bildirilmektedir. Keratinolitik mikroorganizmalar ve onların ürettiği keratinazların biyokimyasal özellikleri hakkındaki araştırmaların ve sonuç olarak bilgilerin artışı keratin içerikli atıkların biyolojik yıkımını ve mekanizmasını daha iyi anlamayı sağlamıştır. Bu yöndeki bilgi akışı keratince zengin tarımsal yan ürünlerin geri dönüşümünü yönlendirmek için yeni teknolojilerin gelişmesini kolaylaştırmaktadır. Protein sekans analizlerine göre keratinazların bazıları, serin proteazların subtilin ailesine dahil edilmiştir. Keratinolitik enzimler, ziraatsal, farmasötik ve biyokimyasal alanlarda en uygun katalizörler olarak ümit verici enzimlerdir (Brandelli ve ark, 2010).

Streptomyces pactum DSM 40530'dan keratinolitik serin proteinaz olan keratinaz enzimi üretilmiştir. Enzim, pH 7.0 ile 10.0 aralığında ve 40-70°C sıcaklıklarda aktivite göstermektedir. *S. Pactum*'dan üretilen proteinaz, mevcut olan çeşitli ticari proteinazlardan daha aktiftir (Bockle ve ark, 1995). *Streptomyces pactum* DSM 40530'dan üretilen keratinaz en yüksek keratinolitik aktivite göstermiştir.

Korkmaz ve ark (2004), *Bacillus licheniformis* HK-1 suşunun 50°C'de ve pH=8.0'de üretildiğinde maksimum keratinaz ürettiğini bildirmişlerdir.

Bu araştırmada doğal toprak örneğinden yeni izole edilen ve VITEK-2 bakteri tanılama sistemi ile *Bacillus* sp. (HSK-21 nolu izolat) olarak tanılanan suş **keratinaz** üreticisi olarak kullanılmıştır. Söz konusu suş, 30°C'de ve pH=8.0'de temel tüylü besi yerinde üretildiğinde maksimum enzim üretimi gözlenmiştir. Enzim 40°C'de ve pH=12.0'de optimum keratinolitik aktivite göstermiştir. pH ve sıcaklık stabiliteleri test edilmiş ve enzimin geniş pH aralığında aktivitesini sürdürdüğü ancak 11.0 ve 12.0'de aktivitesinde (%100) 30 dakikalık inkübasyonda hiç bir kayıp olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca enzim mezofil bir özellik göstermiş (optimum 40°C) 60°C'ye kadar (%34) aktifliğini sürdürmüş, fakat 20°C (%92), 30°C (%100) ve 40°C'lerde (%86) 30 dakikalık inkübasyonlarda önemli bir aktivite kaybı görülmemiştir.

Korkmaz ve ark (2003), toprak örneğinden *Streptomyces* sp. BA₇ suşunu izole ederek, keratin azure ile keratinolitik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Mohamedin (1999), *S. thermonitrificans* in doğal tavuk tüyü ihtiva eden besiyerinde en iyi enzim üretim sıcaklığını 50°C'de,

Kim ve ark (2001), keratinaz üretiminde optimum şartları *Bacillus subtilis* için 40°C, pH=5.0-9.0, *Bacillus pumilis* için 40°C, pH=5.0-6.0 ve *Bacillus cereus* için 30°C, pH=7.0 olarak saptamışlardır.

Korkmaz ve ark (2004), *Bacillus licheniformis* HK-1 suşunda maksimum enzim üretimini 50°C de ve pH=8.0'de gözlemlemişlerdir.

Lee ve ark (2004), *Paracoccus* sp. WJ-98 suşunda maksimum enzim üretimini 37°C'de pH=7.5'da gözlemlemişlerdir

Günümüzde *Bacillus*'lardan yüksek pH'larda aktivite gösteren pek çok keratinaz üretilmiş ve bunların biyoteknolojik ve endüstriyel kullanım alanları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada doğal bir suş olarak yeni izole edilmiş HSK-21 nolu izolatin ürettiği enzim literatürlerde belirtilenlerin dışında oldukça yüksek alkali özellik göstermiştir. Bu yüzden yüksek alkali özellik gösteren keratinaz (**highly alkaline keratinase**) olarak tanımlanmıştır.

Lee ve ark (2002), *Bacillus* sp. için optimum pH'nın 7.0, Correa ve ark (2010), *Bacillus* sp. P7 suşundan elde ettikleri keratinazın optimum pH'ını 9.0 olarak saptamışlardır.

Birçok araştırmacı keratinaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH aralıklarını ve değişik pH'lardaki enzim kararlılığını çalışmıştır. Lee ve ark (2004), *Paracoccus* sp. WJ-98 suşundan ürettikleri enzimin pH=6.0-8.0'de stabilitesini %80 koruduğunu bildirmişlerdir. Cheng ve ark (1995), *Bacillus licheniformis* PWD-1 suşundan ürettikleri enzimin pH 5.0-12.0 arasında stabil olduğunu ve 30°C'de 1 saat sonra aktivitesini %80'den daha fazla koruduğunu saptamışlardır.

Balaji ve ark (2008), *Bacillus subtilis* MTCC (9102)'den elde ettikleri keratinazın aktivitesini 70°C'ye kadar koruduğunu bildirmişlerdir. Lee ve ark (2004), *Paracoccus* sp. WJ-98 suşundan ürettikleri enzimin 50°C'ye kadar stabil olduğunu bildirmişlerdir. Cheng ve ark (1995), *Bacillus licheniformis* PWD-1 suşundan üretilen keratinazın 40°C'ye kadar stabil olduğunu ve 65°C'nin üstünde aktivitesini tamamen kaybettiğini saptamışlardır.

Ayrıca taranan literatürlerde bildirilen bakteriyel orjinli keratinazlar için en yüksek **pH'da (12.0) aktivite göstermesi** açısından yeni bir enzim olma özelliği taşımaktadır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçların detaylandırılması bir sonraki adım için gereklidir. Şöyleki; enzim bir proteaz olduğu için farklı protein substratları hidroliz yeteneği, enzimin protein sekans analizi, IP'sinin saptanması, çeşitli saflaştırma metodları ile saflaştırılarak spesifik aktivitedeki artış, farklı materyallere immobilize edilerek enzimin aynı veya farklı proseslerde daha etkin ve uzun süreli kullanılabilirliği, keratin içerikli materyallerin hidrolizi sonucu elde edilen ürünlerin tanımlanması gibi konuların çalışılması önerilebilir. Ayrıca, kozmetik (tüy dökücü) ve medikal kullanımlarının araştırılması bu konudaki eksiklikleri tamamlayacaktır.

KAYNAKLAR

- ANONYMOUS, 1978. Microbiyologisches Handbuch, E. Merck, Darmstad.
- BALAJI, S., KUMAR, M. S., KARTHIKEYAN, R., KUMAR, R., KIRUBANANDAN, S., SRIDHAR, R., SEHGAL, P. K., 2008. Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). World J. Microbiol. Biotechnol., 24: 2741-2745.

- BOCKLE, B., GALUNSKY, B., and MULLER, R., 1995. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10): 3705-3710.
- BRANDELLI, A., DAROIT, D. J., RIFFEL, A., 2010. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85: 1735-1750.
- CHENG, S-W., HU, H-M., SHEN, S-W., TAKAGI, H., ASANO, M., and TSAI, Y-C., 1995. Production and characterization of keratinase of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59(12): 2239- 2243.
- CORREA, A. P. F., DAROIT, D. J., BRANDELLI, A., 2010. Characterization of a keratinase produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from an Amazonian environment. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64: 1-6.
- ESAWY, M. A., 2007. Isolation and Partial Characterization of extracellular keratinase from a novel mesophilic *Streptomyces albus* AZA. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3(6): 808-817.
- GRADISAR, H., KERN, S., FRIEDRICH, J., 2000. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53:196-200.
- HOQ, MD. M., SIDDIQUEE, K. A. Z., KAWASAKI, H., and SEKI, T., 2005. Keratinolytic activity of some newly isolated *Bacillus* species. *Journal of Biological Sciences*, 5(2): 193-200.
- KIM, J. M., LIM, W. J., and SUH, H. J., 2001. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochemistry*, 37: 287-291.
- KORKMAZ, H., UNALDI, M. N., ASLAN, B., CORAL, G., ARIKAN, B., DINCER, S., COLAK, O., 2003. Keratinolytic Activity of *Streptomyces* strain BA7, a new isolate from Turkey. *Annals of Microbiology*, 53: 85-93.
- KORKMAZ, H., HUR, H., DINCER, S., 2004. Characterization of alkaline keratinase of *Bacillus licheniformis* strain HK-1 from poultry waste. *Annals of Microbiology*, 54(2): 201-211.
- LATEEF, A., OLOKE, J. K., KANA, E. B. G., SOBOWALE, B. O., AJAO, S. O., BELLO, B. Y., 2010. Keratinolytic activities of a new feather-degrading isolate of *Bacillus cereus* LAU 08 isolated from Nigerian soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64: 162-165.
- LEE, H., SUH, D. B., HWANG, J. H., and SUH, H. J., 2002. Characterization of a Keratinolytic Metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 97: 123-133.
- LEE, Y. J., KIM, J. H., KIM, H. K., and LEE, J. S., 2004. Production of characterization of keratinase from *Paracoccus* sp. WJ-98. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9: 17-22.
- LETOURNEAU, F., SOUSSOTTE, V., BRESSOLIER, P., BRANLAND, P., and VERNEUIL, B., 1998. Keratinolytic activity of *Sterptomyces* sp. S.K1-02: a new isolated strain. *Letters in Applied Microbiology*, 26 (1): 77-80.
- 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 (1-2): 13-21.
- PAUL, D., RAHMAN, A., ILIAS, M., and HOQ, M. M., 2007. Production and characterization of keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* MZK-03 grown on feather mill. Bangladesh J. Microbiol, 24: 57-61.
- RAJU, K. C., NEOGI, U., SAUMYA, R., and GOUD, N. R., 2007. Studies on extra cellular enzyme keratinase dermatophyte *Microsporum gypseum*. International Journal of Biological Chemistry, 1(3): 174-178.
- RIFFEL, A., LUCAS, F., HEEB, P., BRANDELLI, A., 2003. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. Arch. Microbiol., 179 (8): 258-265.
- SUNTORNUSUK, W., and SUNTORNUSUK, L., 2003. Feather Degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in Submerged Cultivation. Bioresource Technology, 86 (3): 239-243.
- TEMİZKAN, G., ve ARDA, N., 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, 3. Baskı. İstanbul.