

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS SP.*
SUŞLARINDAN FİTAZ ENZİMİNİN KİSMİ
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Dilara AKÇAKOCA



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS SP.* SUŞLARINDAN FİTAZ
ENZİMİNİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Dilara AKÇAKOCA

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA -2014

TEZ ONAYI

Dilara AKÇAKOCA tarafından hazırlanan “Topraktan izole edilen *Bacillus sp.* suşlarından fitaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Başkan: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
Uludağ Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Sibel TAŞ
Uludağ Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Yrd. Doç. Dr. Figen ERSOY
Uludağ Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü

.../.../...

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı **beyan ederim.**

17/09/2014

Dilara AKÇAKOCA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN *Bacillus* sp. SUŞLARINDAN FİTAZ ENZİMİNİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Dilara AKÇAKOCA

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Bu çalışmada Türkiye' nin 30 farklı ilinden temin edilen toprak örneklerinden 300 adet bakteri izole edilmiştir. Bakterilerin morfolojik ve fizyolojik özellikleri incelenmiş ve 236 bakteri *Bacillus* cinsi olarak tanımlanmıştır. Bütün suşların fitaz aktiviteleri fitaz tarama ortamı (PSM) kullanılarak tespit edilmiş ve açık zonların çapı mm olarak gösterilmiştir. Toplam 19 *Bacillus* sp. suşu ekstraselüler fitaz üreticisi olarak bulunmuştur. Bu suşlar arasında, en geniş zona sahip *Bacillus* sp.'nin 2 suşu seçilmiştir. Bunlar *Bacillus* sp. EBD 9-1 (zon çapı:11 mm) ve EBD 19-9 (zon çapı:9 mm) olarak isimlendirilmiştir. Bakteriler sıvı ortam içinde enzim üretim kapasitesi için test edilmiştir. En yüksek fitaz aktivitesini (600 U/mL) *Bacillus* sp. EBD 9-1 suşu göstermiştir. *Bacillus* sp. EBD 9-1 'den elde edilen fitaz kısmen saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Amonyum sülfat çökeltmesi (%70), diyalizasyon ve ultrafiltrasyon saflaştırma aşamasından sonra, enzim 2.06 kez saflaştırılmıştır. Saf enzim üzerine sıcaklık ve stabilitesinin, pH ve stabilitesinin, farklı potansiyel bileşiklerin etkileri araştırılmıştır. Enzimin K_m ve V_{max} değerleri saptanmış, moleküler ağırlığı belirlenerek enzim karakterize edilmiştir. Saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık 60°C olarak bulunmuştur. 60°C'de ham enzim aktivitesi ile karşılaştırıldığında saflaştırılmış enzim % 20 oranında artmıştır. Termostabilite çalışmaları saf enzimin 60°C'de 50 dakika boyunca % 69 oranında muhafaza edildiğini göstermiştir, bu nedenle termostabil enzim olabilir. Optimum pH değeri 7.0 olarak belirlenmiştir. Saf enzimin aktivitesi asidik tarafa göre alkalın tarafa daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Diğer yandan, fitaz aktivitesi bazı farklı potansiyel bileşikler tarafından etkilenmektedir. Bu çalışmada, 1 mM konsantrasyondaki potansiyel bileşiklerin 5 mM'den daha etkili olduğu saptanmıştır. Ca^{++} and Mg^{++} gibi metal iyonlarının saf enzim aktivitesi üzerinde stimulator rol oynadığı belirlenmiştir. Fakat SDS daha güçlü bir inhibitör etki göstermiştir. Saflaştırılmış enzim için V_{max} ve K_m kinetik değerleri sırasıyla 333 U / ml ve 2 mM olarak bulunmuştur. Enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık 45 kDa belirlenmiştir. Burada, yeni fitaz enziminin geniş bir endüstriyel uygulamaya sahip olabileceği ve hayvan yemi katkı maddesi olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fitaz, *Bacillus*, kısmi saflaştırma, karakterizasyon

2014, xii + 81 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PHYTASE ENZYME FROM *Bacillus* sp. STRAINS ISOLATED FROM SOIL

Dilara Akçakoca

Uludağ University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

In this study, 300 bacteria were isolated from soil samples are provided from 30 different cities of Turkey. Morphological and physiological features of bacteria were investigated, and 236 bacteria were defined as *Bacillus* genus. The phytase activities of all strains were assayed using phytase screening medium (PSM), and exhibited as diameter of clear zone in mm. Total 19 *Bacillus* sp. strains were found as extracellular phytase producer. Among of these strains, two strains of *Bacillus* sp. that had the largest zones were selected. They were named as *Bacillus* sp. EBD 9-1 (zone diameter:11 mm) and EBD 19-9 (zone diameter:9 mm). Bacteria were tested for enzyme production capacity in the liquid medium *Bacillus* sp. EBD 9-1 strain showed the highest phytase activity (600 U/mL). The phytase obtained from *Bacillus* sp. EBD 9-1 was partial purified and characterized. After the purification steps of ammonium sulphate precipitation (70%), dialization and ultrafiltration, the enzyme was purified 2.06 fold. The effects of temperature and stability, pH and stability, different potential compounds on partial pure enzyme were investigated. K_m and V_{max} values of the enzyme were calculated, molecular weight was determined and, enzyme was characterized. The optimum temperature of purified enzyme was found as 60°C. The purified enzyme activity compared with crude enzyme activity at 60°C was increased by 20%. Thermostability studies showed that pure enzyme was retained as 69% for 50 min at 60°C, therefore it might be a thermostable enzyme.

The optimum pH was determined as 7.0 It was observed that the activity of pure enzyme is higher at the alkaline side than the acidic side. On the other hand, the phytase activity is influenced by several different potential compounds. In this study, 1 mM concentrations of potential compounds was found to be more effective than 5 mM. Metal ions such as Ca^{++} and Mg^{++} were stimulated on the purified enzyme activity. But, SDS showed stronger inhibitory effect. Kinetic values of V_{max} and K_m for the purified enzyme were 333 U/mL and 2 mM, respectively. The molecular weight of enzyme was determined about 45 kDa. Here, we reported that novel phytase enzyme may have wide industrial application, and can be as an animal feed additive.

Anahtar Kelimeler: Phytase, *Bacillus*, isolation, partial purification, characterization

2014, xii + 81 pages.

TEŞEKKÜR

Lisans dönemimden bu yana bana bilgi ve birikimini daima sunan, yönlendirici fikirleri ile daima yol gösteren, sabrı ve anlayıŐıyla bana her zaman örnek olup yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Elif DEMİRKAN' a,

HDP(F) – 2013/29 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi BaŐkanlıđı'na,

Akademik çalıŐmalarımda ve yaŐantımda her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Alev USTA ve Eren BAYGIN'a,

Maddi ve manevi destekleri ile bugüne kadar hep yanımda olan ve varlıklarıyla bana g veren baŐta sevgili annem Meral AKÇAKOCA ve sevgili babam Fahri AKÇAKOCA olmak üzere tüm aileme en içten dileklerle teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Dilara AKÇAKOCA

17/09/2014

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	6
2.1. Fitik Asit (Myo-İnositol Hexaphosphate, Tuz Formu Fitat) Tarihçesi, Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	6
2.2. Fitaz Enzimi (Myo-inositol-hegzafosfat fosfohidrolaz; EC 3.1.3.8).....	9
2.3. Fitaz Enziminin Kaynakları.....	13
2.3.1. Bitkisel Fitazlar	13
2.3.2. Hayvansal Fitazlar	14
2.3.3. Mikrobiyal Fitazlar	14
2.4. Fitazların Kullanım Alanları.....	17
2.4.1. Yem Katkı Maddesi Olarak	17
2.4.2. Gıda Sanayi.....	17
2.4.3. Kağıt Endüstrisi.....	18
2.4.4. Toprak İyileştirme	19
2.4.5. Biyoteknoloji	19
2.5. <i>Bacillus</i> Hakkında Genel Bilgiler	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Fitaz Pozitif Bakterilerin İzolasyonu.....	22
3.2.2. <i>Bacillus</i> ' un Taksonomik Sınıflandırılması İçin Morfolojik ve Fizyolojik Özelliklerin Belirlenmesi.....	23
3.2.2.1. Hareketlilik Testi.....	24
3.2.2.2. Katalaz Testi	24

3.2.2.3. Gram Boyama	24
3.2.2.4. Spor Boyama.....	25
3.2.3. Bakteri Üretiminde Kullanılan Besiyerleri.....	25
3.2.4. Enzim Üretimi İçin Kullanılan Besiyeri.....	26
3.2.5. Bakteri Üretim Koşulları	26
3.2.6. Bakteri Üremesinin Ölçülmesi.....	27
3.2.7. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....	27
3.2.8. İnorganik Fosfat Standart Grafiği ve Hazırlanışı.....	29
3.2.9. Enzim Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Solusyonlar	29
3.3. Fitazın Kısmi Saflaştırılması	30
3.3.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	30
3.3.2. Diyaliz.....	31
3.3.3. Ultrafiltrasyon İle Diyalizatın Konsantre Edilmesi.....	31
3.4. Protein Miktarının Belirlenmesi	31
3.5. Enzimin Karakterize Edilmesi.....	33
3.5.1. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	33
3.5.2. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	33
3.5.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Potansiyel Bileşiklerin Etkisi	33
3.5.4. Kinetik Parametrelerin Saptanması.....	33
3.6. Enzimin Moleküler Ağırlığının Tespiti.....	33
3.6.1. Çözeltilerin ve Jelin Hazırlanması	33
3.6.2. Örneklerin Hazırlanması ve Elektroforez Koşulları	36
3.6.3. Boyama ve Boyanın Uzaklaştırılması.....	36
4. BULGULAR	37
4.1. Fitaz Pozitif Bakterilerin Belirlenmesi.....	37
4.2. Biyokimyasal ve Morfolojik Testler	39
4.2.1. Biyokimyasal Testler.....	39
4.2.2. Morfolojik Testler	40
4.3. Maksimum Fitaz Üretim Ortamının Belirlenmesi	44
4.4. İnorganik Fosfat Standart Grafiği ve Hazırlanışı.....	45
4.5. Fitaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması	46
4.6. Fitaz Enziminin Karakterizasyonu.....	48

4.6.1.Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	48
4.6.2.Sıcaklık Stabilitesinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	49
4.6.3.pH'nın ve pH Stabilitesinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	50
4.6.4.Enzim Aktivitesi Üzerine Potansiyel Bileşiklerin Etkisi	52
4.6.5.Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	54
4.7.Enzimin Moleküler Ağırlığının Tespiti.....	56
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	59
KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	81

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde Orantı
[S]	Substrat Konsantrasyonu
°C	Santigrat Derece
Cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
IU	Uluslararası enzim ünitesi
kDa	Kilodalton
Km	Michaelis-Menten sabitesi
Log	Logaritmik
M	Molar
mg	Miligram
Mg ⁺²	Magnezyum İyonu
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
nm	Nanometre
µl	Mikrolitre
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol

Kısaltmalar	Açıklama
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum Sülfat
APS	Amonyum persülfat
BaCl ₂ ,	Baryum Klorür
BPP	β-Propellar fosfataz
BSA	Sığır serum albumini
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
CuSO ₄ ,	Bakır sülfat
EC	Enzim Komisyonu
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FeSO ₄ ,	Demir sülfat
HAP	Histidin asit fosfataz
HCl	Hidroklorik Asit
KH ₂ PO ₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat
KI	Potasyum İyodür
LiSO ₄ ,	Lityum sülfat
Mg ⁺²	Magnezyum İyonu
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
MnSO ₄ ,	Mangan sülfat
MW	Molecular Weight
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Disodyum Hidrojen Fosfat Heptahidrat
NaCl	Sodyum Klorür
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Sodyum Dihidrojen Fosfat Dehidrat
OD	Optik Dansite
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PAP	Purple asit fosfataz

PSM	Fitaz tarama ortamı
rpm	Revolutions Per Minute
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
sp.	Tür
TCA	Trikloro asetik asit
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin
Tris	2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
Vmax	Maksimum enzim aktivitesi
ZnSO ₄ ,	Çinko sülfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1.Endüstriyel enzimlerin dünya piyasasındaki payı.....	4
Şekil 2. 1. Neuberg (1908) ve Anderson (1914) tarafından önerilen fitat (fitik asit) yapısı	6
Şekil 2. 2.Fitik asit (<i>myo</i> -inositol-1,2,3,4,5,6-hexafosfat)	7
Şekil 2. 3. Fitik asitteki fosfat grupları ile metal iyon komplekslerindeki farklı bağlanma yolları	7
Şekil 2. 4.Biyokimyasal özellikleri ve sekans analizlerine göre fitazların sınıflandırılması.....	11
Şekil 2. 5. Fitatın, fitaz enzimi ile inositole hidrolizi	12
Şekil 3. 1. Kullanılan toprak örneklerinin alındığı iller	21
Şekil 3. 2. Protein standart grafiği.	32
Şekil 4. 1. Fitaz pozitif izolatın besiyerindeki görüntüsü	37
Şekil 4. 2. <i>Bacillus</i> sp. izolatların taksonomik özellikleri	39
Şekil 4. 3. Belirlenen kolonilerde serbest oksijenin kabarcıklar halinde görünümü	40
Şekil 4. 4. Bakteriyal koloni tipleri.....	40
Şekil 4. 5. EBD 9-1 bakterisinin 100X objektifte görünümü (Olympus CH-2).....	41
Şekil 4. 6. Petri kutusundaki yumuşak agarlı besiyerinde hareketlilik kontrolü	41
Şekil 4. 7. Işık mikroskopunda bakterilerin görünümü.....	42
Şekil 4. 8.Bakterilerin spor boyama sonrası görünümü	43
Şekil 4. 9. Zon çapı yüksek 2 adet bakterinin üreme ve enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.....	45
Şekil 4. 10. İnorganik fosfat standart grafiği.....	41
Şekil 4. 11. Sıcaklığın ham ve kısmi saf enzim üzerine etkisi	49
Şekil 4. 12. 60°C’de ham ve saf enzimin stabilitesi	50
Şekil 4. 13.pH’nın ham ve kısmi saf enzim üzerine etkisi.....	51
Şekil 4. 14. pH 7.0’de ham ve saf enzimin stabilitesi.....	52

Şekil 4. 15. Çeşitli potansiyel bileşiklerin saf enzim üzerine etkisi	54
Şekil 4. 16. Fitaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	56
Şekil 4. 17.SDS-PAGE sonrası elde edilen jelde protein bandlarının görünümü	57
Şekil 4. 18. Standart proteinlerin Rf değerleri ve molekül ağırlıklarına göre oluşturulan standart eğri	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Mikrabiyal fitazların bazı özellikleri	16
Çizelge 3. 1. Fitaz pozitif bakterilerin seçiminde kullanılan katı besiyeri.....	23
Çizelge 3. 2. Biyokimyasal testlerde kullanılan besiyerleri	24
Çizelge 3. 3. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri	26
Çizelge 3. 4. Fitaz üretimin ortamının tespitinde kullanılan sıvı besiyeri	26
Çizelge 3. 5. Fitaz aktivite tayini reaksiyon bileşenleri	28
Çizelge 4. 1. Fitaz pozitif bakterilerin zon çapları	38
Çizelge 4. 2. <i>Bacillus</i> cinsinin belirlenmesinde kullanılan morfolojik testler ve test sonuçları	43
Çizelge 4. 3. Fitaz içerikli besiyerinde üretilen zon çapı yüksek iki bakterilerin enzim aktivitelerinin karşılaştırılması	44
Çizelge 4. 4. Farklı konsantrasyonlarda amonyum sülfat çöktürmesi	47
Çizelge 4. 5. Fitaz enziminin saflaştırma basamakları	41
Çizelge 4. 6. Fitaz enzimi üzerine sıcaklığın etkisi	41
Çizelge 4. 7. Sıcaklık stabilitesinin fitaz enzimi üzerine etkisi.....	49
Çizelge 4. 8. Enzim üzerine pH etkisinin belirlenmesi.....	50
Çizelge 4. 9. pH stabilitesinin enzim üzerine etkisi.....	51
Çizelge 4. 10. Potansiyel bileşiklerin enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	53
Çizelge 4. 11. Fitaz enzimi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi	55

1. GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalar tarafından üretilen özelleşmiş katalitik fonksiyonlara sahip protein molekülleridir ve canlı organizmaların hayatsal faaliyetlerini gerçekleştirmeleri için gerekli pek çok biyokimyasal reaksiyonlardan sorumludurlar. İlk zamanlar, enzimatik reaksiyonlar nitelikleri bilinmemesine rağmen yazının kullanılmasından çok yıllar önce gözlemlenmiş ve kullanılmıştır. Sütün ekşimesi, şekerin fermentasyon ile alkol oluşturması, şarap, sirke ve peynirin yapılması, ekmeğin mayalanması gibi enzimatik reaksiyonlar çok eskiden beri bilinmekte ve kullanılmaktaydı. Şarap üretimi için fermentasyonun kullanılmasını Yunanlılar Baküs'e atfederler. Bugün bu reaksiyonların enzimlerden meydana geldiği bilinmektedir. Fakat uzun zaman bu reaksiyonların bazı mikroorganizmaların mevcudiyeti ve canlı halde bulunması ile mümkün olabileceği zannedilmekteydi. Biyolojik kataliz, ilk kez 1800'lerin ilk yıllarında, mide salgıları vasıtasıyla etin sindirilmesinin, tükürük ve çeşitli bitki ekstraktları vasıtasıyla nişastanın şekere dönüştürülmesinin incelenmesi çalışmalarında tanındı ve tanımlandı. Payen ve Persoz 1833'de malt ekstratından alkol ile nişastayı parçalayan enzimi presipite etmişler ve diastase adını vermişlerdir. Takriben aynı tarihlerde Beaumont mide suyunun sindirimi kolaylaştırıcı etkisinin kimyasal bir maddeye bağlı olduğunu bulmuş ve 1836'da da Schwann bu maddeyi izole ederek pepsin adını vermiştir (Polaina ve ark. 2007).

Lous Pasteur, 1850'lerde, şekerin maya vasıtasıyla alkole fermentasyonunun "fermentler" vasıtasıyla katalizlendiği sonucuna vardı ve daha sonra "enzimler" olarak adlandırılan bu fermentlerin canlı maya hücrelerinin yapısından ayrılmaz olduğunu kabul etti. Pasteur'ün bu görüşü uzun yıllar kabul gördü. Ancak 1897'de Eduard Buchner tarafından maya ekstraktlarının şekeri alkole fermente edebildiğinin keşfi, fermentasyonu sağlayan enzimlerin canlı hücre yapısından çıkarıldığında da fonksiyon görebildiğini kanıtladı. Hansen 1874 yılında, enzim preparatının (rennet) standart bir şekilde üretildiği ilk ticari firma olan C. Hansen Laboratuvarını kurmuştur. Frederick W. Kühne 1878'de bu moleküllere "enzim" adını vermiştir (Nelson ve Cox 2004, Whitehurst ve Van Oort 2010). Bütün proteinler gibi enzimlerin de monomeri, amino asitlerdir. Enzimleri diğer protein moleküllerinden ayıran özelliği biyokimyasal

reaksiyonları katalizleme yeteneğidir ve bu yeteneği sayesinde pek çok çalışma alanlarında ilgi kaynağı olmaktadır (Anonymous 2001, Wolfson ve ark. 2008).

Bugün ekmek, bira ve peynir üretimi gibi ekonomik sahalarda, temizlik alanları gibi günlük yaşamda ve bir sağlık alanı olan tıpta teşhis ve tedavide enzimler büyük rol oynamaktadır. Ayrıca, tekstil endüstrisinde, kimya endüstrisinde, kağıt üretiminde gıda endüstrisinde, ziraatta, hayvan beslenmesinde, biyolojik savaşta, atık giderme işlemleri gibi birçok kullanım alanları bulunmaktadır (Daniels 1992, Kirk ve ark. 2002).

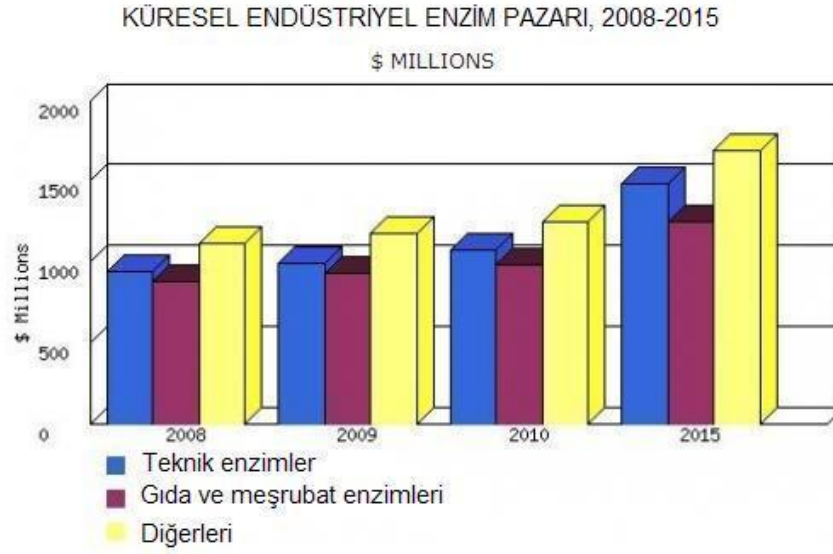
Enzimlerin çok farklı alanlarda kullanılması, özellikle çevre kirliliğine yol açmamaları, kimyasal süreçleri daha ılımlı koşullarda ve ekonomik olarak gerçekleştirmesi sebebi ile dikkatlerin bu konu üzerine çekilmesine yol açmış ve enzim teknolojisi çok hızlı ilerleyen bir konuma gelmiştir. Enzimler, hayvanlar ve bitkiler tarafından sentezlenmesine rağmen, kontrollü koşullarda kısa sürede ürün elde edilmesinden dolayı mikroorganizmalar asıl kaynağı teşkil etmektedir. Mikrobiyal enzimlerin üretim kolaylığı ve ucuzluğu dolayısıyla kullanımı gün geçtikçe artmakta ve önem kazanmaktadır. Endüstriyel enzimler arasında önemi gittikçe artan fitaz enzimi yem endüstrisinde hayvan beslenmesinde kullanılan önemli bir ekstrasellüler enzimdir (Anonymous 2001, Wolfson ve ark. 2008).

Mikrobiyal enzimler yenilenebilir kaynaklardan üretilir ve biyolojik olarak bozulabilir. Enzimlerin üretiminden elde edilen atıklar, toprak verimini arttırmada gübre olarak tarımsal arazilerde kullanılabilir. Çeşitli sektörlerde çevre ve aletlere zararlı etkilere neden olan kimyasalların kullanıldığı eski metodların yerini, biyolojik olarak yıkıma uğrayan enzimlerin kullanıldığı yeni işlemler almaktadır.

Enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların tercih edilmesinin diğer nedenleri ise, oluşturdukları yan ürünlerin az olması, aktivitelerinin yüksek ve daha stabil olması, ekonomik ve yüksek oranlarda saf olarak üretilebilmeleridir. Örneğin, mikrobiyal enzimlerin ekstrem sıcaklık ve pH değerlerinde, çok yüksek düzeyde aktivite göstermeleri endüstri açısından oldukça önemlidir (Wiseman 1987, Horikoshi 1999, Kirk ve ark. 2002). Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık % 90'ı mikroorganizmalardan üretilmektedir (Wolfgang 2004).

Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin tüm dünya genelinde yıllık kullanım oranlarına bakıldığında % 25 alkalın proteaz, % 21 diğer proteazlar, % 18 amilaz, % 10 renin, % 3 tripsin, % 3 lipaz, % 10 diğer karbohidrat parçalayan enzimler (selülaz ve ksilanaz gibi) ve % 10 kadar ise analitik ve farmasötik enzimlerdir (Rao ve ark. 1998). Bu enzimlerin endüstriyel kullanım alanlarına göre dağılımına bakıldığında, % 29'unun gıda sektöründe, % 15'inin hayvan yemi sektöründe, % 56'sının ise genel teknik alanlarda kullanıldığı görülmektedir (Kirk ve ark. 2002, Schallmey ve ark. 2004).

Endüstriyel enzimlerin 2010 yılında dünya piyasasındaki payı tahminen 3,3 milyar dolar civarındadır. Bu pazarın 2015 yılında %6'lık büyüme oranı ile 4,4 milyar dolara ulaşması beklenmektedir. Teknik enzimler 2010 yılında sadece 1 milyar dolar değerinde iken bu sektör 2015 yılında % 6.6 yıllık bileşik büyüme oranı ile 1,5 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir. Teknik enzimlerin en yüksek satışı, deri pazarının ardından biyoetanol pazarında meydana gelmiştir. Gıda ve içecek enzimleri segmentinin dünya piyasasındaki payı 2010 yılında 975 milyon dolarken bu rakam % 5,1 yıllık bileşik büyüme oranı ile 2015 yılında 1,3 milyar dolara yükseleceği öngörülmektedir. Yem enzimleri pazarı 2013 yılında 275 milyon dolar değerindeyken, bu pazarın 2017 yılında 1 milyar doların üzerine çıkacağı düşünülmektedir. Mevcut küresel fitaz pazarının ise yılda yaklaşık 350 milyon dolar olduğu tahmin edilmektedir. Domuz için tüm diyetler genelinde fitazın ortalama penetrasyon oranı yaklaşık % 70 olup, tavukçuluk sektöründe bu oran yaklaşık % 90 civarındadır (Anonymous, 2011).



Şekil 1.1. Endüstriyel enzimlerin dünya piyasasındaki payı (Anonymous, 2011).

Önemli bir endüstriyel enzim olan fitazlar (*myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase*), tahıllar, baklagil ve yağlı tohumların önemli bir içeriği olan Fitat (fitik asit, *myo-inositol hexakisphosphate*)'ı hidrolize eden enzim olup, fitatı inorganik monofosfat, *myo-inositol* fosfat ve serbest *myo-inositol*'e hidrolize etmektedir (Kerovuo ve Tynkkynen2000).

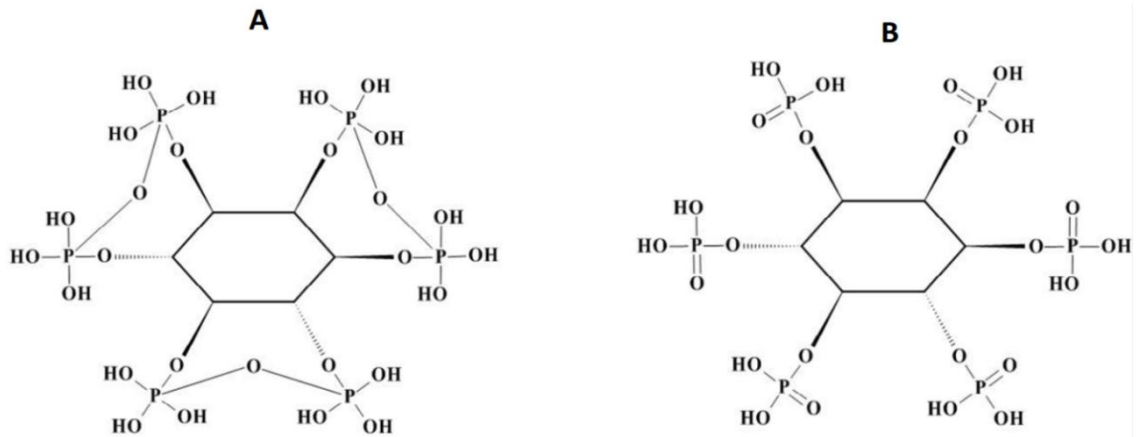
Fitaz enzimi bakteri, fungus ve maya gibi mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedir. Günümüzde ticari olarak üretimde toprak fungusu olan *Aspergillus* kullanılsa da, substrat spesifikliğı, proteolise karşı direnç göstermesi ve katalitik aktivitesi gibi özelliklerinden dolayı bakteriyel fitazlar, fungal enzimlere alternatif oluşturabilmektedir (Konietzny ve Greiner 2004). *Aerobacter aerogenes* (Greaves 1967), *Pseudomonas* sp. (Irving ve Cosgrove 1971), *B. subtilis* (Powar ve Jagannathan 1982), *Klebsiella* sp. (Shah ve Parekh 1990), *B. subtilis* (natto) (Shimizu 1992), *E. coli* (Greiner ve ark. 1993), *Enterobacter* sp.4 (Yoon ve ark. 1996) ve *Bacillus* sp. DS11 (Kim ve ark. 1998) gibi bakteriler iyi birer fitaz üreticisi olarak rapor edilmiştir. Özellikle *Bacillus* suşları patojen olmamaları ve sentezledikleri fitazı hücre dışına salgılama yeteneğinde olduklarından endüstride önemli bir yere sahiptir.

Bu çalışmada, 30 farklı ilden alınan topraktan izole edilecek olan yeni *Bacillus* sp. suşlarından maksimum fitaz enzim aktivitesi gösteren bir adet *Bacillus* sp. seçilerek, bu suş tarafından fitaz üretimi gerçekleştirilecek. Enzim kısmi olarak saflaştırılarak karakterize edilecektir. Saf enzimin optimum sıcaklık, pH ve bunların stabiliteleri; çeşitli metal iyonlarının etkisi; substrat spesifikliği; kinetik parametreleri ve moleküler ağırlığı tespit edilecektir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

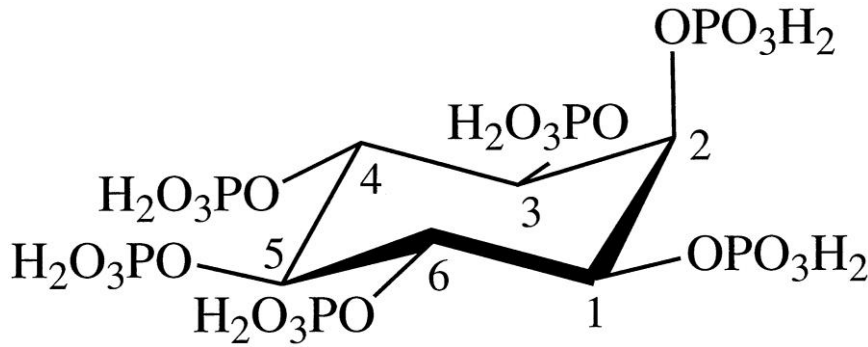
2.1. Fitik Asit (myo-inositol hexaphosphate, tuz formu fitat) tarihçesi, kimyasal yapısı ve özellikleri

Fitik asidin bulunuşu 1855-1856 yıllarında Hartig'in bir çok bitki tohumundan nişastasız küçük tanecikleri izole etmesiyle başlar. Hartig bu küçük partiküllerin tohumun çimlenmesi ve bitkinin büyümesi için temel olan maddelerin kaynağı olarak düşünür (Scott ve Loewus 1986, Kim ve ark. 1999). Daha sonra Pfeffer (1872), Hartig tarafından izole edilen bu partiküllerin nişasta içermediğini ancak Ca, Mg ve P içerdiğini bulmuştur. Ayrıca bu partiküller içinde organik maddeler de gözlemlenmiş ve fosfatın karbonhidrat ile birleştiği tahmin edilmiştir ve inosite-fosforik asit olarak adlandırılmıştır (Schulze ve Winterstein 1896). Fitik asidin yapısı yirminci yüzyıl boyunca kimya bilimciler tarafından pek çok kez yoğun tartışılan bir konu olmuştur. Fitik asidin kimyasal yapısı hakkında Neuberg (1908) ve Anderson (1914) tarafından önerilen iki yapı ortaya atılmıştır (Rodriguez ve ark. 2000, Mullaney ve ark. 2002, Lehmann ve ark. 2000) (Şekil.2.1). Bu iki yapı ile ilgili tartışma, bileşiğin içindeki fosfat gruplarının izomerik yapısına üç güçlü bağlı su moleküllerinin dahil olup olmadığı olmuştur. Element analizi, x-ışını kristalografisi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) ile yapılan çalışmalar Anderson tarafından önerilen kimyasal yapıyı destekler nitelikte olduğu ortaya çıkmıştır (Purva 2004).

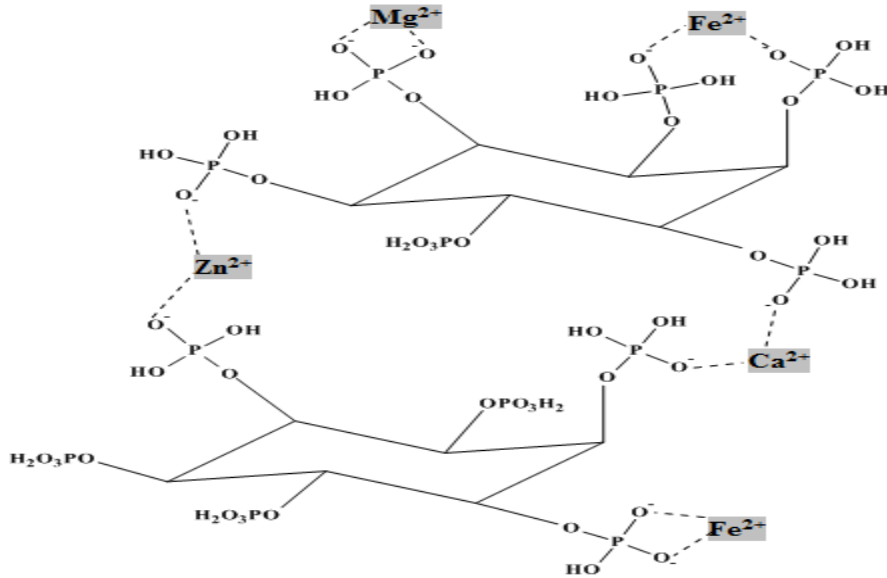


Şekil 2. 1. (A) Neuberg (1908) ve (B) Anderson (1914) tarafından önerilen fitat (fitik asit) yapısı. (Tran 2010)

Fitik asit, myoinositol halkası ve buna bağlı inorganik fosfattan ibaret serbest bir ester asididir (Şekil 2.2). Kimyasal adı, myoinositol 1,2,3,4,5,6 heksakis dihidrojen fosfattır. Fitat, fitik asitin Ca, Mg, K ve Fe tuzlarıdır, tahıl ve baklagillerde fosforun depo formudur ve toplam fosforun % 80'den fazlasını oluşturur (Laboure ve ark. 1993) (Şekil 2.3). Fitatlar, bitki tohumlarında, dane yemlerde, kök ve yumrulara yaygın olarak farklı düzeylerde (%0.1-6.0) bulunurlar. Yemeklik baklagiller diyetsel bir fitat kaynağıdır (Ergün ve ark. 2002).



Şekil 2.2. Fitik asit (*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexafosfat)



Şekil 2.3. Fitik asitteki fosfat grupları ile metal iyon komplekslerindeki farklı bağlanma yolları (Tran 2010)

Tohumların yanı sıra yan ürünlerinde de % 1-2 oranında fitik asit bulunmaktadır ve bu oran tohumlardaki toplam fosforun % 60'dan fazlasını oluşturmaktadır (Reddy ve ark. 1982). Bununla birlikte birçok bitki türünün köklerinde, yumrularında, spor ve polenlerinde de daha düşük miktarlarda bulunabilmektedir (Feil 2001). Mısır tohumları, örneğin % 0.89 fitik asit içermektedir ki, total fosforun % 88'ini oluşturur. Bu nedenle fitin genellikle fosfor ve *myo*-inositol depo şekli gibi kabul edilir. Her ikisi de tohumun çimlenmesi için gereklidir (Laboure ve ark. 1993).

Fitik asit, merkezinde *myo*-inositol halkasından uzanan altı fosfat grubu ile negatif yüklüdür. Bu özelliğinden dolayı K^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} ve Fe^{+2} gibi katyonlara mükemmel bir şelatlayıcı olarak rol oynar. Fitik asit ile divalent katyonların oluşturduğu kompleks, normal gastrointestinal pH da, yani pH 4.0-8.0 arasında en az çözünürlüktedir. Bu durum, hayvanlar ve insanlarda bu minerallerin absorpsiyonu ve sindirimini olumsuz etkiler (Raboy 2001). Fitik asit besinlerin besinsel değerini azaltır. Bu sebeplerden dolayı, insanlar ve hayvanlar için anti besinsel faktör olarak kabul edilir (Kumar ve ark. 2010, Sandberg 2002, Bhandari ve Kawabata 2004).

Fitik asit yüksek derecede iyonize ortofosfat grubu içerdiği için protein, karbonhidrat ve mineral maddelerle erimeyen kompleks bileşiklerin meydana gelmesine de yol açmaktadır. Böylece bunların sindirilme derecesi azalmaktadır. Fitin fosforunun yeteri kadar değerlendirilememesi önemli miktarda fosforun dışkı ile atılmasına yol açmaktadır. Fitin fosforunun değerlendirilebilmesi için fitik asit molekülünün hidrolize olması gerekmektedir.

Monogastrik hayvanlarda (tavuk, domuz ve insanlarda) fitik asidi hidrolize eden enzimlerin yokluğu nedeniyle fitat fosforunu parçalamaları mümkün değildir (Robert ve ark. 2002, Jeri ve ark. 2005). Dolayısıyla bunların yemlerine inorganik fosfat eklenir ve iyi bir büyüme sağlanır. Ancak bu eklenen inorganik fosfat, fitik asidin antinutritive etkisini azaltmaz. Bu problem fitaz eklenip fitat hidrolizinin sağlanması ile çözülebilmektedir (Simell ve ark. 1989). Dolayısıyla fitaz önemli bir endüstriyel enzim ve geniş kapsamlı araştırmaların konusu olmuştur. Son yıllarda fitaz enzimlerinin özellikle hayvan yetiştiriciliği yapılan alanlarda hayvan gübresiyle ortaya çıkan fosfor kirliliğini

azaltmak amacıyla kullanımını da gündeme getirmiştir(Simons ve ark. 1990, Cromwell ve ark. 1995)

Fitatlara mide-bağırsak sistemindeki bazı mineralleri bağlayıcı ve onların yararlılığını azaltan özelliklerinden dolayı besleme değerini azaltan bileşikler gözü ile bakılmıştır. Son zamanlarda yayınlanan veriler kan serumundaki kolesterol ve trigliserit seviyesini düşürmesi yanında, fitatların bağlayıcı özelliklerinin demir kaynaklı bağırsak kanserine karşı koruyucu faydalarının olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda, fitatlar lipid peroksidasyonunu azaltma gibi faydaları ile doğal antioksidant özelliği de göstermektedir (Zhou ve Erdman 1995). Buna ilave olarak, yemeklik tane baklagiller önemli derecede kalsiyum, bakır, demir, magnezyum, fosfor, potasyum ve çinko kaynağıdır (Geil ve Anderson 1994). Bu minerallerin içeriği ve biyolojik olarak yararlılığı büyük oranda bunların işlenme (pişirme) sürecinin derecesine bağlılık göstermekte olup, emilimleri üründe bulunan fitat seviyesine bağlı olarak etkilenmektedir (Liener 1994).

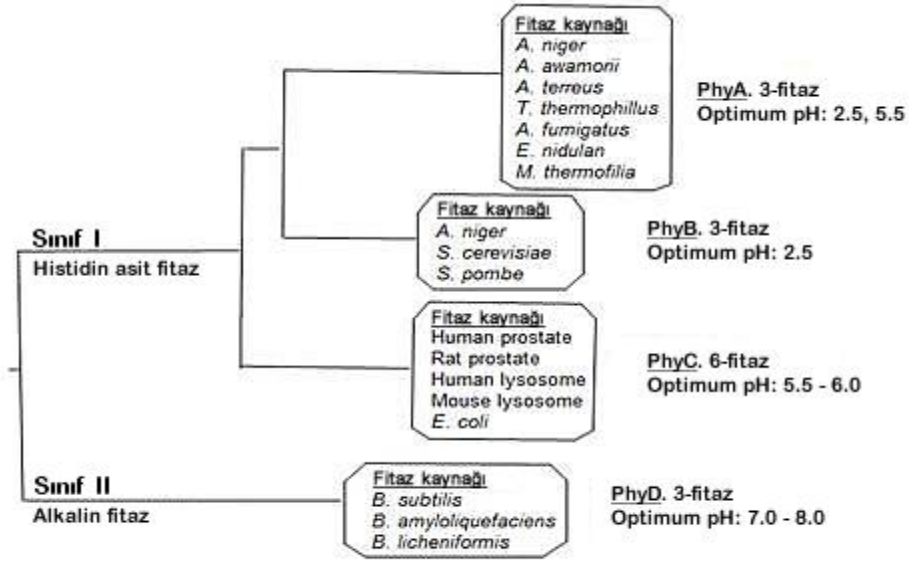
Yapılan bir çok çalışmada fitatı parçalayan enzimlerin fitatdan fosfor kullanımını artırmakta olduğu ve çevrede ortofosfat birikimini önemli derecede azalttığı bildirilmiştir (Cromwell ve ark. 1995, Simons ve ark. 1990). Ayrıca bunların yanı sıra myo-inositol fosfatların hazırlanması, kağıt endüstrisi ve toprak iyileştirme alanlarında da fitaz enzimi kullanılmaktadır. Ayrıca son yıllarda biyoteknoloji alanındaki gelişmeler sonucunda heterolog mikrobiyal ekspresyon sistemleriyle büyük miktarlarda ve düşük maliyetli fitaz üretimi de mümkün olabilmektedir.

2.2.Fitaz Enzimi (Myo-inositol-hegzafosfat fosfohidrolaz; EC 3.1.3.8)

İlk olarak fitaz aktivitesinin Suzuki vd. (1907) tarafından buğday kepeğinde ve McCollum ve Hart (1908) tarafından buzağuların kanında bulunduğu bildirilmiştir. Daha sonra bitki, maya, bakteri ve funguslarda varlığı belirlenmiştir. Ayrıca insan ve hayvanlarda ince barsak mukozası ve kalın barsaklarda bulunan mikroflora tarafından endojen olarak üretildiği tespit edilmiştir. Fakat bitki ve mikrobiyal fitaz aktivitesinin aksine, insan ve hayvanlarda bulunan endojen fitazın aktivitesinin daha önemsiz olduğu saptanmıştır (Weremko ve ark. 1997, Kumar ve ark. 2010).

Fitatı parçalayan bu enzimler Enzim Sınıflandırılmasında Hidrolazlar grubunda olup, IUPAC-IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry) tarafından iki sınıfa ayrılmıştır: Fitatın (D-3) pozisyonundaki ortofosfatı uzaklaştıran 3-fitaz (myo-inositol-hekzakisfosfat 3-fosfohidrolaz, EC 3.1.3.8) ve myo-inositol halkasındaki L-6 (D-4) pozisyonundaki defosforilasyonu sağlayan 6-fitaz (myo-inositol-hekzakisfosfat 6-fosfohidrolaz, EC 3.1.3.26). Mikrobiyal fitazlar genellikle 3-fitaz sınıfında yer alırken bitkisel kökenli fitazlar 6-fitaz sınıfında yer almaktadır (Konietzny ve Greiner 2002). Fakat, bazı istisnalar vardır: soybean fitazı 3-phytase (Phillippy ve Johnston, 1993) and *Escherichiacoli* fitazı ise 6-phytase (Konietzny ve ark.1993)'dır (Tran2010)

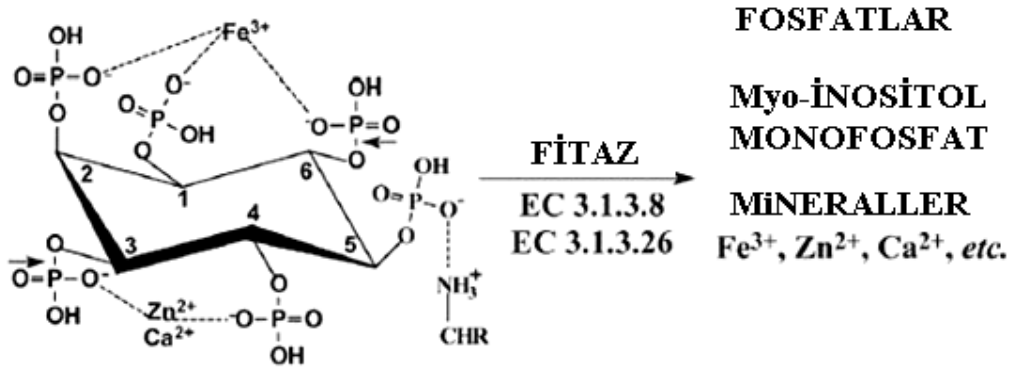
Fitazlar aktif merkezlerinin geometrisi ve katalitik mekanizmalarına göre histidin asit fosfataz (histidine acid phosphatase, HAP) fitazı, β -pervane fitazı (β -propeller phytase, BPP), mor asit fosfataz (purple acid phosphatase, PAP) fitazı olarak sınıflandırılmıştır. Kataliz için optimum pH değerine göre de, fitazlar asit, nötr ya da alkalın gibi isimlendirilebilir (Mullaney ve Ullah 2003). Histidin asit fitazı I.Sınıfta yer alırken, alkalın fitaz II. Sınıfta yer almaktadır. Oh ve arkadaşları aminoasit sekansları ve biyokimyasal özelliklerine göre 2 büyük grup içerisine almışlardır (HAP'lar ve alkalın fitazlar). Bunları da 4 alt gruba ayırmışlardır (Fitaz A, , B, C, D) (Şekil 2.4). (Oh ve ark. 2004).Ancak bitki fitazları bu sınıflandırma içine alınmamaktadır. *Bacillus* sp.fitazları alkalın β -pervane fitazı (BPP) içinde yer almaktadır (Kerovuo ve ark. 1998, Kim ve ark. 1998).



Şekil 2.4. Biyokimyasal özellikleri ve sekans analizlerine göre fitazların sınıflandırılması (Oh ve ark.2004).

Fosfatazlar çeşitli fosfatlı organik moleküllerde monofosfoester bağlarının hidrolizini katalizleyen geniş bir enzim sınıfıdır. Ancak, bu enzimler fitik asitteki monofosfoester bağlarını hidrolizleyemez. Fitatı hidrolizleyen enzimlerin varlığının saptanmasıyla, fitik asidin monofosfoester bağlarını hidrolizleyen enzimlerin fitaz olarak adlandırılan özel bir sınıfa ait olduğu bildirilmiştir (Kerovuo 2000).

Fitaz (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase), fitatı (fitik asiti, myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis dihidrojen fosfat), inorganik monofosfat, myo-inositol fosfat ve serbest myo-inositol'e hidrolize eden enzimdir (Kerovuo 2000) (Şekil 2.5). Fitazlar genelde histidin asit fosfataz ailesine ait olup, fosforil transfer reaksiyonunda, fosfohistidin ara ürünlerini kullanan fosfotazların alt sınıfıdır (Van Etten 1982, Pasamontes ve ark. 1997, Lei ve ark. 2007).



Şekil 2.5. Fitatın, fitaz enzimi ile inositole hidrolizi(Yu ve ark.2012).

Fitaz enzimi Shieh ve Ware (1968) tarafından, fitatın hidrolizi sonucu serbest kalan inorganik fosfattan dolayı, bitki orjinli hayvan yemlerinin değerini arttırmak için, hayvan yemi katkısı olarak önerilmiştir (Mitchell ve ark. 1997).

İlk ticari fitaz enzimi olan Natuphos, ilk olarak *Aspergillus niger*'den izole edilmiş, 10 N-glikolizasyon bölgeleri ile 80 kDa moleküler ağırlığa sahip ve 1.4 kb DNA fragmenti tarafından kodlanmış, *Aspergillus niger* PhyA'dır (Van Hartingsveldt ve ark. 1993, Han ve Lei 1999) ve 1991'de piyasaya çıkmıştır.

Fitazlar, genellikle 40-100 kDa moleküler ağırlığa sahip olan monomerik protein olarak değerlendirilmektedir. Geniş substrat spesifikliği göstermekle birlikte, genellikle optimum pH ve sıcaklığı 4.5-6.0 ve 45-60°C'dır. Fitazın kristal yapısı, 2.5 Å çözünürlükte tespit edilmiştir. Fitazın immobilizasyonu, thermostabilitesini arttırmak için bulunmuştur (Pandey ve ark. 2001).

Fitaz enzimi bakteri, fungus ve maya gibi mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedir. Günümüzde ticari olarak üretimde toprak fungusu olan *Aspergillus* üzerinde durulmaktadır. Ancak substrat spesifikliği, proteolise karşı direnç göstermesi ve katalitik aktivitesi gibi özelliklerinden dolayı bakteriyel fitazlar, fungal enzimlere alternatif oluşturabilmektedir (Konietzny ve Greiner 2004). *Aerobacter aerogenes* (Greaves 1967), *Pseudomonas* sp. (Irving ve Cosgrove 1971), *B. subtilis* (Powar ve Jagannathan 1982), *Klebsiella* sp. (Shah ve Parekh,1990), *B. subtilis* (natto) (Shimizu 1992), *E. coli* (Greiner ve ark. 1993), *Enterobacter* sp.4 (Yoon ve ark. 1996) ve *Bacillus*

sp. DS11 (Kim ve ark. 1998) gibi bakterilerde saptanmıştır. *Bacillus* suşları patojen olmamaları ve sentezledikleri fitazı hücre dışına salgılama yeteneğinde olduklarından endüstride önemli bir yere sahiptir. *Bacillus* fitazlarının moleküler ağırlığı 38-47 kDa, nötral pH'da optimal ve optimum sıcaklığı 55-70°C arasındadır (Polaina ve MacCabe 2007). Fitazın gübreye atılan fosfor miktarında meydana getirmiş olduğu azalma %20 ile 50 arasında değişmektedir (Kornegay 2001). Fitaz enzimi kullanımı Avrupa'da giderek yaygınlaşmış ve bazı Avrupa ülkelerinde bu zorunlu hale getirilmiştir (Kutlu 2000). Dünyadaki fitaz pazarının her yıl %5 artması ile 200 milyon \$'dan daha fazla bir değerde olduğu tahmin edilmektedir (Anonymous 2009).

2.3.Fitaz Enziminin Kaynakları

2.3.1. Bitkisel Fitazlar

Fitaz aktivitesi hububat, bakliyat ve yağlı tohumlarda (Viveros ve ark. 2000) ya da avokado ve taze soğan yaprakları gibi oldukça tüketilen meyve ve sebzelerde tespit edilmiştir (Phillippy ve Wyatt 2001). Bazı tahıl taneleri (buğday, kavuzlu buğday, çavdar, arpa, tritikale) 5.000 unit/kg'den daha fazla aktiviteye ulaşabilen yüksek seviyede fitaz aktivitesi gösterirler. Bu tahılların ve ürünlerinin bitkisel fitaz kaynağı olarak kullanımı, hayvan beslenme çalışmalarında denenmiştir (Han ve ark. 1997).

Bitkilerden elde edilen fitazlar genelde optimum pH'sı 4.5-6.0 ve optimum sıcaklığı 38-55 °C aralığında olan histidin asit fosfatazlardır. Bunun yanında bitki fitazlarının kinetik özelliklerinde büyük farklılıklar bulunmaktadır (Km 30-300 µM; kcat 43-704 s⁻¹ ve spesifik aktivite 43-636 U/mg protein). Moleküler ağırlıkları 47-76 kDa'dur (Lei ve ark. 2007).

Histidin asit fosfataz ailesindeki bitkisel fitazlar, genellikle 6-fitaz olarak kabul edilir. Ancak, yapılan çalışmalarda bitkisel fitazların bazılarının (Lupin LP11 and LP12) ortofosfatı hidrolizlemeye, inositol halkasının D-3 pozisyonundan başladığı belirlenmiştir (Greiner ve ark. 2002). Bazı bitkisel fitazların alkalın fosfataz ya da purple asit fosfataz olduğu saptanmıştır. Zambak poleni fitazının optimum pH'sının 8.0 ve sıcaklığının ise, 55°C olduğu bildirilmiştir (Jog ve ark. 2005). Enzimin kalsiyum tarafından aktive olduğu, EDTA tarafından inhibisyona uğradığı ve son ürün olarak *D-myo-Ins-1,2,3-trifosfat* açığa çıktığı ve dar bir substrat spesifikliğine sahip olduğu

bildirilmiştir. Hegeman (2001) çimlenmiş soya fasülyesinden izole edilen fitaz geninin, histidin asit fosfataza hiçbir benzerlik göstermediğini, fakat iki çekirdekli Fe(III)-Me(II) merkezini içermesi ile purple asit fosfotazlara yüksek oranda benzerlik gösterdiğini bildirmiştir. Enzimin optimum pH'sının 4.5-5.0 ve optimum sıcaklığının 58°C olduğu belirlenmiştir.

Optimum pH'sı asidik olan bitki fitazlarının yanısıra alkali ortamda optimum aktivite gösteren bitki fitazları da mevcuttur. Bu nedenle bitki fitazları optimum pH'sına göre asidik ve alkali olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Asidik bitki fitazları, pH 5.0, alkali fitazlar ise, pH 8.0 civarında optimum aktiviteye sahiptirler.

2.3.2. Hayvansal Fitazlar

Fitaz aktivitesi çeşitli hayvan türlerinin dokularında tespit edilmesine (Bitar ve Reinhold 1972) rağmen, hayvansal kaynaklı fitazların hiçbirinin moleküler karakterizasyonu tamamlanmamıştır. Bu enzimlerin çoğu fitat için Km değeri, 0.03-2.6 mM aralığındadır. Hayvansal fitazlar nötral ve alkali aralıkta optimum pH göstermesine rağmen, kümes hayvanlarının bağırsak epitel hücrelerinde yapılan bir çalışmada, optimum pH'nın 5.5-6.0 olduğu gösterilmiştir (Ellestad ve ark. 2002).

Fitazlar bağırsak epitel hücre membranından izole edilmiş olsa da (Maenz ve Classen 1998, Ellestad ve ark. 2002), tek mideli hayvanlarda besinsel fitat fosforunun kullanılabilirliğini arttırmak için, düşük maliyetli ekzojen fitazın ilave edilmesi hayvansal fitazın araştırılmasını gölgede bırakmıştır. Kalın bağırsak veya rumende bulunan fitaz aktivitesi esasen mikrobiyal kökenlidir (Wise ve Gilbert 1982, Yanke ve ark. 1998).

2.3.3. Mikrobiyal fitazlar

Fitaz enzimi bitkilerde, mikroorganizmalarda ve bazı hayvansal dokularda bulunmasına rağmen yapılan son araştırmalar mikrobiyal fitazların biyoteknolojik uygulamalar için en ümit verici olduğunu göstermiştir (Pandey ve ark. 2001, Vohra ve Satyanarayana 2003). Bakteri, maya ve funguslardan fitaz enzimleri karakterize edilmiş olup (Çizelge 2.1), günümüzde ticari olarak üretimde toprak fungusu olan *Aspergillus* üzerinde durulmaktadır. Ancak substrat spesifitesi, proteolizise karşı direnç göstermesi

ve katalitik aktivitesi gibi özelliklerinden dolayı bakteriyel fitazlar, fungal enzimlere alternatif oluşturabilmektedir (Konietzyn ve Greiner 2004).

Bakteriyel fitazların ortalama olarak moleküler ağırlığı (40-55 kDa) glukolizasyon farkı olduğu için fungal fitazlardan (80-120 kDa) daha küçüktür (Choi ve ark. 2001, Golovan ve ark. 2000, Han ve Lei 1999, Kerovuo ve ark. 1998, Rodriguez ve ark. 2000a, Van Hartingveldt ve ark.1993).

İzole edilen fitazların çoğunun pH optimumu 4.5-6.0 arasında yer almaktadır. Ancak *Bacillus* sp.'ye ait nötral veya alkali fitazlar da bulunmaktadır (Choi ve ark. 2001, Kim ve ark. 1998). *A. niger* fitazının (phyA) pH optimumu ise asidik sınırlarda olup 2.5 ve 5.5'dir. Bu iki sınır arasında aktivitede azalma meydana gelmektedir. Mikrobiyal fitazların çoğunun sıcaklık optimumu ise 45-60°C arasında yer almaktadır. Ancak Pasamontes ve ark. (1997 a,b) *A. fumigatus*'a ait sıcaklığa dirençli fitazın 100°C'ye kadar olan sıcaklıklarda 20 dakikalık inkübasyonlarda sadece %10'luk kayıpla aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 2.1. Mikrobiyal Fitazların bazı özellikleri

Fitaz Kaynağı	pH optimumu	Sıcaklık optimumu	Spesifik aktivite (U/mg)
<i>Aspergillus niger</i>	2.2, 5.0-5.5	55-58	50-103
<i>Aspergillus terreus</i>	5.0-5.5	70	142-196
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5.0-6.0	60	23-28
<i>Aspergillus oryzae</i>	5.5	50	11
<i>Aspergillus caespitosus</i>	5.5	80	-
<i>Emericella nidulans</i>	6.5	-	29-33
<i>Myceliophthora thermophila</i>	5.5	-	42
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	6.0	65	110
<i>Penicillium simplicissimum</i>	4.0	55	3
<i>Penicillium lycii</i>	5.5	58	1080
<i>Cladosporium</i>	3.5	40	909
<i>Pichia anomala</i>	4.0	60	-
<i>Candida krusei</i>	4.6	40	1210
<i>Escherichia coli</i>	4.5	55-60	811-1810
<i>Klebsiella terrigena</i>	5.0	58	205
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5.0, 5.5	50, 60	224, 297
<i>Klebsiella aerogenes</i>	4.5, 5.2	68	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	4.5	60	23
<i>Citrobacter braaki</i>	4.0	50	3457
<i>Pseudomonas syringae</i>	5.5	40	769
<i>Bacillus subtilis</i>	6.5-7.5	55-60	9-15

2.4.Fitaz enziminin kullanım alanları

2.4.1. Yem katkı maddesi olarak

Fitat, tohumların çimlenmesi sırasında enerji ve fosfor kaynağı olarak görev alsa da bağlı fosfor tek mideli hayvanlarca çok az miktarda kullanılabilir. Bu nedenle inorganik fosfor yenilenemez ve pahalı bir mineral olup kanatlı, domuz ve balık rasyonlarında fosfor kaynağı olarak ilave edilmektedir (Lei ve Porres 2003).

Fitat ve fitata bağlı fosfor tüm kanatlı rasyonlarında bulunmakta ve fitat fosforunun da kısmen kullanıldığı bilinmekteydi (Lowe ve ark. 1939). İlk olarak Warden ve Schaible (1962), broylerde, ekzogen olarak verilen fitazın, fitat fosforunun kullanımını ve kemikteki mineralizasyonu artırdığını bildirmişlerdir. Ancak bundan yaklaşık 30 yıl sonra, yem katkısı olarak, fitata bağlı fosforu serbest bırakacak ve fosfor atığını azaltacak *Aspergillus niger* fitazının ticari olarak kullanımı başlamıştır. Günümüzde tek mideli hayvanlarda yem katkısı olarak fitaz kullanımı oldukça yaygınlaşmış olup hatta nişasta tabiatında olmayan polisakkaritleri parçalayan enzimlerden daha fazla kullanılmaktadır (Bedford 2003). Geçtiğimiz 10 yıl içerisinde kanatlı ve domuz rasyonlarında mikrobiyal fitaz kullanımı ile bu konudaki bilimsel çalışmalar ve deneyimler artmakta ve yem katkısı yeni fitaz enzimleri araştırılmakta ve kullanılmaktadır. Ruminantlar ise, rumendeki mikrobiyal flora tarafından üretilen fitaz enzimi ile fitatı parçalayabilmektedirler (Yanke ve ark. 1998). Fitatın parçalanması ile açığa çıkan fosfor hem mikrobiyal flora hem de konakçı ruminant tarafından kullanılmaktadır.

2.4.2. Gıda Sanayi

Fitik asit tuzları olarak tanımlanan fitatlar, bitki tohumları ve danelerde fosfat ve inositolün başlıca depo formudur. Fitat bitki tohumlarının olgunlaşması sırasında oluşur ve olgun tohumlarda toplam fosfatın %60-90'nını oluşturur (Loewus 2002). Fitat bu nedenle bitkisel kökenli gıdaların başlıca bileşenidir. Ancak fitat, besinlerdeki proteinler, amino asitler, kalsiyum, magnezyum, demir ve çinko gibi metal iyonlar ile suda çözünmez kompleksler oluşturduğundan dolayı anti besinsel faktör olarak hareket etmektedir. Bundan dolayı, diyetlerdeki bitki kökenli gıdaların miktarına ve gıdaların işleme derecelerine bağlı olarak günlük fitat tüketimi en fazla 4500 mg'a kadar

yükselmelidir. Ortalama olarak vejetaryen diyetlerinde ve gelişmekte olan ÷lkelerde kırsal kesimlerde g÷nlük fitat t÷ketimeyi yaklaşık 2000-2600 mg olup bu değer karışık diyetlerde 150-1400 mg'dır (Reddy 2002).

Diyetlerde fitatın varlığı ile ilgilenilmesinin nedeni mineral alımındaki negatif etkisidir. Bu mineraller çinko, demir, kalsiyum, magnezyum, manganez ve bakırdır (Konietzny ve Greiner 2003, Lopez ve ark. 2002). Fizyolojik pH değerlerinde çözünmeyen mineral-fitat komplekslerinin oluşumu düşük mineral emiliminin temel nedeni olarak bildirilmektedir. Çünkü bu kompleksler aslında insan sindirim sisteminde absorbe olmamaktadır. Ayrıca sindirim sisteminin üst kısmında sınırlı miktarda mikrobiyal popülasyonun olması ve işsel fitatı hidrolize edici enzimlerin olmaması nedenleri ile ince bağırsakta, fitat çok sınırlı miktarda hidroliz olabilmektedir (Iqbal ve ark. 1994).

Fitaz enzimi yem katkıları olarak kullanılmasının yanı sıra gıda sanayinde de büyük bir potansiyele sahiptir. Ancak şimdiye kadar marketlerde fitaz enzimi kullanılmış gıdalar bulunmamaktaydı. Bu alandaki çalışmalar, gıda işlemede teknik geliştirmenin yanı sıra bitki kökenli gıdaların besleyici değerlerinin artırılması üzerine yoğunlaşmıştır. Fitat içeriği yüksek diyetler mineral maddelerin absorpsiyonunu oldukça azaltmakta (Konietzny ve Greiner 2003, Lopez ve ark. 2002) ve gıdaların işlenmeleri sırasında fitatın defosforilasyonu, sadece kısmen fosforile olmuş myo-inositol fosfat esterlerinin oluşmasına neden olmaktadır (Sandberg ve ark. 1999). Gıda sanayinde gıdaların işlenmesi sırasında fitaz ilavesi ekmek yapımı (Haros ve ark. 2001), bitkisel protein izolatlarının üretimi (Fredrikson ve ark. 2001, Wang ve ark. 1999) ve tahıl kepeklerini parçalamada kullanılmaktadır (Kvist ve ark. 2005).

2.4.3. Kağıt endüstrisi

Kağıt endüstrisinde bitki fitik asitinin uzaklaştırılması oldukça önemlidir. Günümüzde termostabil fitazlar, kağıt hamuru ve kağıt yapma aşamalarında fitik asiti parçalamak amacıyla kullanılan biyolojik maddelerdir. Fitik asitin enzimatik olarak parçalanması sonucunda kanserojen veya toksik maddeler içeren ürünler oluşmaz. Bu nedenle kağıt endüstrisinde fitaz enzimlerinin kullanımı, daha temiz bir teknolojinin kullanılmış olması ve dolayısıyla çevreyi koruma açısından önem taşımaktadır (Liu ve ark. 1998).

2.4.4. Toprak iyileştirme

Bazı alanlarda toprakta, fitik asit ve türevleri toplam organik fosforun %50'sini oluşturabilmektedir (Dalal 1978). Findenegg ve Nelemans (1993), mısır bitkisi için topraktaki fitik asitten fosforun kullanılabilmesinde fitazın etkisini araştırmışlardır. Toprağa fitaz ilave edildiğinde fitinin parçalanma oranının artmasına bağlı olarak büyümeyi uyardığını bildirmişlerdir. Bu çalışma bitkilerin köklerinde fitaz geninin ekspresyonu ile transgenik bitkilerle topraktaki fosforun kullanılabileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır (Day 1996).

2.4.5. Biyoteknoloji

Geçtiğimiz 20 yıl içerisinde fitaz enzimi, besleme, çevre koruma ve biyoteknoloji alanlarındaki bilim adamlarının dikkatini çekmektedir. Fitazlar özellikle biyoteknolojik uygulamalarda (özellikle yem ve gıdalardaki fitat içeriğini azaltmada) büyük bir önem taşımaktadır (Lei ve Stahl 2001, Vohra ve Satyanarayana 2003).

2.5. *Bacillus* Hakkında Genel Bilgiler

Bacillus adı, 1872 yılında Ferdinand Cohn tarafından ilk defa kullanılmıştır (Lin 1997). Bacillaceae familyasına dâhil olup, Gram pozitif (bazı türleri değişken), aerobik veya fakültatif anaerobik, spor oluşturan, çubuk şeklinde bakterilerdir. Çoğunlukla mezofilik olmakla birlikte psikrotrof ve termofilik türleri de vardır (Ayhan 2000). Endospor oluştururlar. Vejetatif hücreler 0,5x1,2 µm ile 2,5x10 µm çapındadır. *Bacillus* cinsinin koloni morfolojisi çeşitlilik gösterir.

Tek ya da çok sayıda hücreden oluşan uzun zincirler meydana getirebilirler. Hücrede bulunan sporun şekli ve yeri, türler arasında farklılık gösterir. Sporlar genellikle silindirik, elipsoidal, oval ya da yuvarlaktır. Sporun hücre üzerindeki konumu ise merkezde, merkeze yakın veya uçta bulunabilir (Lennete ve ark. 1985). *Bacillus*'ların tanımlanması ve türler arasındaki farklılıkların belirlenmesinde spor ve konumları temel alınabilmektedir.

Bazı türler fakültatif anaerob özellikte olsalar ve oksidaz testleri değişkenlik gösterse de, daima katalaz pozitiflerdir. Bilinen birkaç tür hareketsizdir. Tür düzeyinde

tanımlamada önemli bir yer tutan spor şekilleri ve konumları, faz-kontrast veya spor boyama ile kolayca saptanabilir.

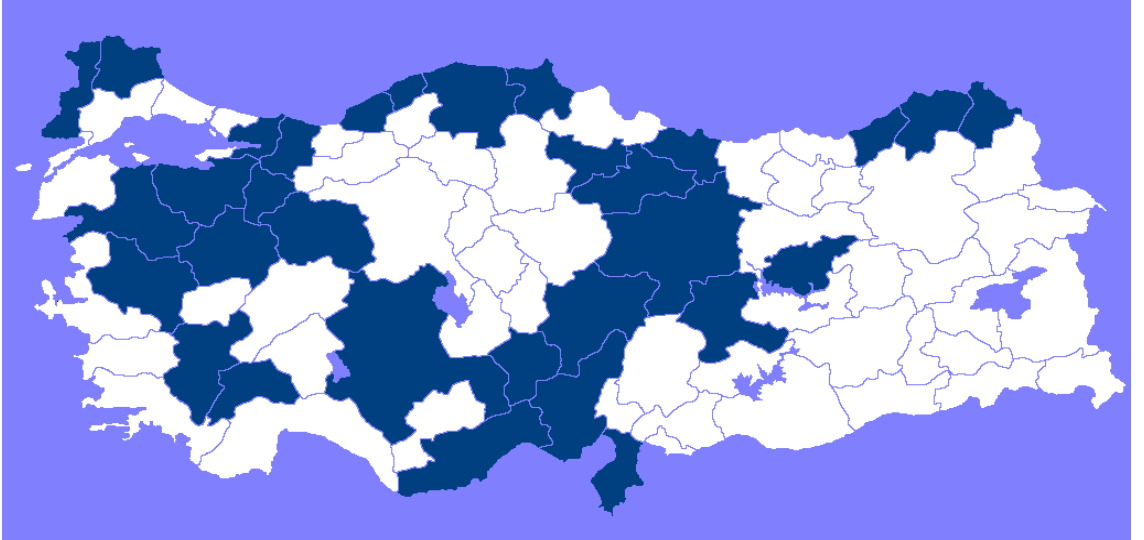
Şekerleri fermente ederler ve sonuçta gaz oluşumu görülmezsizin asit üretirler. Proteinleri ise, amonyak oluşturarak parçalarlar ve böylece kokuşmaya neden olurlar. DNA'larındaki G+C mol oranı %32-62'dir (Çon ve GÖKALP 1997). Bütün türleri Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi ürer. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren; nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler (Kaynar ve Beyatlı 2006).

Bacillus cinsi bakteriler toprak, hayvan dışkıları ve bitkisel atıklar üzerinde yaygın olarak bulunurlar. Bu cinsin bireylerinin çoğu zararsız, izolasyonu ve teşhisi kolay, hızlı büyüme oranı ile fermentasyon süresi kısadır. Genel olarak güvenli olmaları, sentezledikleri proteinleri dış ortama salgılama kapasiteleri gibi birçok nedenden dolayı cazip endüstriyel organizmalardır. *Bacillus* türleri çeşitli kompleks substratlara karşı aktivite gösteren çok sayıda ve çeşitli hidrolitik enzimler üretmekte ve salgılamaktadırlar. Bu nedenle *Bacillus* cinsindeki organizmalar, endüstriyel alanda α -amilaz, fitaz, proteaz, glukanaaz, glukoz izomeraz ve endonükleaz gibi enzimlerin üretiminde yaygın şekilde kullanılmaktadırlar (Arıkan ve Gözükara 2012)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılacak *Bacillus* suşları Türkiye'nin 30 farklı ilinden alınan toprak örneklerinden izole edilmiştir. İzolasyon sonucu en yüksek fitaz aktivitesine sahip *Bacillus* sp.'ler farklı içerikli ortamlarda üretilmişler ve bunlardan en iyi enzim aktivitesinin saptandığı üreme ortamı ve *Bacillus* sp. Tespit edilerek, çalışmaya bu bakteri ile devam edilmiştir ve *Bacillus* sp.'ler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere kültür saklama besiyerinde korunmuştur.



Şekil 3.1. Kullanılan toprak örneklerinin alındığı iller: Adana, Amasya, Ardahan, Artvin, Balıkesir, Bartın, Bilecik, Burdur, Denizli, Edirne, Eskişehir, Hatay, Kastamonu, Kayseri, Kırklareli, Kocaeli, Konya, Kütahya, Malatya, Manisa, Mersin, Niğde, Ordu, Sakarya, Sinop, Sivas, Trabzon, Tunceli, Tokat, Zonguldak.

3.2.Yöntem

3.2.1. Fitaz pozitif bakterilerin izolasyonu

Çalışmalarda kullanılacak olan fitaz pozitif bakterilerin izolasyonu için, toprakların ince kısmından 0,25 g tartılmış ve 10 ml steril fizyolojik tuzlu su içerisinde iyice vortekslenerek karıştırılmıştır. Örnekler, 60°C’ de 30 dakika tutularak vejetatif formların ölmesi, ortamda yalnızca sporlu bakterilerin kalması sağlanmış ve tüplerin ağzları kapatılarak soğumaya bırakılmıştır (Lennette ve ark. 1985)

Bakterilerin fitaz üretme kapasitelerinin katı besiyerde belirlenmesi amacıyla modifiye edilmiş fitaz tarama ortamı (PSM) kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Fitaz tarama ortamının hazırlanmasında, tüm maddeler miktarına uygun bir şekilde ölçülüp erlende karıştırılmış ve bu şekilde otoklavlanmıştır. Otoklav işlemi bittikten sonra 50-55°C’ ye kadar soğutulan besiyerleri, 180°C’ de 1 saat pastör fırınında steril edilen petri kaplarına 15’er ml dökülerek soğumaya bırakılmıştır.

Farklı illerden alınan toprak örneklerinden 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} ve 10^{-9} olmak üzere seri dilüsyonlar yapılmış ve petrilere 0,1 mL örnek pipetlenerek yayma yöntemine göre ekim yapılmıştır (Temiz 1994). Ekimi tamamlanan petriler 37°C’ de 96 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda petri kaplarındaki koloniler gözlemlenmiş, zon oluşumunun varlığına göre bakteriler fitaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Zonların büyüklükleri cetvel ile ölçülmüştür. Çalışmada zon çapı büyük olan suşlar seçilmiş ve saf kültür olarak nütrient brothlu agarlı ortamda kültüre edilerek, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C’ de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Fitaz pozitif bakterilerin seçiminde kullanılan katı besiyeri (Howson ve Davis 1983)

İçerik	Fitatlı besiyeri (g/L)
Glukoz	20
Na-Fitat	4
CaCl₂.2H₂O	2
NH₄NO₃	5
KCl	0,5
MgSO₄.7H₂O	0,5
FeSO₄.7H₂O	0,01
MnSO₄.7H₂O	0,01
Agar	15
pH	7.0

3.2.2. *Bacillus*' un taksonomik sınıflandırılması için morfolojik ve fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi

Elde edilen bakterilerden, en büyük zon çapına sahip bakterilerin saf kültürlerinin morfolojik ve fizyolojik özellikleri incelenerek, *Bergey's Manual of Systematic Microbiology*' den alınan tayin anahtarına göre *Bacillus*' lar belirlenmiştir (Buchanan and Gibbons 1974).

Çizelge 3. 2. Biyokimyasal testlerde kullanılan besiyerleri (Çotuk 2003).

İçerik	Hareketlilik Testi (% g)	Katalaz Testi (% g)	Spor Boyama (% g)	Gram Boyama (% g)
Nişasta	-	-	-	-
Nutrient Broth	0.8	0.8	0.8	0.8
Agar	1	2	1	1
pH	7.0	7.0	7.0	7.0

Bacillus cinsini tanımak için 2 adet biyokimyasal test ve 2 adet morfolojik test olmak üzere, toplam 4 adet test yapılmıştır (Çizelge 3.2).

3.2.2.1.Hareketlilik testi

Hareketlilik testi için agar ve nutrient broth kullanılarak ortam hazırlanmıştır (Çizelge 3.2). Steril petriyeler, alt taraflarından kalemle çizilerek ikiye bölünmüş ve bakteri ekilecek kısım işaretlenmiştir. Belirlenen bölgeye 0.1 mL pipetlenen üremiş sıvı kültür, çizgiyi geçmeyecek şekilde, drigalski özesi ile iyice yayıldıktan sonra 37°C’ de 18 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Temiz 1994).

3.2.2.2.Katalaz testi

Katalaz testinde katı ve sıvı ortamlar kullanılarak, farklı yöntemlerle test yapılabilmektedir. Çalışmada ise, % 0.8 nutrient broth içeren agarlı ortama ekilmiş bakteriler, 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda oluşan koloniler üzerine 1-2 damla % 3’ lük H₂O₂ damlatılmış ve gaz çıkışı olup olmasına göre değerlendirme yapılmıştır.

3.2.2.3.Gram boyama

Gram boyama işlemi Temiz (1994)’ in belirttiği yöntemle yapılmıştır. Buna göre; bakterilerin 18 saatlik taze kültürlerinden, steril öze ile alınarak 1 damla steril distile su ile yayma preparat hazırlanmış ve preparatlar havada kurumaya bırakılmıştır. Kuruma tamamlandıktan sonra lamalar 3 defa alevden geçirilerek tespit işlemi yapılmıştır. Daha

sonra lamaların üzerine, mikrobiyal film tabakasını kaplayacak şekilde, bol miktarda kristal viole damlatılarak 1 dakika beklenmiştir. Kristal viole yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra lamaların üzerine % 0.5 I ve % 5 KI ile hazırlanmış gram iyodin (lugol) dökülerek yine 1 dakika beklenmiştir. Boya, suyla uzaklaştırılmış ve lamalar % 95'lik etil alkol ile renk kayboluncaya kadar yıkanmıştır. Ardından, film tabakasının üzerine safranin eklenmiş ve 45 saniye beklenmiş ve boya yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar, havada kurutulmuş ve immersiyon yağı ile 10x100' lük objektifte, Olympus CH-2 marka ışık mikroskopunda incelenmiştir. İyi boyanmış olan örneklerde Gram (+) olan mikroorganizmalar koyu mor (menekşe) renkli, Gram (-) olanlar ise açık pembe renkli görünüşleri ile ayırt edilmiştir.

3.2.2.4.Spor boyama

Endospor boyama işlemi Özkaya-Durlu (2000)' nun belirttiği yöntemle yapılmıştır. Buna göre; taze kültürleri hazırlanan bakteriler, lam üzerine 1 damla steril distile su ile iyice yayılarak havada kurutulmuş ardından 3 kez alevden geçirilerek fikse edilmiştir. Örnekler malaşit yeşili ile alevde 5 dakika etkiye bırakılmış ve buharlaştıkça boya ilave edilmiştir. Distile su ile yıkanan örnekler 30 saniye safranin ile boyanmış ve distile suyla tekrar yıkanıp havada kurutulduktan sonra bakteri sporlarının morfolojileri, Olympus CH-2 marka araştırma mikroskobu kullanılarak incelenmiştir.

3.2.3. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri

Çalışmada kullanılan bakterilerin saklanması, geliştirilmesi amacıyla farklı besiyerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Buna göre, bakterilerin buzdolabı koşullarında uzun süre dayanmalarını sağlamak için, Çizelge 3.3'de verilen kültür saklama besiyerikullanılmış olup, kültürler 30 günde 1 kez yeniden hazırlanan agarlı besiyerine aşılacak sureti ile korunmuşlardır.

Çizelge 3. 3. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri (Sarıkaya 1995)

İçerik	Kültür saklama besiyeri (% g)	Bakteri geliştirme besiyeri (% g)
Tripton	-	1
Yeast Extract	-	0,5
Nutrient Broth	0.8	-
NaCl	0.8	1
Agar	2.0	-
pH	7.0	7.0

3.2.4. Enzim üretimi için kullanılan besiyeri

Biyokimyasal ve morfolojik testler sonucunda tespit edilen *Bacillus* sp.'ler içerisinde fitaz hidroliz oranı (Zon çapı) en yüksek2 adetsuş, fitaz üretim kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla, Çizelge 3.4'teki modifiye besiyerinde üretilmişlerdir (Demirkan ve ark. 2014).

Çizelge 3.4. Fitaz üretim ortamının tespitinde kullanılan sıvı besiyeri(Demirkan ve ark. 2014).

İçerik	Besiyeri (g/L)
Laktoz	5
Meat Extract	8
CaCl ₂	1
Na- Fitat	5
pH	7.5

3.2.5. Bakteri üretim koşulları

Kültür saklama ortamından (Çizelge 3.3) steril öze ile alınan bakteri kültürü, içerisinde 30 mL bakteri geliştirme besiyeri (Çizelge 3.3) bulunan 100 mL' lik erlene aşılansmış, 37°C' de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 48 saat süre ile üretilmiştir.

Bu bakterinin enzim üretim kapasitesini saptamak amacıyla 48 saatlik bakteri kültürlerinin 600 nm' deki optik yoğunlukları (O.D) spektrofotometre (Beckman

Coulter- DU 700) kullanılarak, bir standart elde edebilmek amacıyla, steril fizyolojik tuzlu su ile 0.3' e ayarlanmıştır. Bu şekilde ayarlanan kültür çözeltilerinden, içerisinde 150 mL maksimum enzim üretiminin elde edildiği enzim üretim besiyeri (Çizelge 3.4) bulunan 500 mL' lik erlenlere %3 oranında aşılınmış ve 37°C' de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 72 saat süre boyunca inkübe edilmiştir. Üreme ve enzim aktivite tayinleri 16., 24., 40., 48., 64. ve 72. saatlerde yapılarak bakterinin gelişme grafiği çıkarılmış ve maksimum enzim üretim zamanı saptanmıştır.

3.2.6. Bakteri üremesinin ölçülmesi

Bakteri üremesinin belirlenmesi amacıyla, besiyerinin bulanıklığı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 3.2.5' te belirtilen yöntemle inkübasyona bırakılan besiyerlerinden, belirlenen saatlerde örnek alınarak, 600 nm dalga boyunda okunmuştur. Fitaz üretiminde kullanılan besiyeri kör olarak kullanılmıştır ve optik yoğunluk (OD) değerlerinin okunmasıyla bakteri üreme miktarı belirlenmiştir (Sarıkaya 1995).

Elde edilen optik yoğunluk (OD) değişimleri, zamana karşı grafiklenerek gelişme eğrileri çıkarılmıştır.

3.2.7. Enzim aktivitesinin ölçülmesi

Fitaz aktivitesinin tayininde Coi ve ark. (2001)' ın kullandıkları yöntemden faydalanılmıştır. Bu amaçla, öncelikle kültür ortamından 10 ml alınarak 15 dakika süre ile +4°C' de santrifüj edilerek (5000 devir/dk) bakteri hücrelerinin bulunduğu pellet kısmı ile enzim içeren sıvı kısım birbirinden ayrılmıştır.

Enzim aktivite tayininde substrat çözeltisi olarak 50 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponuna 2mM Na-Fitat eklenmiştir. Bu substrat çözeltisi işlemde önce her seferinde taze olarak hazırlanmıştır.

Deneylede 1 adet kör tüp ve her bir enzim örneği için 2 adet örnek tüpü kullanılmıştır (Çizelge 3.5). Her iki örnek tüpüne 0.9' ar ml substrat çözeltisi, kör tüpüne ise 0,75 ml TCA çözeltisi ilave edilmiş ve tüpler 37°C' lik su banyosunda 5 dakika bekletilerek reaksiyon sıcaklığına getirilmiştir. Daha sonra substrat içeren tüplere 0.1 ml enzim çözeltisinden, kör tüpe ise 0,1 ml Tris-HCl (pH 7.0) tamponu ilave edilerek 37°C' de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda örnek tüplerine 0,75 ml

TCA çözeltisinden eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve kör tüpüne ise 0,9 ml substrat eklenip, tüpler tüp karıştırıcısında (Vortex) karıştırılmıştır. Bu karışıma % 5,5 sülfürik asitle hazırlanan % 2,5 amonyum molibdat çözeltisi ile % 2,5 ferroz sülfat renk reaktifinden 1,5 ml ilave edilmiş ve örneklerin absorbansları köre karşı spektrofotometrede ölçülmüştür.

Çizelge 3.5. Fitaz aktivite tayini reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Örnek Tüpü	Kontrol Tüpü
Substrat çözeltisi	0,9 mL	-
% 5' lik TCA çözeltisi	-	0,75 mL
37°C' de su banyosunda 5 dakika bekletilir.		
Enzim çözeltisi	0,1 mL	-
0.1 M Tris-HCl Tamponu	-	0,1 mL
37°C' de su banyosunda 30 dakika bekletilir.		
% 5' lik TCA çözeltisi	0,75 mL	-
Substrat çözeltisi	-	0,9 mL
Vortekle karıştırılır.		
Renk çözeltisi	1,5 mL	1,5 mL
700 nm' de absorbans ölçümü		

Enzim akivitesi Unit (IU) cinsinden hesaplanmış olup, Standart deney koşullarında dakikada 1 µmol sodyum fitattan inorganik fosfatın serbestlenmesini sağlayan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir. Enzim aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Anonymous, 2014).

$$\text{Enzim Aktivitesi (U /mL)} = \frac{\text{Pi } (\mu\text{M})}{t \text{ (dk)} \times \text{VE (mL)}}$$

Pi : Salınan fosfatın miktarı

t : zaman

V_E : Kullanılan enzimin hacmi

3.2.8. İnorganik Fosfat Standart Grafiği ve Hazırlanışı

İnorganik fosfor miktarını saptamak için farklı konsantrasyonlarda(0-100 μM) standart KH_2PO_4 çözeltileri hazırlandı. İnorganik fosfor miktarı, 3.2.7’de tarif edildiği gibi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

3.2.9. Enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan solusyonlar

3.2.9.1.0.1 M Tris-HCl Tamponu (pH: 7.0)

12,11 gr Tris tartılır ve 900 ml distile su ile seyreltilir. Çözelti 2N HCl ile pH: 7.0’a getirilir. Son hacim 1 L’ ye tamamlanır.

3.2.9.2.%5’ lik TCA (Trikloroasetik asit) çözeltisinin hazırlanması

5 gr TCA tartılır ve son hacim distile su ile 100 ml’ ye tamamlanır.

3.2.9.3.Substrat çözeltisinin hazırlanması

50 ml 0.1 M Tris HCl (pH: 7.0) çözeltisi içerisine 2mM Na-Fitrat karıştırılır. (Kim ve ark. 1998)

3.2.9.4.Renk çözeltisinin hazırlanması

Renk ayracı a ve b çözeltileri ile sırasıyla 4:1 oranında hazırlanır.

a) % 5,5 Sülfürik Asitte hazırlanan %2,5 Amonyum molibdat çözeltisi

90,5 ml' lik distile suya 5,5 ml sülfürik asit ilave edilir. 2,4 g Amonyum molibdat tartılır ve bu çözeltiye ilave edilir.

b) % 2,5 Ferroz sülfat

2,5 g ferroz sülfat tartılır ve distile su ile 100 ml' ye tamamlanır. Günlük olarak hazırlanır.

3.2.9.5.KH₂PO₄ substratı hazırlanışı

0,14 gr KH₂PO₄ tartılır ve çözeltiye 100 ml distile su ilave edilir.

3.3.Fitazın Kısmi Saflaştırılması

En yüksek fitaz aktivitesine sahip bir adet *Bacillus* sp.' nin fitaz enzimi kısmi olarak saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bu amaçla, bakteri modifiye besiyerinde 48 saat süre ile inkübe edilmiş ve inkübasyon sonucu üretim ortamı +4°C' de, 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant ham enzim olarak kullanılmıştır. Ham enzim birbirini takip eden 3 basamakta kısmi olarak saflaştırılmıştır. Ham enzim ve her bir basamankatki enzim örneklerinde enzim aktivite ve protein tayinleri yapılmıştır. Protein tayini, standart olarak 'Sığır Serum Albumin' i kullanılarak Lowry ve ark. (1951) metoduna göre belirlenmiştir. Tüm saflaştırma adımları +4 °C' de yapılmıştır.

3.3.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Ham enzimin en iyi çökelme gösterdiği tuz konsantrasyonunu belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (% 50, % 60, % 70, % 80) amonyum sülfat kullanılmıştır. Ham enzim çözeltisi üzerine havanda toz haline getirilmiş % amonyum sülfat +4 °C' de çok yavaş bir şekilde eklenerek manyetik karıştırıcı üzerinde çözündürülmüştür. Bu şekilde hazırlanan karışım +4 °C'de manyetik karıştırıcıda karıştırılarak bir gece bekletilmiştir. Daha sonra karışım 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant ve pelletler birbirinden ayrılmıştır. Pellet 1 mM CaCl₂ içeren 20mM Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda tamponunda çözülmüş ve aktivite - protein tayinleri yapılmıştır.

3.3.2. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen pellet 1 mM CaCl₂ içeren 20mM Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda çözülmüştür. Yarı geçirgen bir membrandan oluşan diyaliz tüpü (Selüloz membran, Sigma-Aldrich, MWCO-Molecular Weight Cut Off 12.000 Da, 25 mm x 16mm) uygun uzunlukta kesilmiş ve bir ucu sıkıca bağlanmıştır. Tek tip gözenek büyüklüğü sağlamak ve ağır metal kontaminantları gidermek için distile sudan geçirilmiştir. Diyaliz tüpüne örnek aktarılmış, diğer ucu da ip yardımı ile bağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan diyaliz tüpü, aynı tampon içeren 1 L'lik beherin içine alınmış ve behere balık atılarak karışımın sürekli hareketi sağlanmıştır. Diyaliz işlemi manyetik karıştırıcı üzerinde 4°C'de gerçekleştirilmiştir. Tampon 3 defa değiştirilerek diyalize devam edilmiştir. Amonyum sülfatın tamamen uzaklaşıp uzaklaşmadığını saptamak için diyalizde olan tampondan 1-2 damla alınmış ve üzerine 0.1 N HCl ve doygun BaCl₂ çözeltisinden 1-2 damla damlatılmıştır. Bulanıklık görülmemesi sonucu diyaliz bitirilmiştir (Trautwein ve Kuhlmann 1982). Diyalizatın aktivite ve protein tayinleri yapılmıştır.

3.3.3. Ultrafiltrasyon ile Diyalizatın Konsantre Edilmesi

Diyalizat, ultra filtrasyon (MW cut-off 30,000 ve 10,000) tüpüne alınmış ve 4°C'de 5000 rpm'de 15 dakika sürelerle istenilen hacme kadar konsantre edilmiştir. Konsantre edilen örneğin aktivite ve protein tayinleri yapılmıştır.

3.4. Protein miktarının belirlenmesi

Protein miktarının belirlenmesi için de Lowry Metodu kullanılmıştır (Lowry 1951). Protein standart grafiğinin oluşturulması için 0,005 gr BSA 10 mL distile suda çözülmüştür. Konsantrasyonu 0-500 µg/mL olacak şekilde uygun sulandırma yapılarak hazırlanan örneklerin absorbanları 546 nm'de ölçülmüş (Beckman Coulter-UD 700) ve standart eğri grafiği hazırlanmıştır.

Ayıraç A: % 3' lük Na₂CO₃ (0.1 N NaOH' da çözünmüş)

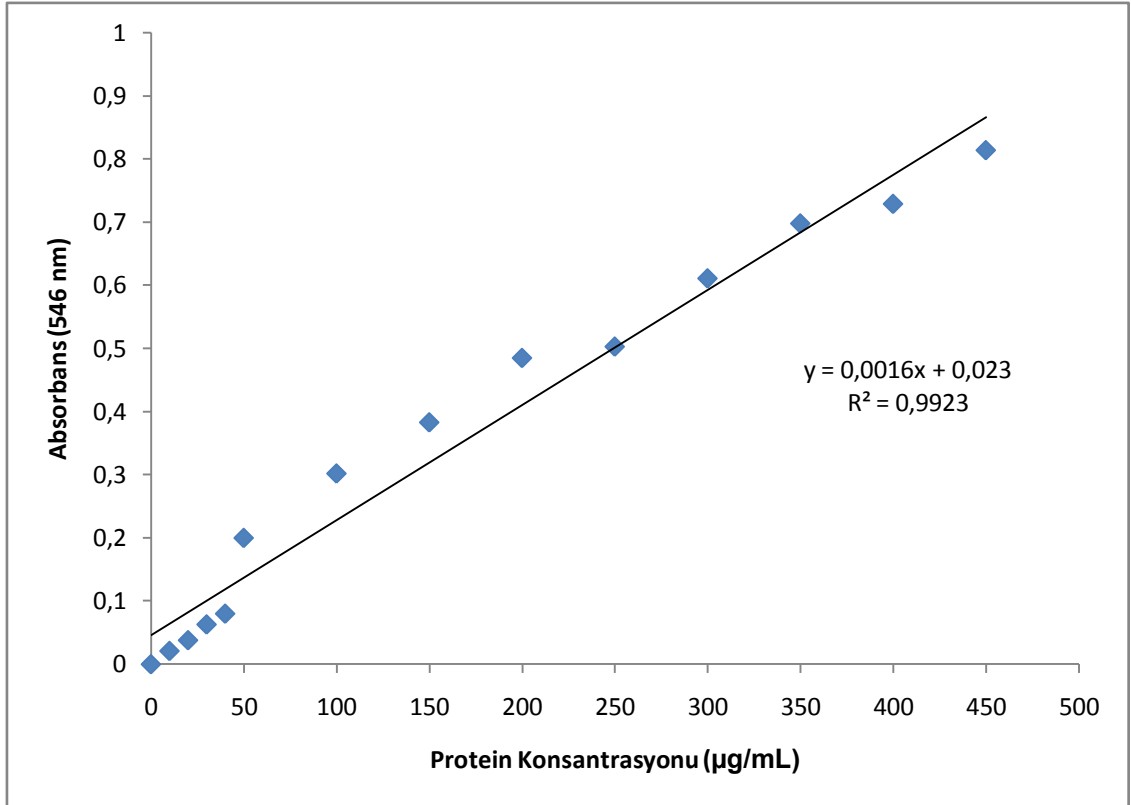
Ayıraç B: % 1' lik CuSO₄ (% 1' lik K-Na- tartarat' da çözünmüş)

Ayıraç C: % 2' lik K-Na-tartarat

Ayıraç D: İhtiyaca göre günlük A, B ve C ayıraçlarından hazırlanır (25:1:1 oranında).

Ayıraç E: 1:1 oranında seyreltilmiş Folin ciocalteus fenol ayıracı

1 mL örnek alınmış, üzerine D ayıracından 5 mL eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra 10 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Kör için ise 1 mL distile su ve D ayıracı alınarak aynı işlemler uygulanmıştır. Daha sonra 0,5 mL E çözeltisi eklenerek vorteksledikten sonra karanlıkta 20 dakika beklenmiş ve köre karşı, 546 nm'de absorbansları okunarak sonuçlar elde edilmiştir. Okunan bu absorbanslar standart protein konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil3.2).



Şekil 3.2. Protein standart grafiği

3.5.Enzimin Karakterize edilmesi

3.5.1. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Kısmi olarak saflaştırılmış fitazın sıcaklık profili 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ve 80°C arasında tespiti ile elde edilerek optimum sıcaklık değeri saptanmıştır. Sıcaklık stabilitesini tespit etmek için enzim 60, 70 ve 80°C' lik sıcaklıklarda belli saatlerde inkübe edilmiş ve aktivite tayini yapılmıştır. Aktiviteler % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.

3.5.2. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın etkisi

Optimal pH, glisin-HCl (pH 2.0 ve 3.0), sodyum asetat (pH 4.0-6.0), Tris-HCl (pH 7.0 ve 8.0), glisin-NaOH (pH 9.0 ve 10) kullanılarak 0.1 M ve pH 2.0-10.0 arasında aktivitenin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Enzimin pH stabilitesi pH 6.0, 7.0 ve 8.0'de belli saatlerde belirlenmiştir. Aktiviteler % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.

3.5.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Potansiyel Bileşiklerin Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının, tuzların ve redükleyici bileşiklerin etkisini tespit etmek üzere enzim 1 ve 5 mM MnSO₄, MgSO₄, FeSO₄, ZnSO₄, CuSO₄, CaCl₂, LiSO₄, BaCl₂, NaCl, KCl, SDS, EDTA, 2-merkaptotanol ile inkübe edilerek aktivite tayini yapılmıştır. Aktiviteler % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.

3.5.4. Kinetik Parametrelerin Saptanması

Fitaz'ın V_{max} ve K_m değerleri farklı konsantrasyonlarda hazırlanacak olan sodyum fitat kullanılarak çizilecek olan Line weaver–Burk grafiği ile tespit edilecektir.

3.6.Enzimin Moleküler Ağırlığının Tespiti

Enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi için Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır. (Laemmli 1970)

3.6.1. Çözeltilerin ve Jelin hazırlanması

a) Polimer matrisi kurmak için akrilamid ve N, N'-metilen-bisakrilamid kullanılmıştır. Bunun için; 28,8 g akrilamid ve 1,2 g bis akrilamid tartılıp distile su

ile toplam 100 mL içerisinde çözdürülmüş ve Whatman No:1 filtre kâğıdından süzülerek, kahverengi bir şişede 0-5°C' de muhafaza edilmiştir. Bu çözelti 2 ay süreyle bozulmadan saklanabilmektedir. (Sarıkaya 1995). Akrilamid çok güçlü bir nörotoksik madde olduğundan çalışırken eldiven ve maske kullanılmalıdır.

b) 1 M Tris-HCl (pH 6.8)

Çözeltiyi hazırlamak için 12,11 gr Tris Base tartılmış, bir miktar suda çözüldükten sonra pH 6.8' e ayarlanmış ve distile su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır.

c) 1 M Tris-HCl (pH 8.8)

Çözeltiyi hazırlamak için 12,11 gr Tris Base tartılmış, bir miktar suda çözüldükten sonra pH 8.8' e ayarlanmış ve distile su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır.

d) % 10'luk Amonyum Per Sulfat (APS)

10 g APS tartılmış ve hacmi distile su ile 100 mL' ye tamamlanmıştır.

e) Örnek Tamponu

100 mL için stok solüsyon:

1 M Tris-HCl pH 6.8	6,5 ml
Gliserol	10 ml
SDS	2 gr
dH ₂ O 4°C' de muhafaza	100 ml

Her bir örnek için 100 µl stok solüsyondan alınmış ve üzerine 5 µl β-mercaptoetanol eklenmiştir. Spatül ucu kadar Bromfenol Mavisini eklenip vortekslenmiştir.

f) Yürütme Tamponu (Running Buffer)

Tris Base	3gr
Glisin	14,4 gr
SDS	1gr
dH ₂ O	1L

g) Yıkama Çözeltisi

İzopropil alkol	250 mL
Asetik asit	100 mL
dH ₂ O	650 mL

h) Boyama Çözeltisi

1,5 g Commassie-brilliant R- 250 mavisini 250 mL izopropil alkolde çözülmüş, daha sonra üzerine 100 mL asetik asit ve 650 mL distile su eklenmiştir.

Jelin Hazırlanması

SDS-PAGE için 2 tip jel hazırlanır.

1) %12,5 Ayırma Jeli hazırlanışı (2 jel için)

dH ₂ O	2,0 mL
1M Tris-HCl pH:8.8	4,4 mL
%1 SDS	1,2 mL
%30 Akrilamid	4,2 mL
%3 Amonyum Persülfat	0,2 mL
TEMED	8 µL

2) %4 Yükleme Jeli hazırlanışı (2 jel için)

dH ₂ O	3,06 mL
1M Tris-HCl pH:6.8	1260 µL
%1 SDS	50 µL
%30 Akrilamid	660 µL
%3 Amonyum Persülfat	100 µL
TEMED	5 µL

Jellerin hazırlanmasında dikkat edilmesi gereken en önemli nokta TEMED' in eklenmesidir. TEMED polimerleştirici ajan olduğundan, eklendikten sonra pipet ile iyice karıştırmalı ve vakit kaybetmeden çözelti cam plakalar arasına dökülmelidir.

Örnekler hazırlandıktan sonra, cam plakalar elektroforez (Bio-Rad) mandalına yerleştirilmiş ve sızma olmayacak şekilde iyice sabitlenmiştir. Ayırma jeli, mikropipet yardımıyla cam plakaların arasına yavaşça dökülmüş ve üzerine isopropil alkol dökülerek, üst yüzeyin düzgün bir şekilde donması beklenmiştir.

Donma tamamlandıktan sonra alkol distile su ile iyice yıkanmış ardından kurutma kağıdı ile kalan su plakaların arasından alınmıştır. Daha sonra sıkıştırma jeli de aynı yöntemle plakaların arasından dökülmüş, donması beklenmeden elektroforez tarağı yerleştirilmiştir. Donma tamamlandıktan sonra tarak çıkarılmış ve kuyucukların düzgün bir şekilde oluşması sağlanmıştır

3.6.2. Örneklerin hazırlanması ve elektroforez koşulları

Fitaz enziminin moleküler ağırlığının belirlenmesi amacıyla 10 farklı protein içeren (SigmaMarker S8445) çözelti standart olarak kullanılmıştır. Ham enzim, amonyum sülfat çöktürmesiyle elde edilen supernatant ve pelet ile diyaliz sonrası örneklerinden 75 µl, ependorf tüplerine konularak üzerlerine 25 µl örnek tamponu (bkz. 3.6.1. e) eklenerek hacim 100 µl' ye tamamlanmıştır. Tüm tüpler 5 dakika süreyle kaynar suda bekletilmiştir.

Daha önce hazırlanmış olan jel, elektroforez tankına oturtularak alt ve üst hazneleri yürütme tamponu (bkz. 3.6.1. f) ile doldurulmuştur. Tankın her iki tarafına da konmuş olan jellerdeki kuyucukların içerilerine, mikropipet yardımıyla 25 µl örnek konmuş ve tanka akım verilerek elektroforez işlemi başlatılmıştır. İzleme boyası jelin 1 cm altında kalacak hale geldiğinde ise elektroforez işlemi bitirilmiştir. Jele, örneklerin düzgün sırada ilerlemesi için önce 80 V, örnekler ayırma jeline geçtikten sonra 150 V sabit akım verilmiştir. Elektroforez işlemi yaklaşık 2,5 saat sürmüştür.

3.6.3. Boyama ve boyanın uzaklaştırılması

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra üst plaka jeli yırtmayacak şekilde çıkarılmıştır. Sıkıştırma jeli bir spatül yardımıyla, ayırma jelinden ayrılmış, marker yüklenen kuyucuğun kenarı bir çentik atılarak jel işaretlenmiştir. Dikkatli bir şekilde, yırtmadan çıkarılan jel, içerisine boyama çözeltisi (bkz. 3.6.1. h) bulunan plastik kaba konarak 1 gece çalkalayıcıda bekletilmiştir.

Boyanan jel, içinde yıkama çözeltisi (bkz. 3.6.1.g) bulunan başka bir kaba alınarak boya uzaklaştırılmıştır. Örneklerin molekül ağırlıkları, standart proteinler baz alınarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Fitaz Pozitif Bakterilerin Belirlenmesi

Bu çalışmada Türkiye'nin 30 farklı ilinden alınan toprak örneğinden 300 adet bakteri izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin *Bacillus* olup olmadığını belirlemek üzere biyokimyasal ve morfolojik testler yapılmış, bu testlerin sonucunda 236 adet bakterinin *Bacillus* sp. olduğu belirlenmiştir. *Bacillus* sp. suşları arasında 19 tanesinin 120. saat sonucunda, 6 tane zayıf açıklıkta çevresel hidrolitik zonlu (2-4 mm), 10 tane orta açıklıkta çevresel hidrolitik zonlu (5-8 mm), 3 tane geniş açıklıkta çevresel hidrolitik zonlu bölgelere (9-11 mm) sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu suşlar arasında en geniş zonu gösteren 2 adet suş seçilmiştir. Bunlardan 11 mm zonu gösteren *Bacillus* sp. suşu EBD 9-1 olarak ve 9 mm zon çapına sahip EBD 19-9 olarak adlandırılmıştır. Fitaz pozitif özellik gösteren izolatin besiyerindeki görüntüsü Şekil 4.1' de verilmiştir.



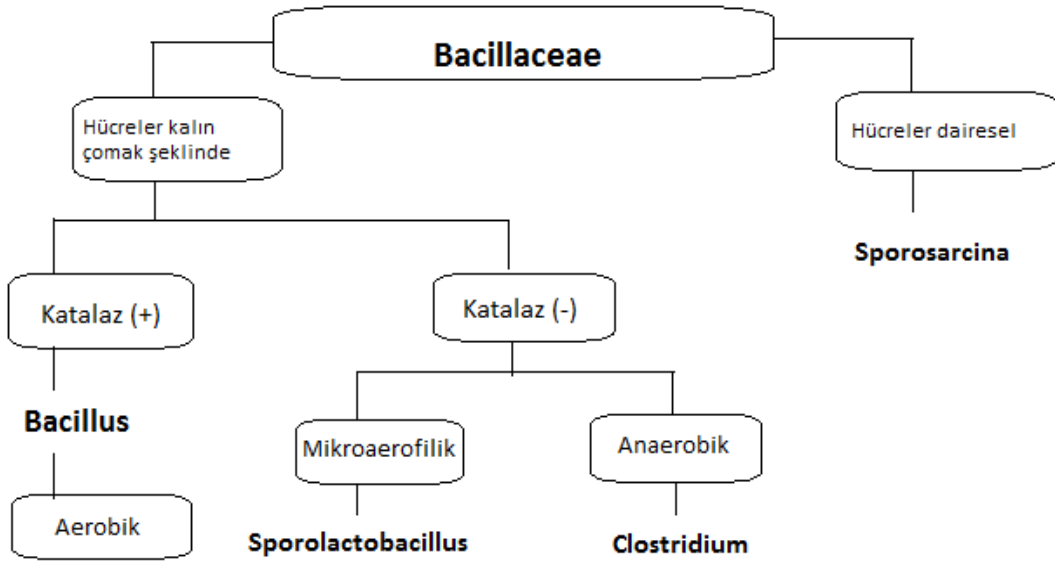
Şekil 4.1. Fitaz üreten *Bacillus* sp. EBD 9-1' in PSM ortamındaki görüntüsü

Çizelge 4.1. Fitaz pozitif bakterilerin zon çapları

Bakteri No	İller	Koloni Çapı (mm)	Zon Çapı (mm)
2-1	Bilecik	3,2	5
2-2	Bilecik	3,2	3,5
3-6	Kırklareli	2,8	3
4-8	Kayseri	2	2,2
5-4	Manisa	4	4,5
5-5	Manisa	3	3,1
9-1	Trabzon	7	11
9-9	Trabzon	2,8	3
10-8	Tunceli	4,2	6
14-3	Balıkesir	4,5	7,5
14-5	Balıkesir	5	6,5
14-6	Balıkesir	4,8	7,8
15-7	Hatay	6,5	8
15-9	Hatay	6,8	7,3
18-7	Bartın	6,2	6,5
19-4	Edirne	6,1	9
19-9	Edirne	5	9
23-1	Sivas	5,5	5,6
23-2	Sivas	5,1	8

4.2.Biyokimyasal ve Morfolojik Testler

Genel olarak *Bacillus* cinsini belirlemek amacıyla aşağıdaki tayin anahtarı kullanılmaktadır (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. *Bacillus* sp. izolatların taksonomik özellikleri (Buchanan ve Gibbons 1974).

4.2.1. Biyokimyasal testler

4.2.1.1.Katalaz testi

Katalaz bir enzim olup çoğunlukla aerobik mikroorganizmalar tarafından oluşturulurlar. Bu enzim ortamdaki hidrojen peroksiti (H_2O_2) su ve oksijene ayrıştırmaktadır. 3.2.3.2' ye göre yapılan katalaz testi sonunda, katı bakteri kültürlerine H_2O_2 damlatıldığında, serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlenmesi, hidrojen peroksitin ayrışmasını dolayısıyla da katalaz varlığını gösterdiğinden tüm bakteriler katalaz (+) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.3).



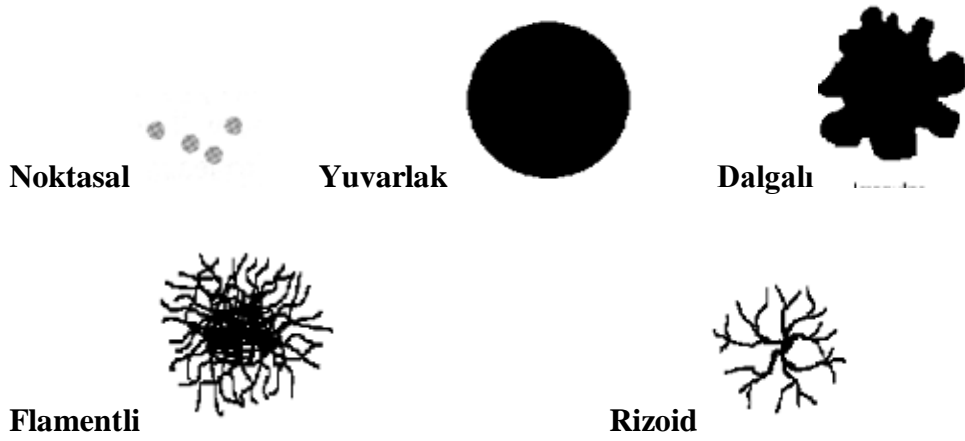
Şekil 4. 3. Belirlenen kolonilerde serbest oksijenin kabarcıklar halinde görünümü

4.2.2. Morfolojik testler

4.2.2.1.Koloni yapısı ve bakterilerin şekli

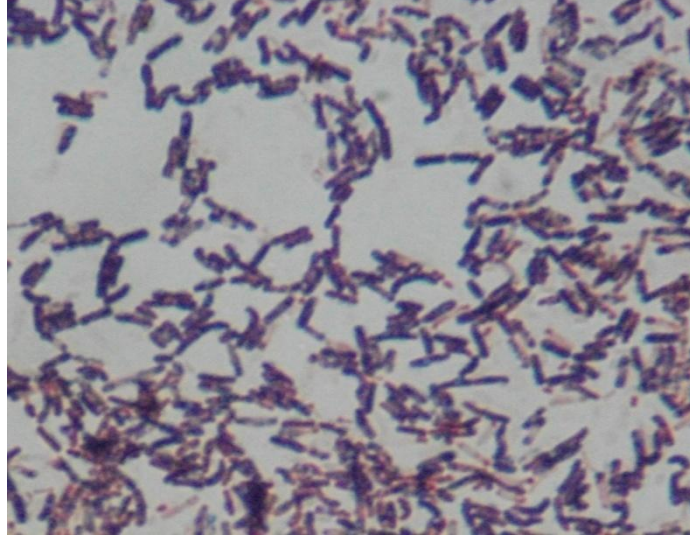
Bakteriler, farklı karakteristik koloni tiplerine sahiptirler (Şekil 4.4).

Koloni Tipleri



Şekil 4. 4. Bakteriyal koloni tipleri

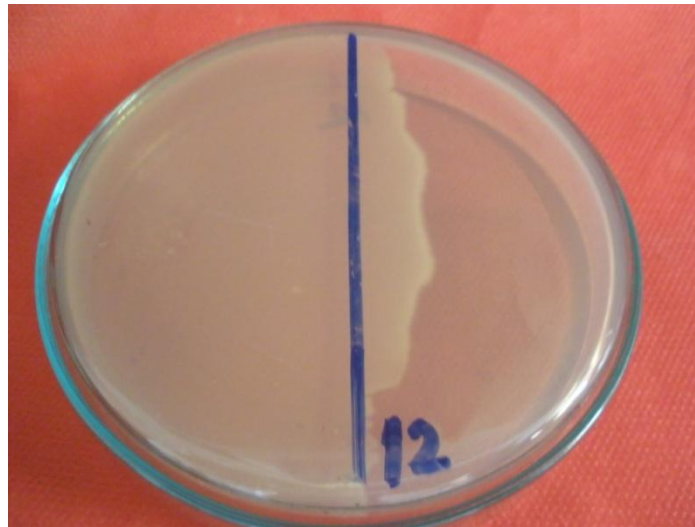
Çalışmamızda elde ettiğimiz bakterilerin noktasal, filamentli ve dalgali koloni tipi özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Mikroskopik incelemeler (Olympus CH-2) sonucunda ise bakterilerin hepsinin çubuk (basil) şeklinde olduğu görülmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. EBD 9-1 bakterisinin 100X objektifte görünümü (Olympus CH-2)

4.2.2.2.Hareketlilik testi

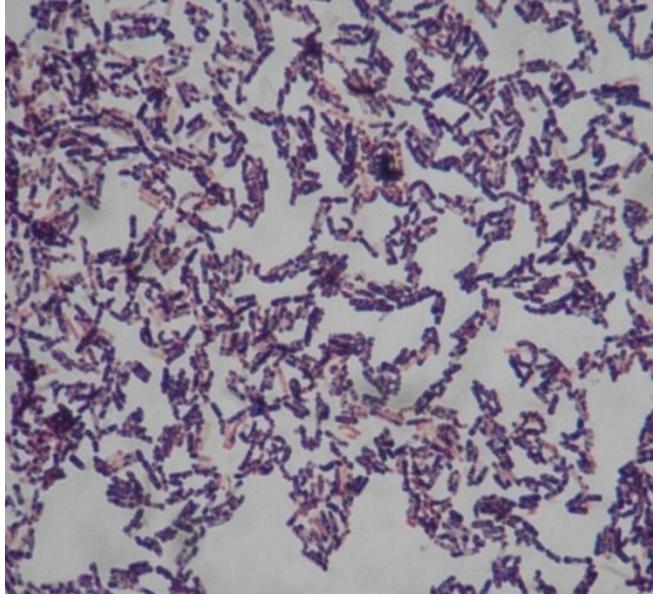
3.2.3.1' e göre yapılan hareketlilik testi sonucunda tüm bakterilerin hareketli (Şekil 4.6) olduğu belirlenmiştir (bkz. Çizelge 4.2).



Şekil 4. 6. Petri kutusundaki yumuşak agarlı besiyerinde hareketlilik kontrolü

4.2.2.3.Gram boyama

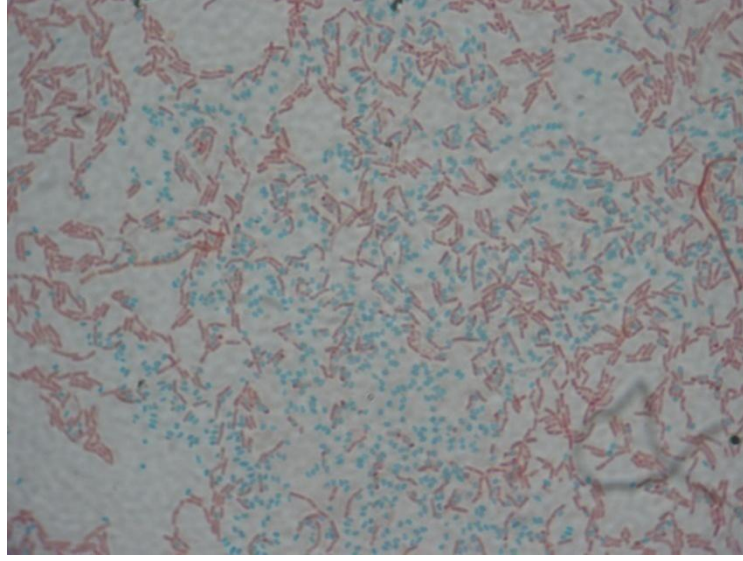
Bakterilerin tanımlanmasında önemli bir aşama olan gram boyama 3.2.2.3' e göre yapılmış olup, ilk boya olarak kullanılan kristal viyoleyi hücre içinde tutabilen bakteriler gram (+) olarak kabul edilmiş olup, denemeye alınan tüm bakteriler mor menekşe bir renk gösteren gram (+) olarak değerlendirilmişlerdir (Şekil 4.7).



Şekil 4. 7. Işık mikroskopunda bakterilerinin görünümü (100X)

4.2.2.4.Spor boyama

Spor oluşumu Bacillaceae familyasının tipik özelliğidir. Endospor oluşumu bu familyanın üyeleri olan *Bacillus* ve *Clostridium* cinsi bakterilerde görülmektedir. Denemeye alınan bakterilerde spor boyama 3.2.2.5' e göre yapılmış olup, tüm bakterilerin sporlu oldukları ve sporun hücre içindeki konumunun terminal (uç) bölgede olduğu saptanmıştır. İncelemeler Olympus CH-2 marka ışık mikroskopunda, 100X objektifte, immersiyon yağı ile yapılmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4. 8.Bakterilerin spor boyama sonrası görünümü (100X)

Yapılan biyokimyasal ve morfolojik testler sonucunda tüm bakterilerin *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonrasında zon çapları dikkate alınarak ayrılan 2 adet bakteri üreme eğrileri çıkarılmak üzere denemeye alınmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4. 2. *Bacillus* cinsinin belirlenmesinde kullanılan morfolojik testler ve test sonuçları

TESTLER	9-1	19-9
Koloni şekli	Dalgalı	Dalgalı
Şekil	Basil	Basil
Gram Boyama	+	+
Spor boyama	+	+
Endospor Pozisyonu	T	T
Hareketlilik	+	+

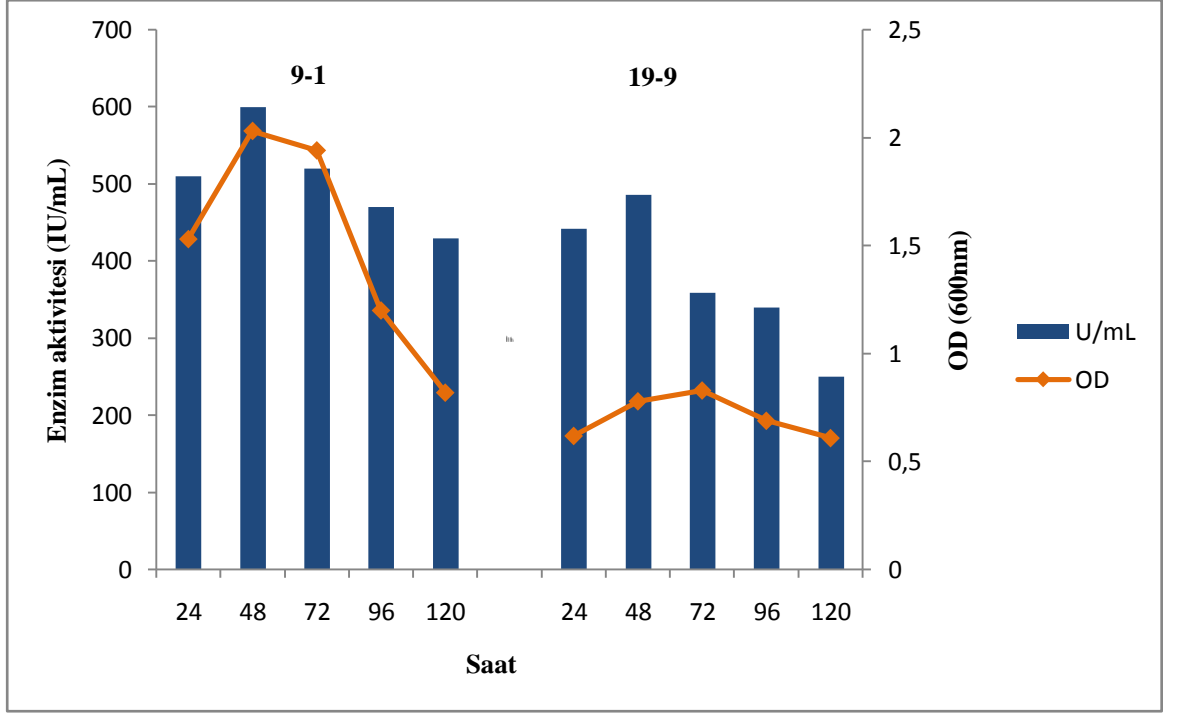
4.3.Maksimum Fitaz Üretim Ortamının Belirlenmesi

En geniş zonu gösteren *Bacillus* sp.EBD 9-1 ve *Bacillus* sp. EBD 19-9 suşlarından maksimum enzim üretimi amacıyla Çizelge 3.3 ve 3.4' te belirtilen besiyerleri kullanılarak üretilmiştir. 24, 48, 72 ve 96. saatlerde yapılan aktivite sonucuna göre Trabzon ilinden alınan topraktan izole edilen *Bacillus* sp. EBD 9-1'in en yüksek fitaz aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır (bkz. Çizelge 4.3 ve Şekil 4.9).

Zon çapı yüksek 2 bakterinin enzim aktivitelerinin karşılaştırılması sonucu, EBD 9-1 nolu bakterinin 48. saatte 600 U/mL ile maksimum aktiviteye ulaşırken, maksimum üremenin 48. saatte ($OD_{600} = 2,03$) olduğu saptanmıştır. Daha sonraki çalışmalarda *Bacillus* sp. EBD 9-1 bakterisi ile devam edilmiştir.

Çizelge 4.3.Fitaz içerikli besiyerinde üretilen zon çapı yüksek 2 bakterinin enzim aktivitelerinin karşılaştırılması

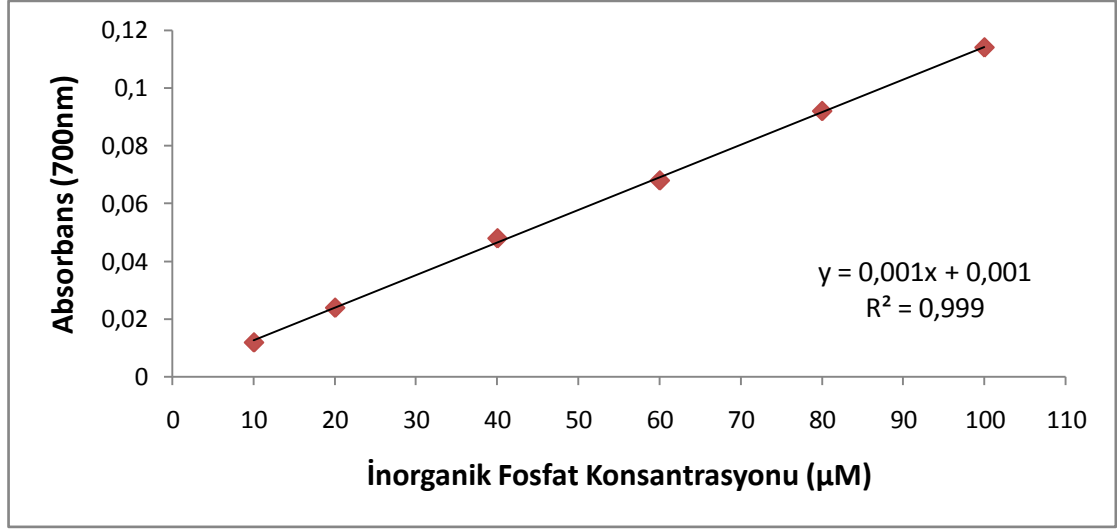
İnkübasyon Süresi	EBD 9-1		EBD 19-9	
	U/mL	OD ₆₀₀	U/mL	OD ₆₀₀
24. saat	510	1,53	442	0,62
48. saat	600	2,03	486	0,78
72. saat	520	1,94	359	0,83
96. saat	470	1,20	340	0,69
120. saat	430	0,82	250	0,61



Şekil 4.9. Zon çapı yüksek 2 adet bakterinin üreme ve enzim aktivitelerinin karşılaştırması.

4.4.İnorganik Fosfat Standart Grafiği ve Hazırlanışı

İnorganik fosfor miktarını saptamak için farklı konsantrasyonlarda (0-100 μM) standart KH_2PO_4 çözeltileri hazırlandı. İnorganik fosfor miktarı, daha önce tarif edildiği gibi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı absorban grafiği linear regresyon analiziyle çizilerek konsantrasyonu bilinmeyen örneğin inorganik fosfat konsantrasyonu, standart grafiğinden elde edilen doğru denkleminin formülünden hesaplandı (Şekil 4.10). Doğrunun denklemi $y = 0,0011x + 0,0014$, regresyon katsayısı $R^2 = 0,9995$ 'dir.



Şekil 4.10. İnorganik fosfat standart grafiği

4.5. Fitaz enziminin kısmi saflaştırılması

Enzimin saflaştırma işlemine geçilmeden önce *Bacillus* sp. EBD 9-1 suşu 3.2.5 ve 3.2.6'de belirttiği gibi üretilmiştir. Üretim sonrası süpernetant santrifügasyonla ayrılmış ve ham enzim çözeltisi olarak saflaştırma işlemlerinde kullanılmıştır. Ham enzim sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve ultrafiltrasyon işlemlerinden geçirilerek kısmi olarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma adımlarında elde edilen fraksiyonların aktivite ve protein tayinleri standart koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir. Standart proteinler kullanılarak enzimin molekül ağırlığı belirlenmiştir.

Kültür ortamı santrifüj edildikten sonra ham enzim içeren süpernatant amonyum sülfat çöktürme denemeleri için kullanılmıştır. Ham enzim için ayrı ayrı % 50, % 60, % 70, % 80 konsantrasyonlarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılarak enzimin en iyi çöktüğü % amonyum sülfat konsantrasyonu belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Buna göre % 70'lik çöktürmeden elde edilen enzimin aktivitesi 590 U/ml olup, diğer konsantrasyonlardaki çöktürmelerden yüksek olduğu için, bundan sonraki aşamalarda % 70'lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve elde edilen pellet 1 mM CaCl₂ içeren 20mM Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda 36 saat diyaliz edilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı Konsantrasyonlarda Amonyum Sülfat çöktürmesi

Fraksiyonlar	Enzim Aktivitesi (U/mL)
Ham enzim	600
%50	350
%60	570
%70	590
%80	550

Diyaliz sonrası yapılan aktivite tayinlerinde enzim % 4,9 ve 1.71 kez saflaştırılmıştır.

Diyalizat ultra filtrasyon (MW cut-off 30,000 ve 10,000) tüp ile santrifüj edilerek konsantre edilmiş ve enzim 2,06 kez saflaştırılmıştır (Çizelge 4.5). Kısmi olarak saflaştırılan enzim karakterize edilmiştir.

Çizelge 4.5. Fitaz enziminin saflaştırma basamakları.

Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim ¹ (%)	Saflık ² (Kez)
Ham Enzim	100	205,7	60000	291	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi (%70)	15	20,1	8850	440	14,8	1,51
Diyaliz	14	5,94	2940	497	4,9	1,71
Ultrafiltrasyon	10	2,5	1500	600	2,5	2,06

¹Verim, toplam aktivite üzerinden hesaplanmıştır.

²Saflık, spesifik aktivite üzerinden hesaplanmıştır.

4.6. Fitaz enziminin karakterizasyonu

Enzimin karakterize edilmesi amacıyla 3.2.6'da belirtildiği şekilde yapılan üretim sonucunda, santrifügasyonla ayrılan enzim çözeltisi ham enzim olarak elde edilmiş ve enzim sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, ultrafiltrasyon işlemlerinden geçirilerek kısmi olarak saflaştırılmıştır. Kısmi saf enzim çözeltisi üzerine sıcaklık, sıcaklık stabilitesi, pH ve pH stabilitesi ile farklı metal iyonlarının etkilerine bakılmıştır. Ayrıca kısmi olarak saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı jel elektroforez yöntemi (Laemmli 1974) ile tayin edilmiştir.

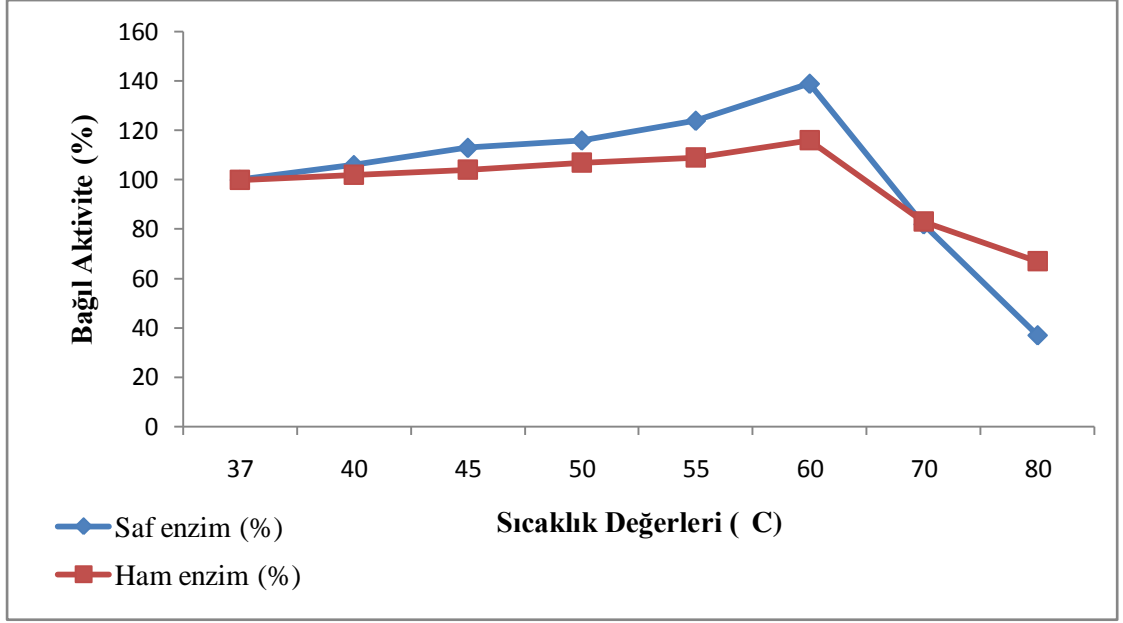
4.6.1. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Enzim üzerine sıcaklık derecelerinin etkilerini belirlemek üzere 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ve 80°C' lerde aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar kontrol olarak kullanılan sıcaklık derecesinden (37°C) elde edilen ve 100 olarak kabul edilen aktivite değerlerine göre % olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.6)

Çizelge 4.6. Fitaz enzimi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Ham Enzim (%)	Kısmi Saf enzim (%)
37 (kontrol)	100	100
40	102	106
45	104	113
50	107	116
55	109	124
60	116	139
70	83	82
80	67	37

Elde edilen sonuçlara göre saf enzimin 60°C' de maksimum aktivite gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.11). Kısmi olarak saflaştırılan enzimin aktivitesi ham enzime göre %20 artmıştır. Düşük ve yüksek sıcaklıklarda aktivite değerleri birbirine yakın bulunmuştur. Düşük sıcaklıklarda enzim daha stabil kalmıştır.



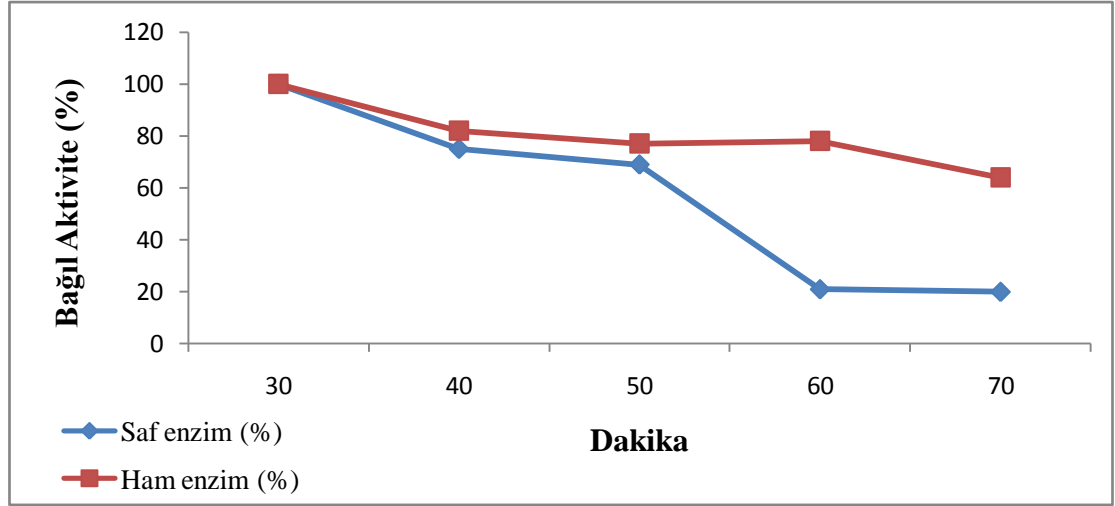
Şekil 4.11. Sıcaklığın ham ve kısmi saf enzim üzerine etkisi

4.6.2. Sıcaklık stabilitesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği 60°C' de enzim örneğinin stabilitesine bakılmış ve enzim çözeltisi su banyosunda 30, 40, 50, 60, 70 dakika süre ile tutulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre saf enzimin 30. dakikada maksimum aktivite gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.7). Sürenin artması ile hem ham hem de saf enzim aktivitesinde oransal bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.12). Ancak, saf enzim 60 dakikada %79 oranında aktivite kaybı saptanmıştır.

Çizelge 4.7. Sıcaklık stabilitesinin fitaz enzimi üzerine etkisi

60 C° (Dakika)	Ham Enzim (%)	Kısmi Saf enzim (%)
30 (kontrol)	100	100
40	82	75
50	77	69
60	78	21
70	64	20



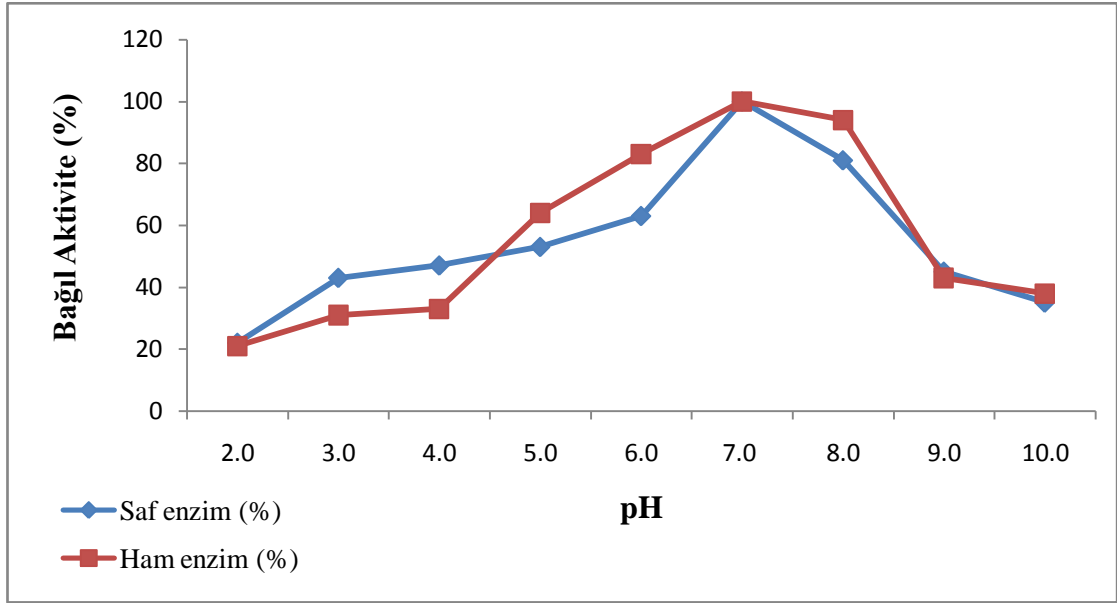
Şekil 4.12. 60°C’ de ham ve saf enzim stabilitesi

4.6.3. pH’nın ve pH stabilitesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi

Fitaz enziminin optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla enzim 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0 pH’larda hazırlanan substrat çözeltilerinde aktivite tayini yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sırasında kontrol olarak kullanılan pH’ da (7.0) elde edilen sonuçlar %100 olarak kabul edilmiş ve diğer sonuçlar buna göre % olarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.8 ve Şekil 4.13’de de görüldüğü gibi enzimin optimum pH değerlerinin 7.0 olduğu saptanmıştır. Enzimin asidik ortamdan ziyade alkali ortamda yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. Enzim üzerine pH etkisinin belirlenmesi

pH	Ham Enzim (%)	Kısmi Saf enzim (%)
2.0	21	22
3.0	31	43
4.0	33	47
5.0	64	53
6.0	83	63
7.0 (Kontrol)	100	100
8.0	94	81
9.0	43	45
10.0	38	35

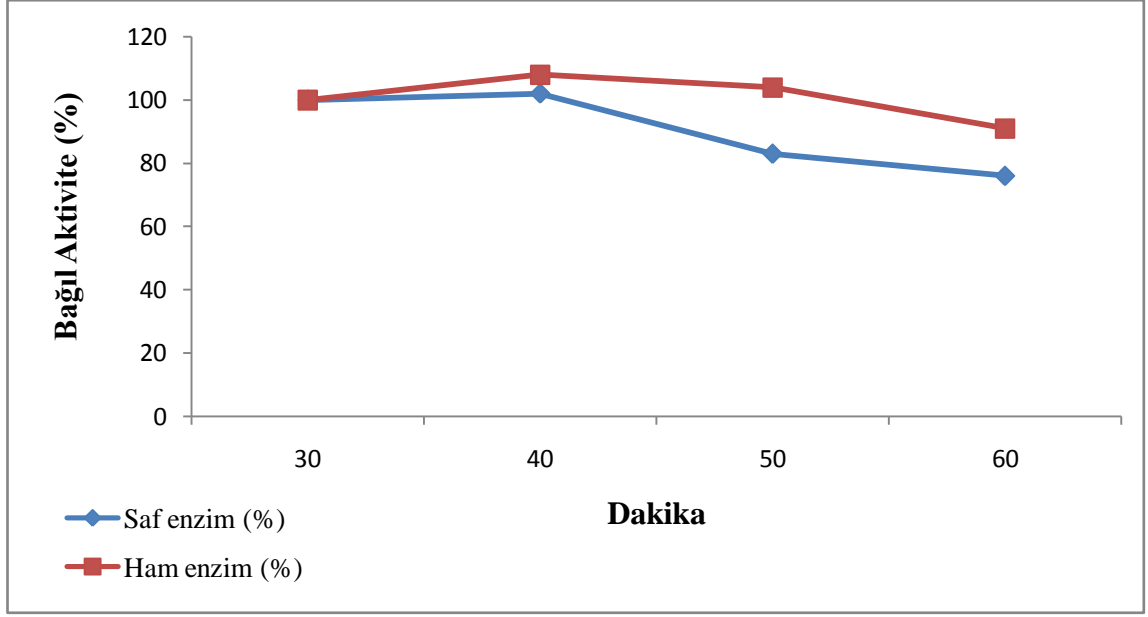


Şekil 4.13. pH'nın ham ve kısmi saf enzim üzerine etkisi

Çizelge 4.9'da görüldüğü gibi enzimin pH stabilitesini belirlemek amacıyla enzim pH 7.0'de 1 saat boyunca tutulmuş ve 1 saat sonunda saf enzim aktivitesini % 76 oranında koruduğu saptanmıştır (Şekil 4.14). Ham enzim ise 1 saat boyunca aktivitesini korumuştur.

Çizelge 4.9. pH stabilitesinin enzim üzerine etkisi

pH 7.0 (Dakika)	Ham Enzim (%)	Kısmi Saf enzim (%)
30 (Kontrol)	100	100
40	108	102
50	104	83
60	91	76



Şekil 4.14. pH 7.0 'de ham ve saf enzimin stabilitesi

4.6.4. Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi

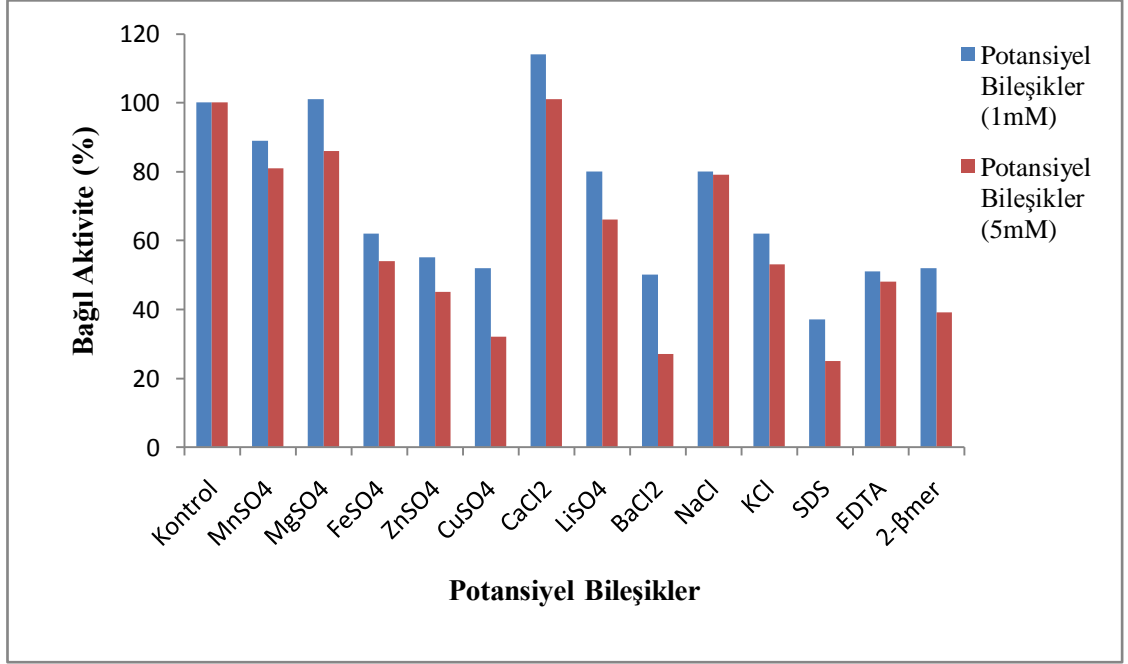
Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının, tuzların ve redükleyici bileşiklerin etkisini tespit etmek üzere enzim 1 ve 5 mM $MnSO_4$, $MgSO_4$, $FeSO_4$, $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $CaCl_2$, $LiSO_4$, $BaCl_2$, $NaCl$, KCl , SDS, EDTA, 2-merkaptotanol ile inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuçlar içerisinde hiçbir metal iyonu bulunmayan substrat çözeltisi ile elde edilen aktivite %100 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Potansiyel bileşiklerin enzim aktivitesi üzerine etkisi

	Ham Enzim		Kısmi Saf enzim	
	1mM (%)	5mM (%)	1mM (%)	5mM (%)
Kontrol*	100	100	100	100
MnSO ₄	115	94	89	81
MgSO ₄	120	97	101	86
FeSO ₄	51	43	62	54
ZnSO ₄	55	38	55	45
CuSO ₄	63	39	52	32
CaCl ₂	138	99	114	101
LiSO ₄	92	87	80	66
BaCl ₂	90	54	50	27
NaCl	92	83	80	79
KCl	96	86	62	53
SDS	25	23	37	25
EDTA	84	67	51	48
2-βmer	68	43	52	39

*Potansiyel bileşik içermemektedir.

Şekil 4.15'te görüldüğü gibi 1mM konsantrasyonundaki çeşitli potansiyel bileşiklerin enzim aktivitesini 5mM'a göre daha fazla arttırdığı tespit edilmiştir. Bununla beraber CaCl₂ ve MgSO₄ iyonlarının enzim aktivitesi üzerine aktivatör etki yaptığı, ancak diğer metal iyonlarının inhibitör etki yaptığı saptanmıştır. Özellikle SDS enzim aktivitesini güçlü olarak inhibe etmiştir.



Şekil 4.15. Çeşitli potansiyel bileşiklerin saf enzim üzerine etkileri

4.6.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

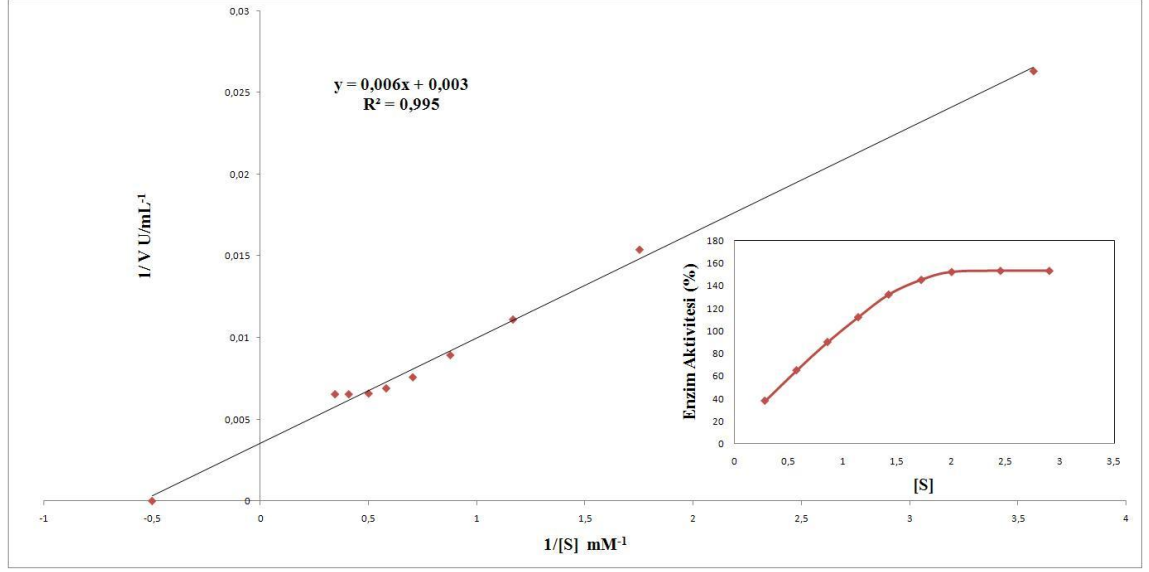
Fitaz aktivitesi üzerine substratın konsantrasyonunun etkisi saptamak amacıyla, 0.01-0,1 g arasındaki konsantrasyonlarda sodyum fitat optimum sıcaklık ve pH'da (37 °C ve pH 7.0) belirlenen inkübasyon süresinde ortama ilave edilerek enzim aktivitesi standart deney koşullarında ölçüldü (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Fitaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Substrat konsantrasyonu (gr)	Saf enzim (%)
0,01	25
0,02	38
0,03	58
0,04	75
0,05	84
0,06	94
0,07	100
0,08	98
0,09	94
0,1	92

Substrat konsantrasyonunun 0.01 g'dan 0,1 g'a kadar belli bir oranda artırılması ile enzim aktivitesinin kademeli olarak arttığı görüldü. Fitazın maksimum hızını (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitesini (K_m) saptamak için, $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ olarak Lineweaver-Burk $y = ax + b$ doğru grafiğinden yararlanıldı. Lineweaver-Burk grafiği, $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ olarak çizildi (Şekil 4.16). Bu grafikten elde edilen doğrunun denklemi ise, $y = 0,006x + 0,003$ olarak, tamamlayıcılık katsayısı (R^2) ise $R^2 = 0,995$ bulundu.

Denklemden doğrunun dikey eksenini kestiği nokta $1/V_{max} = 0,003$ değerini verdiği için, V_{max} değeri $333 U/mL$ olarak hesaplandı., K_m değeri $2mM$ olarak bulundu.



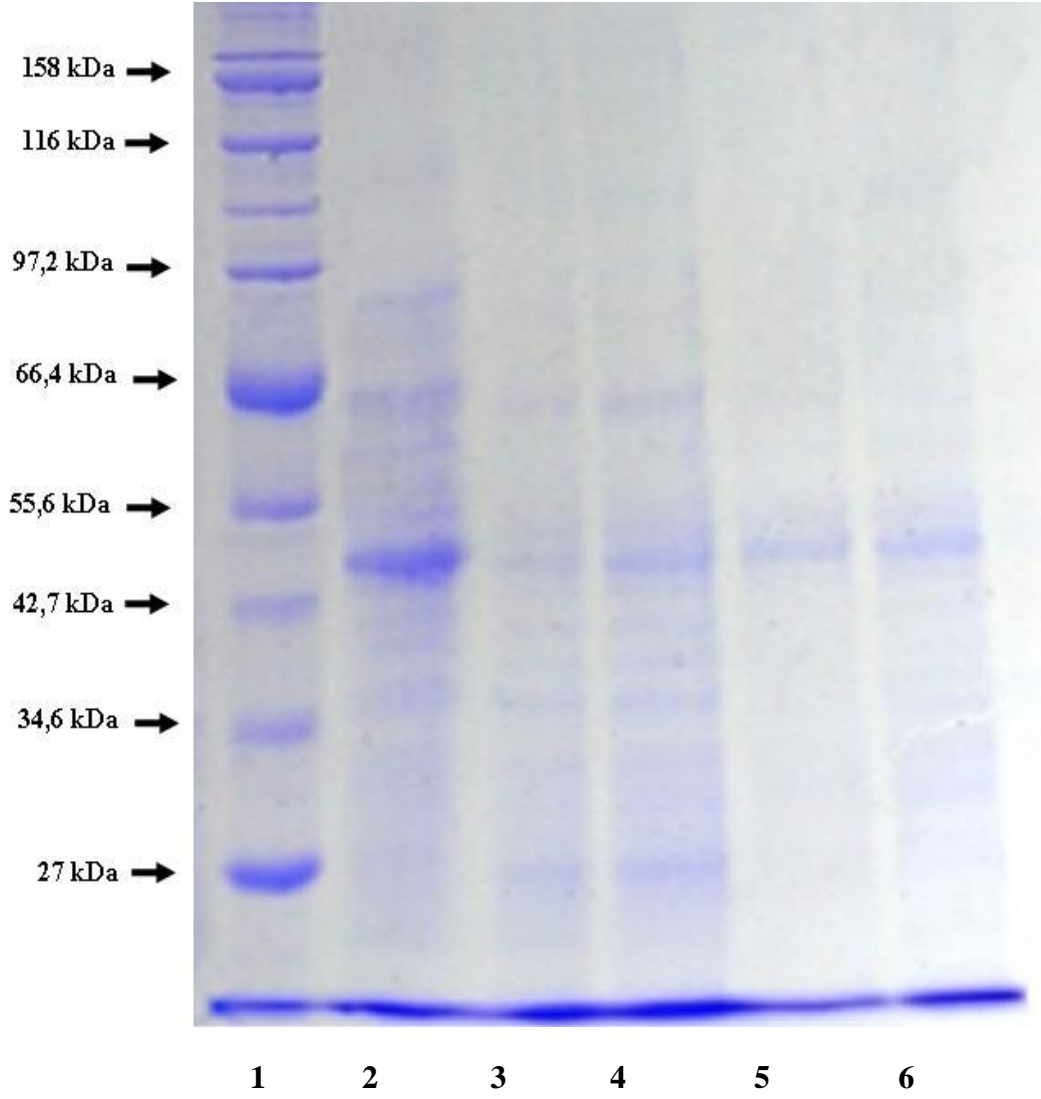
Şekil 4.16. Fitaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk grafiği ve Michaelis-Menten Grafiği)

4.7.Enzimin moleküler ağırlığının tespiti

Kısmi olarak saflaştırılan enzim örneğinin moleküler ağırlığını belirlemek amacıyla, elektroforez jeline enzim örneği yanında moleküler ağırlıkları bilinen standart protein çözeltisi de uygulanmış ve elektroforez işlemi sonucunda oluşan bandların (Şekil 4.17) Rf değerlerinden yararlanılarak aşağıda verilen formüle göre enzim ve standart protein çözeltisinin göreceli hareketlilik değerleri hesaplanmıştır.

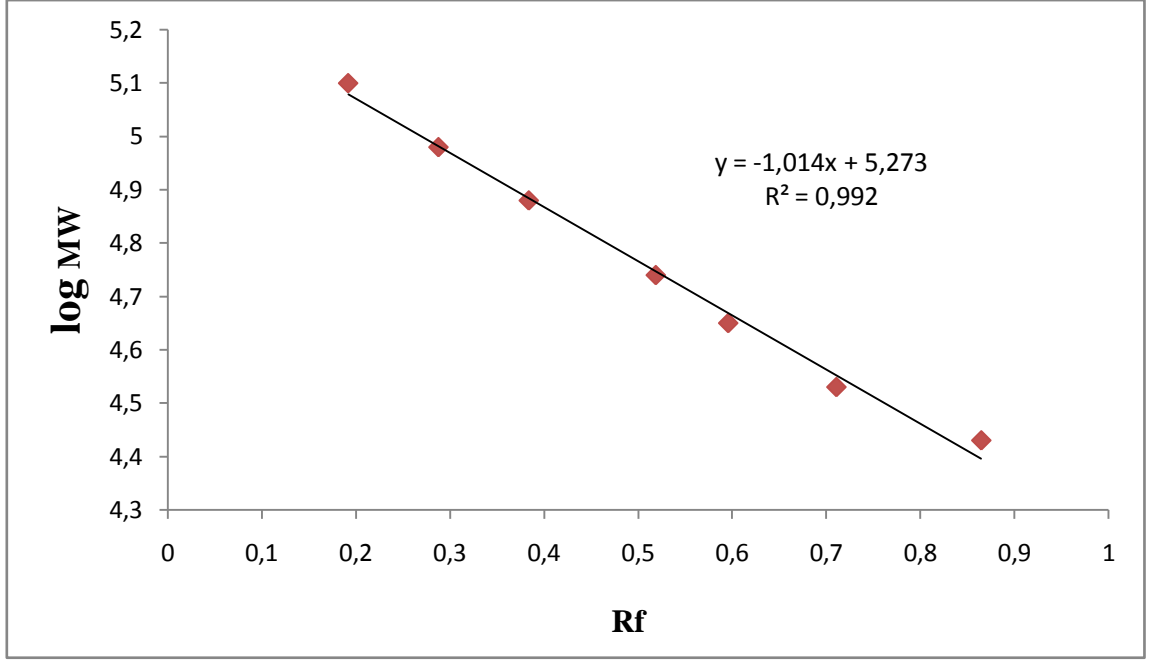
$$R_f = \text{Proteinin aldığı yol (cm)} / \text{İzleme boyasının aldığı yol (cm)}$$

Moleküler ağırlıkları bilinen standart proteinlerin göreceli hareketlilik değerleri ve molekül ağırlıkları ile bir standart eğri elde edilmiştir (Şekil 4.18). Elde edilen grafiğin analizi yapılarak, örneğin moleküler ağırlığı saptanmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi, diyalizat ve ultrafiltrasyonu sonucunda adım adım kısmi olarak saflaştırılan enzim örneğinin molekül ağırlığının aynı olduğu, Şekil 4.18'da görüldüğü gibi tek bir band halinde bir sırada yerleştiği saptanmıştır. Koyu band halinde görülen enzimin moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 45 kDa olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.17. SDS-PAGE sonrası elde edilen jelde protein bantlarının görünümü.

1. Marker **2.** Ham enzim **3.** Çöktürme pelet **4.** Diyaliz **5-6.** Ultrafiltrasyon



Şekil 4.18. Standart proteinlerin Rf değerleri ve moleköl ağırlıklarına göre oluşturulan standart eğri.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizma kaynaklıdır. Bunun nedeni mikroorganizma kökenli enzimlerin, bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, ekstrem koşullarda aktivite gösterebilmeleri ve büyük boyutlarda üretilebilmeleridir. Yüksek bitkilerin vakuollerde artık ürünler olarak, bir tür enzim inhibitörleri ve/veya toksik karakterli maddeleri depoladıkları bilinmektedir. Bitkilerden enzim elde edilmesi sırasında bu yapılar ürüne karıştıkları için, bitki enzimleri, endüstri ve klinikte enzim kaynağı olarak tercih edilmemektedirler (Wiseman 1987).

Her ne kadar mikrobiyal enzimlerin kullanımı için yukarıda belirtildiği gibi çok geçerli nedenler varsa da, her mikrobiyal enzim endüstriyel alanda kullanılmamaktadır. Endüstride kullanılan enzimlerin, bir ürünün üretilmesinde bazı avantajlara sahip olması gerekmektedir. Buna göre, bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilmesi maliyet bakımından ucuz olması, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olması ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmaması, yani güvenilir olmasına bağlıdır (Wiseman 1987).

Bugüne kadar 2000'den fazla enzim tanımlanmış ve bunlardan yaklaşık 100 tanesi ticari olarak kullanıma uygun bulunmuştur. Fakat günümüzde bunlardan sadece 18 tanesi endüstriyel amaçla üretilmektedir (Zeman ve McCrea 1985).

Biyoteknoloji kaynaklı çalışmalar Amerika Birleşik Devletlerinde çok fazla odaklanmış olmakla birlikte, günümüzde, Japonya ve Kanada, biyoteknolojiyi (özellikle moleküler biyoteknolojiyi) stratejik alan kategorisinde değerlendirerek, özel şirketlerin yanı sıra, hükümetler düzeyinde destekleme ve geliştirme kararı almışlardır (Glick ve Pasternak 2003).

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 dışındaki diğer ülkeler bu konuda tamamen dışa bağımlı durumdadırlar.

Endüstride faydalı olan ve ticari olarak kullanılan enzimlerin bazı avantajlara sahip olması gerekmektedir. Buna göre bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilmesi için, işlem maliyeti bakımından ucuz olması, fiziksel ve kimyasal koşullara bağlı olmadan aktivitesini en yüksek düzeyde koruması ve mümkün olan en uzun süreyle sürdürmesi, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olması, allerjik ya da toksik etkiye sahip olmaması, yani güvenilir olması gerekir (Sarıkaya 1995).

Fitazlar; (myo-inositol-hexakis fosfat fosfohidrolazlar) asit fosfataz enzimleridir; etkili olarak fitik asitten fosfatı ayırır ve myo-inositol ve inorganik fosfat oluştururlar (Mitchell ve ark. 1997).

Fitazlar son 15 yıldır biyoteknoloji, çevresel koruma, besin alanlarında hem bilim adamları hem de girişimcilerin ilgisini çekmektedir (Lei ve Stahl 2001).

Domuz ve kümes hayvanlarının basit yapıları midelerinden dolayı (Bitar ve Reinhold 1972), bu hayvanlar, yemlerinde kullanılan tohumlardaki fitat fosfatını kullanamazlar ve diyetlerine inorganik fosfat eklenmesi oldukça pahalıdır. Ayrıca diyetteki kullanılmamış fitat fosforu bu hayvanlar tarafından dışkı ile atılır ve bu da fosfor kirliliğine neden olur (Sweeten 1992). Hindistan'da hayvan yemlerine dikalsiyum fosfat (DCP) eklenmektedir ve fitazın %50-60 DCP'nin yerini aldığı görülmüştür. 10 kg DCP'nin 250 gr fitaz enzimine karşılık geldiği tahmin edilmektedir.

Bunların yanı sıra fitazlar, fitatların parçalanmasıyla oluşan spesifik ürünlerin ekonomik olarak üretimi için önemlidir. Fitazlar, myo-inositol-hexafosfat'ın sıralı hidrolizini gerçekleştirerek, myo-inositol fosfat üretimini sağlarlar (Greiner ve Konietzy 1993).

Son yıllarda endüstriyel öneminden dolayı hem bilim adamları, hem de girişimcilerin ilgisini çektiği için çalışmalarımızda fitaz enzimi üretimi amacıyla *Bacillus sp.* örnekleri izole edilerek, bunlardan en iyi sonucu veren sus kullanılmıştır.

Bu amaçla yapılan çalışmada Türkiye topraklarından toplam 300 adet bakteri izole edilmiştir. Bakterilerin *Bacillus* olup olmadığı Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology' e göre morfolojik ve biyokimyasal testler ile tespit edilmiştir. Testler sonucunda 236 adet bakteri *Bacillus* olarak saptanmıştır. Çalışmamızda bakterilerin fitaz üretip üretmediğini belirlemek için fitat içerikli ortamda yayma metodu kullanılmıştır.

236 bakteri içerisinde yüksek fitaz aktiviteli 19 adet *Bacillus* sp. seçilmiştir. Bu bakteriler arasından en geniş zon çapına sahip 2 adet suş *Bacillus* sp. EBD 9-1, EBD 19-9 suşu olarak adlandırılmıştır.

Yaptığımız izolasyon çalışmaları sonucunda en büyük zon gösteren 2 adet *Bacillus* sp.'lerin üreme ve enzim aktiviteleri sıvı üreme ortamında 24-72 saat boyunca takip edildiğinde *Bacillus* sp. EBD 9-1 suşunun diğerine göre daha verimli bir suş olduğu saptanmıştır. *Bacillus* sp. EBD 9-1' in üreme grafiği incelendiğinde maksimum enzim üretiminin durağan fazın ortasında olduğu saptanmıştır. Bu 48. saate denk gelmekte olup aktivite 600 U/mL olarak saptanırken bakteri üremesinin 48. saatte O.D2,03 olduğu gözlenmiştir.

Doğadan yeni fitaz potent *Bacillus* sp.lerin izolasyonu birçok araştırmacı tarafından kendi doğal kaynakları kullanılarak araştırılmıştır. Bunlardan Sreeramulu ve ark. (1996), *Lactobacillus amylovorus*'tan, Yoon ve ark. (1996) *Enterobacter* sp. 4'ten, In ve ark. (2004) *Pseudomonas fragi* Y9451 suşundan, Casey ve Walsh (2004) *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959 suşundan, Soni ve Khire (2007) *Aspergillus niger* NCIM 563 suşundan, Anastasio ve ark. (2010) *Enterococcus faecium* A86 ve *Lactobacillus plantarum* H5 suşundan ekstraselüler fitaz enzimi üretimini araştırmışlardır. Zuo ve ark. (2010) *Lactobacillus casei* suşunun ekstraselüler ve intraselüler fitaz enzimi ile ilgili çalışmalar rapor etmişlerdir.

Kerovuo (1998), 21 adet *Bacillus* sp. suşunu Na-Fitat içeren LB broth besiyerinde ve buğday kepeği içeren besiyerinde üretmiştir. LB broth'lu besiyerinde fitaz üretimi gözlenmezken, buğday kepeği içeren besiyerinde 2 *Bacillus* sp. suşunda fitaz aktivitesi saptanmıştır. En yüksek fitaz aktivitesi gösteren VTTE-68013 adlı bakteri çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

Priest (1977), maksimum enzim üretiminin logaritmik üreme fazının sonlarına doğru olduğunu ve artışın bir süre sonra durma fazında da devam ettiğini belirtmişse de, kendi yaptığımız ve diğer araştırmacıların çalışma sonuçları kıyaslandığında bunun her zaman geçerli olmadığını göstermektedir.

Choi ve ark. (2001), *Bacillus* sp. KHU-10'dan elde ettikleri fitaz enzimi üretiminin durgun fazın sonlarına doğru maksimum verime ulaştığını bildirmişlerdir. Bakterinin üremeye paralel olarak 72. saatte maksimum enzim aktivitesine ulaştığını tespit etmişlerdir.

Dechavez ve ark. (2011), *B. megaterium* ile fitaz üretimini 96 saatlik inkübasyon sonrası saptamışlardır. Sreedevi ve ark (2012), izole ettikleri bir *Bacillus* sp.'nin 72 saat üretimi sonucu maksimum fitaz verimi sağlamışlardır.

Sreeramulu ve ark. (1996), *Lactobacillus amylovorus* B4552 suşuna ait ekstraselüler fitaz aktivitesinin 125-146 U/ml aralığında olduğunu belirlemişlerdir. Raghavendra ve Halami (2009), *Pediococcus pentosaceus* CFR R38 ve CFR R35 suşlarına ait intraselüler fitaz aktivitesinin sırasıyla 213 U/ml, 89 U/ml olduğunu saptamışlardır. Anastasio ve ark. (2010), *Enterococcus faecium* A86 suşunun ekstraselüler fitaz aktivitesini 0.74 U/mL, *Lactobacillus plantarum* H5 ekstraselüler fitaz aktivitesini ise 0.71 U/mL olarak bulmuşlardır. Fu ve ark. (2011) 12 izolat elde etmişler ve bu izolatlardan *B.licheniformis* ZJ-6 suşundan en yüksek fitaz aktivitesini 0.1511 U/mL olarak saptamışlardır.

Nabil ve ark. (2013), *B. subtilis* MJA adlı bakteride yaptıkları çalışmada maksimum fitaz üretiminin inkübasyondan 96 saat sonra (720 U/ml) belirlemişlerdir. Lata ve ark. (2013) *Aspergillus heteromorphus* MTCC 10685 suşundan logaritmik fazın sonu olan 120 saatte maksimum fitaz aktivitesini (17.88 U/mL) elde etmişlerdir. Singh ve ark. (2013) yeni izole ettikleri *Bacillus subtilis* DR6 suşundan maksimum fitaz üretimini logaritmik fazın sonu olan 72. saatte 378 U/mL olarak elde etmişlerdir.

Çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz verimli suş olan *Bacillus* sp. EBD 9-1'den fitaz enzimini saflaştırmak amacıyla, sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve ultrafiltrasyon ile kısmi olarak saflaştırma yapılmıştır. Kısmi saf enzim üzerine sıcaklık ve stabilitesi, pH ve stabilitesi, çeşitli potansiyel bileşiklerin etkileri araştırılmış, enzimin Km ve Vmax değerleri saptanmış, molekül ağırlığı belirlenerek enzim karakterize edilmiştir. Enzim %2,5 verimle, 2.06 kez saflaştırılmıştır.

Sıcaklık ve pH enzimlerin aktiviteleri üzerinde oldukça önemli olan parametrelerdir. Her enzimin optimum aktivite gösterdiği bir sıcaklık ve pH değeri vardır. Bu değerlerin

bilinmesi enzimin endüstriyel alanlarda kullanılıp kullanılmayacağı hakkında da bir fikir vermektedir.

Yapılan çalışma sonuçlarına göre, *Bacillus* sp. EBD 9-1 bakterisinin ürettiği fitaz enzimi için optimum sıcaklık değeri 60°C olarak saptanmıştır. Enzimin termostabil karakterde olduğu düşünülmektedir. Kısmi olarak saflaştırılan enzimin aktivitesi ham enzime göre %20 oranında korunmuştur. Düşük ve yüksek sıcaklıklarda aktivite değerleri birbirine yakın bulunmuştur. Düşük sıcaklıklarda enzim daha stabil kalmıştır. Enzimin düşük sıcaklıklarda stabil kaldığı El-Toukhy ve ark. (2013) tarafından da *Bacillus subtilis* MJA için rapor edilmiştir.

Enzimin optimum pH değeri ise 7.0 olarak belirlenmiştir. Enzimin asidik ortamdan ziyade alkali ortamda yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla, enzimin alkali pH değerlerinde aktifliğini koruması sebebiyle, enzim alkalofilik bir enzim olarak belirlenmiştir. Çalışmamıza uygun olarak *Bacillus* sp. fitazlarının alkalik β-pervane fitazı (BPP) içinde yer aldığı rapor edilmiştir (Kerovuo ve ark. 1998, Kim ve ark. 1998).

Yoon ve ark. (1996), *Enterobacter* sp. 4 suşundan izole edilen fitazın optimum aktivite sıcaklığını 50-60°C, Zamudio ve ark. (2001), *Lactobacillus plantarum*'dan izole ettikleri fitazın optimum aktivite sıcaklığını 65°C, Choi ve ark. (2001) Topraktan izole edilen *Bacillus* sp. KHU-10 adını verdikleri bakteri üzerine yaptıkları incelemelerde, 10 mM CaCl₂ varlığında fitaz aktivitesinin optimum pH değerinin pH 6.0-9.5 arasında olduğu, sıcaklık değerinin ise 60°C olduğu belirtilmiştir.

Kim ve ark. (2003), *Citrobacter braakii* YH-15'den izole ettikleri fitazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 50°C olup 55°C'de aktivitenin önemli ölçüde düştüğünü saptamışlardır.

Casey ve Walsh (2003), *Aspergillus niger* ATCC 9142'den saflaştırdıkları enzimin optimum sıcaklığını 65°C, optimum pH'sını ise 5.0 olarak rapor etmişlerdir.

De Angelis ve ark. (2003), *L. sanfranciscensis* CB1'den izole edilen fitazın optimum aktivite sıcaklığını 45°C, In ve ark. (2004), *Pseudomonas fragi* Y9451 suşundan izole edilen fitazın optimum aktivite sıcaklığını 70°C, Seo ve ark (2005), *Aeromonas* sp. LIK

1-5'den izole ettikleri fitazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 50°C olup 60°C'de aktivitenin önemli ölçüde düştüğünü saptamışlardır.

Martha Guerrero-Olazarán ve ark. (2010), *B. subtilis* VTTE-68013 adlı bakterinin buğday kepeği içeren ortamda 120 saatlik üremesi sonucu maksimum fitaz aktivitesi gösterdiğini ve aktivitenin 18.5 U/ml olduğunu belirtmişlerdir. Bunun yanında fitaz enziminin optimum pH aralığının pH 6.0-9.0 olduğu, sıcaklık değerinin ise 60-95°C arasında olduğunu saptamışlardır.

Zuo ve ark. (2010), *Lactobacillus casei*'den izole ettikleri fitazın optimum aktivite sıcaklığını 70°C olarak belirlemişlerdir.

Lan (2011), yaptığı çalışmada *Mitsuokella jalaludinii* bakterisinden elde ettiği fitaz enzimini saflaştırmış ve karakterize etmiştir. Optimum pH değerini 4.0-5.0 aralığında bulurken, optimum sıcaklık değerini 55-60°C aralığında tespit etmiştir.

Sasirekha ve ark. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* p6'den elde ettikleri fitaz enzimini amonyum sülfat ve diyaliz ile kısmen 2.2 kez saflaştırmışlar ve saf enzimin optimum sıcaklık ve pH'sını sırasıyla, 37°C ve 6.0 olarak bulmuşlardır.

Ekren (2013), *Aspergillus niger* UA-D suşundan ekstraselüler fitaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE Sefaroz CL-6B ve Fenil Sepharoz CL-4B işlemlerini uygulayarak % 2.6 verimle 73 kat saflaştırmıştır. Enzimin maksimum aktivitesini pH 3.0 ve 70°C'de saptamışlardır.

Sreedevi ve Reddy (2013), topraktan izole ettikleri *Bacillus subtilis* C43 suşundan fitaz enzimini 8.7 kez saflaştırmışlar, enzimin optimum sıcaklığını 55°C'de ve pH'sını 5 olarak rapor etmişlerdir. Enzim 70°C'nin altında aktivitesini tamamen kaybetmiştir.

El-Toukhy ve ark. (2013), *B. subtilis* MJA'dan saflaştırdıkları fitaz enzimini karakterize ederek, optimum sıcaklık ve pH değerini sırasıyla 37°C ve pH 5.0-6.0 olarak belirlemişlerdir. Bununla birlikte enzimin düşük sıcaklıklarda da aktivitesini koruduğu ve geniş bir pH aralığına sahip olduğunu saptamışlardır.

pH değişimleri enzimlerin konformasyonunda değişikliğe yol açmaktadır, çünkü enzimler farklı pH'larda değişik iyonik gruplar oluştururlar (Cheetham 1995). Bu da bize, farklı pH'larda enzim aktivitesinin neden büyük değişiklikler gösterdiğini

açıklamaktadır (Sarkar ve ark. 1998). Mao ve ark. (1992) ise enzim üretiminin sıcaklık ve pH değerleri ile belirlenip, kontrol edilebileceğini saptamışlardır.

Görüldüğü gibi literatürlerde *Bacillus* türlerinden elde edilen fitazlar ile ilgili çok çeşitli sonuçlar bildirilmektedir ve bu da bize *Bacillus* türlerinin çok çeşitli özelliklerde fitazlara sahip olduklarını göstermektedir.

Bazı enzimlerin aktivite gösterebilmesi için ortamda mutlaka metal iyonlarının bulunması gerekmektedir. Metal varlığında aktivite gösteren enzimlere ise metallo enzimler adı verilmektedir. Endüstride kullanılan önemli enzimlerin çoğu birer metallo enzimdir. Fitaz da bir metallo enzim olduğundan dolayı en iyi aktivite gösterdiği metal iyonunu belirlemek üzere bir çalışma yapılmıştır. Tarafımızdan modifiye edilen ortamda üretilen fitaz enziminin karakterize edilmesi amacıyla, kısmi saflaştırılmış fitaz enzimi üzerine 1mM ve 5mM MnSO₄, MgSO₄, FeSO₄, ZnSO₄, CuSO₄, CaCl₂, LiSO₄, BaCl₂, NaCl, KCl, SDS, EDTA, 2-merkaptotanol metal iyonlarının etkilerine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre. 1mM konsantrasyonundaki çeşitli potansiyel bileşiklerin enzim aktivitesini 5mM'a göre daha fazla arttırdığı tespit edilmiştir. Bununla beraber CaCl₂, MgSO₄ ve MnSO₄ iyonlarının enzim aktivitesi üzerine aktivatör etki yaptığı, ancak diğer metal iyonlarının inhibitör etki yaptığı saptanmıştır. Özellikle SDS enzim aktivitesini güçlü olarak inhibe etmiştir.

Choi ve ark. (2001), *Bacillus* sp. KHU-10'dan enzim aktivitesinin EDTA ve Ba⁺², Cd⁺², Co⁺², Cr⁺², Cu⁺², Hg⁺², Mn⁺² gibi metal iyonları tarafından inhibe edildiğini tespit etmişlerdir.

Casey ve Walsh (2003), *Aspergillus niger* ATCC 9142 suşundan elde ettikleri fitazın aktivitesi üzerine Mg⁺², Mn⁺², Cu⁺², Cd⁺², Hg⁺², Zn⁺² ve Fiyonlarının kısmen stimule ettiğini, Ca⁺² iyonu ile kısmen inhibe olduğugörülmüştür

In ve ark. (2004), *Pseudomonas fragi* Y9451 suşundan üretilen fitazın 5 mM CaCl₂ ile %83, FeCl₂ ile %29, NiCl₂ ile %78, MgCl₂ ile %98, CoCl₂ ile %65, CuCl₂ ve ZnCl₂ ile %20 oranında, 10 mM CaCl₂ ile %16, FeCl₂ ile %22, NiCl₂ ile %37, MgCl₂ ile %59, CoCl₂ ile %33, CuCl₂ ile %11, ZnCl₂ ile %13 oranında aktivitesini koruduğunu saptamışlardır. Bu kimyasalların aksine enzimin 5 mM EDTA'da %130, 10 mM EDTA'da %171 oranında aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuca benzer olarak Tran ve ark. (2010), *Bacillus* sp. MD2 adlı bakteriden elde ettikleri fitaz enzimi üzerine çeşitli metal iyonlarının etkilerine baktıklarında, Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ba^{+2} varlığında yüksek aktivite gösterdiğini belirtirken, Cu^{+2} , Co^{+2} , Sn^{+2} varlığında enzimin inhibe olduğunu belirtmektedirler.

Lan (2011), Yaptığı çalışmada *Mitsuokella jalaludinii* bakterisinden elde ettiği fitaz enzimini saflaştırmış ve karakterize etmiştir. Bununla beraber Cu^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} ve Fe^{+3} metal iyonlarının enzim aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ettiğini ancak, Ba^{+2} , Mn^{+2} ve Ca^{+2} gibi metal iyonlarının enzim aktivitesini önemli ölçüde arttırdığını saptamıştır.

Sreedevi ve Reddy (2013), *B. subtilis* C43'den elde ettikleri fitaz enzimine çeşitli metal iyonlarının etkisini araştırdıklarında, Ca^{+2} , Na^{+} , Cu^{+2} , K^{+} , Co^{+2} , Ni^{+2} varlığında enzim aktivitesini stimüle ettiğini ancak Mg^{+2} , Fe^{+2} ve Mn^{+2} varlığında enzimin inhibe olduğunu, özellikle EDTA'nın enzim aktivitesini yüksek oranda (%55) azalttığını tespit etmişlerdir.

El-Toukhy ve ark. (2013), *B. subtilis* MJA'dan saflaştırdıkları fitaz enzimi üzerine iki değerli metal iyonlarının etkisine bakmışlardır. Cu^{+2} ve Fe^{+2} gibi katyonların fitaz aktivitesi üzerinde bir inhibisyon etkisi olduğunu, ancak Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi katyonların doza bağımlı olarak enzim aktivitesini arttırdığını tespit etmişlerdir.

K_m ve V_{max} enzimin en önemli kiteniksel özelliklerini göstermektedir. Bunlar enzimin belli bir substart ile ne kadar çabuk doyuma ulaştığı (K_m) ve ulaşabildiği en hızlı (V_{max}) reaksiyondur. Bu özelliklerinin bilinmesi bir enzimin hücre içinde ne yaptığını ve o şartlardaki değişikliklere nasıl tepki verdiği hakkında fikir vermektedir. K_m değeri düştükçe enzimin substarına olan ilgisi artmaktadır. Dier yandan K_m değeri arttıkça enzimin substarata olan ilgisi ise düşmektedir. Kısmi saflaştırdığımız fitaz enziminin V_{max} ve K_m değerini bulmak için yapılan çalışmalarda, Lineweaver-Burk grafiğine göre maksimum enzim hızı V_{max} 333 U/mL, K_m değeri ise 2 mM olarak bulunduğumuzdur. K_m değerinin düşük olması, yeni izolattan elde ettiğimiz fitaz enziminin substarına ilgisinin fazla olduğunu göstermektedir. Farklı araştırmacılar da farklı mikroorganizmalardan elde ettikleri fitazın V_{max} ve K_m değerlerine bakmışlar ve farklı sonuçlar elde etmişlerdir.

Casey ve Walsh (2003), *Aspergillus niger* ATCC 9142'den ürettikleri ve saflaştırdıkları enzimin K_m değeri 100 μ M ve V_{max} değeri 7 nmol/s olarak kaydedilmiş olup, bu değerler

mikrobiyal fitazlar için daha önce bildirilen değerlerin aralığında düşüldüğünü göstermiştir.

Vats ve ark. (2005), *Aspergillus niger* bakterisinden ürettikleri ve saflaştırdıkları fitaz enziminin kinetik değerlerine bakmışlar, V_{max} ve K_m kinetik değerleri sırasıyla 1,074 IU/mL, 606 mM olarak belirlemişlerdir.

El-Toukhy ve ark. (2013), *B. subtilis* MJA'dan saflaştırdıkları fitazı enziminin Saf enzimin kinetik değerlerine bakılmış ve V_{max} ve K_m kinetik değerleri sırasıyla 510 U/mg, 0,485 mM olarak belirlemişlerdir.

Ekren (2013), Fitaz enziminin fitik asit için K_m değerini 180 μ M ve V_{max} değerini 54.35 U/mL olarak saptamıştır.

Yaptığımız çalışmada *Bacillus* sp. EBD 9-1'den izole ettiğimiz ve kısmi olarak saflaştırdığımız fitaz enziminin SDS-PAGE analizi sonucu tek band elde edilmiştir ve moleküler ağırlığı 45 kDa olarak saptanmıştır.

Liu ve ark. (1998) fitazın moleküler ağırlığının organizma türlerine bağlı olarak 35-700 kDa arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Tambe ve ark. (1994) *Klebsiella aerogenes* fitazının moleküler ağırlığının 700 kDa; Greiner ve ark. (1997) *Klebsiella terrigena* fitazının moleküler ağırlığının 40 kDa olduğunu bulmuşlardır. Shimuzi (1992) *Bacillus subtilis*'e ait fitazın moleküler ağırlığının 38 kDa olduğunu rapor etmişlerdir. Powar ve Jagannathan (1982) Yaptıkları çalışmada, *Bacillus subtilis*'den izole ettikleri fitazda birbirine yakın iki protein bandı bulmuşlardır. Her iki bandın da fitaz aktivitesi verdiğini görmüşlerdir. Bu iki izozimin bakteri tarafından üretilebileceğini düşünmüşlerdir. Kim ve ark. (1998) *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından üretilen fitazın 44 kDa olduğunu tespit etmişlerdir. Choi ve ark. (2001), *Bacillus* sp. KHU-10'dan saflaştırdıkları fitaz enziminin 46 ve 44 kDa olduğunu bildirmişlerdir.

Casey ve Walsh (2003), *Aspergillus niger* ATCC 9142'den üretilmiş ekstraselüler fitazı, ilk aşamada ultrafiltrasyon, ileri ki aşamalarda iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon adımlarını izleyerek saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış enzim, monomerik bir protein olup 84 kDa moleküler ağırlığına sahip olduğu bulunmuştur.

Kim ve ark (2003), *Citrobacter braakii* YH-15 suşundan izole ettikleri enzimin SDS-PAGE jelinde moleküler ağırlığının 47 kDa, Seo ve ark. (2005), *Aeromonas* sp. LIK 1-5 suşuna ait fitaz enziminin moleküler ağırlığının 44 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Shamna ve ark. (2012) yeni izolat *Bacillus subtilis* fitazının elektroforetik analiz sonucu moleküler ağırlığını yaklaşık olarak 40 kDa olarak belirlemişlerdir..

Ekren (2013), *Aspergillus niger* UA-D suşundan ekstraselüler fitaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE Sefaroz CL-6B ve Fenil Sepharoz CL-4B işlemlerini uygulayarak % 2.6 verimle 73 kat saflaştırmıştır. SDS-PAGE elektroforezinde tek bant elde edilmiş ve moleküler ağırlığını 65 kDa olarak hesaplamıştır.

El-Toukhy ve ark. (2013), *B. subtilis* MJA'dan saflaştırdıkları fitazı enziminin molekül ağırlığını 38 kDa olarak belirlemişlerdir

Görüldüğü gibi, fitazları moleküler ağırlıkları açısından genellemek oldukça zor olmaktadır. Aynı türün farklı varyeteleri içerisinde, farklı molekül ağırlığına sahip fitazlar olabildiği gibi, farklı türlerde aynı molekül ağırlığına sahip fitazlar da saptanmıştır.

Sonuç olarak, kendi kaynaklarımızdan yeniizole edilen ve *Bacillus* sp. EBD 9-1 olarak adlandırdığımız bakteriden yüksek verimde enzim üretimi sağlamış olup, enzim karakterize edilmiştir. Enzimim optimum sıcaklığı ve pH'sı sırasıyla, 60 °C ve 7.0 olarak saptanmıştır. Enzim Ca^{+2} varlığında daha aktif olduğu belirlenmiştir. K_m ve V_{max} 'ı sırasıyla 2 mM, 333 U/mL bulunmuştur.

Moleküler ağırlığı ise 45 kDa olarak tespit edilmiştir. Enzim literatürdeki diğer yeni izole edilen *Bacillus* sp.'den elde edilen fitaz enzimi ile karşılaştırıldığında aktivitesinin yüksek olması, ayrıca sıcaklık ve pH stabilitesinin de yüksek olması, K_m değerinin düşük olması sebebi ile enzimin çeşitli endüstriyel alanlarda kullanım olanakları bulacağı mümkün gözükmektedir. Dünyada olduğu gibi, Türkiye'de de enzim kullanımı her geçen gün artmaktadır. Bu proje kapsamında elde edilen fitaz enzimi, yem endüstrisi tarafından kullanılan ve her geçen gün kullanım oranı artan bir enzimdir. Çalışma sonucunda elde edilen yeni izolat *Bacillus* sp. EBD 9-1 fitaz enziminin hayvan yemi katkı maddesi olarak kullanılabilirliği olabilir. Bu amaçla, fitaz enzimi U.Ü. Veteriner

Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı'nda kanatlı rasyonlarına katılarak enzimin yemlerde kullanılabilirliği araştırılacaktır. Böylece dış ülkelerden satın alınan fitaz enziminin ülkemizde geniş çapta üretilmesi ve böylece ülke ekonomisine katkıda bulunması mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Aehle, W., 2004.** Enzymes in Industry Production and Application. Wiley-VCHVerlag, Weinheim, 484s.
- Anastasio, M., Pepe, O., Cirillo, T., Palomba, S., Blaiotta, G., Villani, F., 2010.** Selection and Use of Phytate-Degrading LAB to Improve Cereal-Based Products by Mineral Solubilization During Dough Fermentation. Journal of Food Science, Vol. 75, Nr. 1.
- Anonymous, 2001.** Enzymes a Primer on Use and Benefits Today and Tomorrow. 1800 Massachusetts Avenue, N.W. Second Flor Washington, DC 20036. s.1-34.
- Anonymous, 2009.** <http://www.danisco.com/animalnutrition>
- Anonymous, 2011.** <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030f.html>
- Anonymous, 2014.** <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-phytase.html>,2014).
- Arıkan, B., Gözükar, F., 2012.** Isolation Of Thermopilic *Bacillus* sp., Production, Characterization And Determination Of Biotechnological Application Of Lichenase (β -1,3 And 1,4 Glucanase). *Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, Cilt (27-5): 121-122.
- Ası, T. 1999.** Tablolarla Biyokimya Cilt 2. Ankara.
- Atasagünil, M. 1965.** Enzimler. Güzel İstanbul Matbaası, Ankara
- Ayhan, K. 2000.** Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını, 43-44. Sim Matbaacılık Ltd. Ankara.
- Bhandari, M.R., Kawabata, J. 2004.** Assessment of antinutritional factors and bioavailability of calcium and zinc in wild yam (*Dioscorea* spp.) tubers of Nepal. Food Chemistry, 85: 281-287.
- Billington, D.C. 1993.** The Inositol Phosphates. Chemical Synthesis and Biological Significance, Verlag Chemie, Weinheim.
- Bitar, K., Reinhold, J.G. 1972.** Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf, and man. **Biochemica Biophysica Acta**, 268: 442-452.
- Buxbaum, E. 2007.** Fundamentals of Protein Structure and Function. Springer, pp. 59-63, West Indies.
- Casey, A., Walsh, G. 2003.** Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. Bioresource Technology, 86: 183-188.

- Casey, A., Walsh, G. 2004.** Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *Journal of Biotechnology*, 110, 313–322.
- Cheetham, P.S.J. 1995.** Principles of industrial biocatalysis and bioprocessing. In: *Handbook of Comprehensive Biotechnol.*, 3: 789-818.
- Choi, Y.M., Suh, H.J., Kim, J.M. 2001.** Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *J. Prot. Chem.* 20: 287–292.
- Choi, Y.M., Suh, H.J., Kim, J.M. 2001.** Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *J. Prot. Chem.*, 20: 287-292.
- Cromwell, G.I., Coffey, R.D., Parker, G.R., Monegue H.J., Randolph, J.H. 1995.** Efficacy of a recombinant-derived phytase in improving the bioavailability of phosphorus in corn-soybean meal diets for pigs. *Journal of Animal Sciences*, 71: 1831-1840
- Çon, A.H., Gökalp, H.Y. 1997.** Gıda Mikrobiyolojisi. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Notları Yayın no: 007, 23 s. Mühendislik Fakültesi Basım Ünitesi. Denizli.
- Dalal, R.C. 1978.** Soil organic phosphorus. *Adv. Agronom.*, 29: 83-117.
- Daniels, M.J. 1992.** Paper technology, 33(6): 14. WISEMAN, A., 1987. *Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry* p. 274-373.
- Day, P.R. 1996.** Genetic modification of plants: significant issues and hurdles to success. *Am. J. Clin. Nutr.*, 63:651S-656S.
- De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M. R., Mcsweeney, P. L.H., Faccia, M., Giovine, M., Gobetti, M. 2003.** Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Int. J. Food Microbiol.*, 87: 259-270.
- DeBoland, A.R., Garner, G.B., O'Dell, B.L. 1975.** Identification and properties of 'phytate' in cereal grains and oilseed products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23: 1186-1189.
- Demirsoy, A. 1989.** Yaşamın Temel Kuralları (Genel Biyoloji/Genel Zooloji). Cilt 1/Kısım 1. Meteksan Matbaacılık.
- Desphande, S., Cheryan, M., 1984.** Effect of phytic acid, divalent cations and their interactions on α -amilase activity. *J. Food Sci.*, 49: 516-519.
- Ekren, G. S. 2013.** Fitaz Üreten Fungustan Enzimin Üretimi, Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Ellestad, L.E., Angel, R., Soares Jr, J.H. 2002.** Intestinal phytase II: A comparison of activity and in vivo phytate hydrolysis in three teleost species with differing digestive strategies. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26: 259-273.

El-Toukhy, N. M. K., Amany, S.Y., Mariam, G. M. M. 2013. İsolation, purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* MJA. Afr. J. Biotechnol.

Erdman, J.W., Ponerros-Schneier, A. 1989. Phytic acid interactions with divalent cations in foods and in the gastrointestinal tract. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 249: 161–171.

Ergün, A., Tuncer, Ş.D., Çolpan, İ. Yalçın, S., Yıldız, G., Küçükersan, M.K., Küçükersan, S., Öno, A.G., Muğlalı, Ö.H., Şehu, A., 2002. Yemler, Yem Hijyeni ve Teknolojisi. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, 465 s

Feil, B. 2001. Phytic Acid. *Journal of New Seeds*, 3: 1-35.

Fox, M.R.S., Tao, S.H. 1989. Antinutritive effects of phytate and other phosphorilated derivatives. *Nutrition Toxicology*, 3: 59–96.

Fredrikson, M., Biot, P., Larsson Alminger, M., Carlsson, N.G., Sandberg, A.S. 2001. Production process for high-quality pea-protein isolate with low content of oligosaccharides and phytate. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 1208-1212.

Fu, S., Guo, S., Shen, Z., Zhang, Na., Qu, G., Gao, Na. 2011. Characterization of a Thermostable Alkaline Phytase from *Bacillus licheniformis*. *International Conference on Agricultural and Biosystems Engineering, Advances in Biomedical Engineering Vols. 1-2.*

Geil, P.B., Anderson, J.W. 1994. Nutritional and health implications of dry beans: a review. *J. Am. Coll. Nutr.* 13: 549-558.

Glick, B.R., Pasternak, J.J. 2003. *Molecular Biotechnology.* Amer. Soc. for Microbiol., Washington, D.C.

Golovan, S.P., Wang, G., Zhang, J., Forsberg, C.W. 2000. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli appA* encoded bifunctional enzyme that inhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Can. J. Microbiol.*, 46: 59-71

Gözükara, Engin M. 1990. *Biyokimya*, Ankara, Ofset Pepianat Ltd. Şti.

Greaves, M.P., Anderson, G., Webley, D.M. 1967. The Hydrolysis of Inositolphosphates by *Aerobacter aerogenes*. *Biochim. Biophys. Acta*, 132: 412-418.

Greiner, R., Haller, E., Konietzny, U., Jany, K.D. 1997. Purification and characterisation of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 341, 201–206.

Greiner, R., Konietzny, U., Jany, K.D. 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 303: 107-113.

Greiner, R., Larsson Alminger, M., Carlsson, N.G., Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., Pedrosa, M., Goyoaga, C. 2002. Pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytases of legume seeds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50: 6865-6870.

Guerrero-Olazarán, M., Rodríguez-Blanco, L., Carreon-Treviño, J. G., Gallegos López, J. A., Viader-Salvadó, J.M. 2010. Expression of a *bacillus* phytase c gene in *pichia pastoris* and properties of the recombinant enzyme. Instituto de biotecnología, facultad de ciencias biológicas, Universidad autónoma de nuevo león, san nicolás de los garza, Nuevo león, México.

Han, Y.M., Lei, X.G. 1999. Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris*. Arch. Biochem. Biophys., 364: 83-90.

Han, Y.M., Yang, F., Zhou, A.G., Miller, E.R., Ku, P.K., Hogberg, M.G., Lei, X.G. 1997. Supplemental phytases of microbial and cereal sources improve dietary phytate phosphorus utilization by pigs from weaning through finishing. Journal of Animal Science, 75: 1017–1025.

Haros, M., Rosell, C.M., Benedito, C. 2001. Fungal phytase as a potential breadmaking additive. Eur. Food Res. Technol., 213: 317-322.

Hegeman, C.E., Grabau, E.A. 2001. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. Plant Physiology, 126: 1598–1608.

Honke, J., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, C., Frias, J., Gorecky, R. 1998. Changes in quantities of inositol phosphates during maturation and germination of legume seeds. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A, 206: 279-283

Horikoshi, K., 1999. Alkaliphiles: some Applications of Their Products for Biotechnology. Microbiol. Mol.Biol.Rev.,63:735-750

Howson, S.J., Davis, R.P. 1983. Production of phytate hydrolysing enzymes by some fungi. Enzyme Microb Technol., 5: 377-389.

In, M.J., Jang, E.S., Kim, Y.J., Oh, N.S. 2004. Purification and Properties of an Extracellular Acid Phytase from *Pseudomonas fragi* Y9451. J. Microbiol. Biotechnol., 14(5), 1004-1008.

Iqbal, T.H., Lewis, K.O., Cooper, B.T. 1994. Phytase activity in the human and rat small intestine. Gut, 35: 1233-1236.

Irving, G.C.J., Cosgrove, J. 1971. Inositolphosphate Phosphatase of Microbial Origin. Observation on the Nature of the Active Center of Bacterial (*Pseudomonas* sp.) Phytase. Austral. J. Biol., 24: 1559-1564.

IUPAC-IUB (Commission on Biochemical Nomenclature). 1977. Nomenclature of phosphorus containing compounds of biochemical importance. Eur. J. Biochem., 79: 19.

Jog, S.P., Garchow, B.G., Mehta, B.D., Murthy, P.P.N. 2005. Alkaline phytase from lily pollen: Investigation of biochemical properties. Archives Biochemistry Biophysics, 440: 133–140.

Kalaichelvan, P. T. 2012. Extracellular production of Phytases by a Native *Bacillus subtilis* Strain. Annals of Biological Research, , 3 (2):979-987

- Kaynar, P., Beyatlı Y. 2006.** Balıklardan İzole Edilen *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi, Plazmid DNA ve Protein Profillerinin İncelenmesi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 4(3), 1-30.
- Kerovuo, J. 2000.** A Novel Phytase from *Bacillus*. Characterization and Production of the Enzyme. Academic Dissertation, p. 68, Helsinki.
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen N., Apajalahti, J. 1998.** Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2079-2085.
- Kerovuo, J., Tynkkynen, S. 2000.** Expression of *Bacillus subtilis* phytase in *Lactobacillus plantarum* 755 *Letters in Applied Microbiology*, 30, 325-329
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., 2002.** Industrial enzymeapplications. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 345-351.
- Kim, D.H., Oh, B.C., Choi, W.C., Lee, J.K., Oh, T.K. 1999.** Enzymatic evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* phytase as a feed additive. *Biotechnol Lett*, 21: 925–7
- Kim, H., Kim, Y., Lee, J., Kim, K. and Kim, Y. 2003.** Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*. *Biotechnology Letters*, 25: 1231-1234.
- Kim, Y.O., Kim, H.K., Bae, K.S., Yu, J.H., Oh, T.K. 1998.** Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microb Technol.*, 22: 2-7.
- Konietzny, U., R. Greiner. 2003.** Phytic acid: Nutritional Impact. In: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, B. Caballero, L. Trugo, P. Finglas (Eds.), Elsevier, London, UK, 4555-4563.
- Konietzyn, U., R. Greiner. 2004.** Bacterial phytase: Potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 11-18.
- Kornegay, F. E. T. 2001.** Digestion of Phosphorus and Other Nutrients: The Role of Phytases and Factors Influencing Their Activity. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. Ed., M.R.Bedford, G.G. Partridge, CABI Publishing, UK. pp: 237-272.
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2010.** Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition. *Food Chemistry* 120, 945– 959
- Kutlu, H.R. 2000.** Kanatlı Rasyonlarında Enzim Kullanımı, *Çiftlik Dergisi*, 194: 84-88.
- Kvist, S., Carlsson, J.M., Lawther, J.M., DeCastro, F.B. 2005.** Process for the fractionation of cereal brans. US patent application US 20050089602.
- Laboure, A.M., Gagnon, J., Lescure, A.M. 1993.** Purification and characterization of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. *Biochemical Journal*, 295: 413-419.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227:680-685.

Lata, S., Rastogi, S., Kapoor, A., Imran, M. 2013. Optimization of culture conditions for the production of phytase from *Aspergillus heteromorphus* MTCC 10685. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, Vol 4, Issue 2, pp 224-235

Lehmann, M., Kostrewa, D., Wyss, M., Brugger, R., D'Arcy, A., Pasamontes, L. 2000. From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase. *Protein Eng.* 13: 49–

Lei, X.G., Porres, J.M., Mullaney, E.J., Brinch-Pedersen, H. 2007. Phytase: source, structure and application. In: *Industrial Enzymes (Section E)* (Polaina, J. And MacCabe, A. P.), Springer, pp. 505–529, The Netherlands

Lei, X.G., Stahl, C.H. 2001. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57: 474-481.

Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, J.W.JR., Shadomy, J.H. 1985. *Manual of clinical microbiology*. USA, 1149 pp.

Liener, I.E., 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Crit. Rev. Fd. Sci. Nutr.* 34: 31-67.

Lin, S. 1997. Identification of Contamination Sources of *B. cereus* in Pasteurized Milk. A Thesis Presented to Faculty of Graduate Studies of University of Guelph. 109 p. Canada.

Liu, B.L., Rafiq, A., Tzeng, Y.M., Rob, A., 1998. The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme Microbiol. Technol.* 22: 415-424.

Loewus, F. 2002. Biosynthesis of phytate in food grains and seeds. In: *Food Phytases*, N.R. Reddy, S.K. Sahte (Eds.), CRC Pres, Boca Raton, Florida, USA, 53-61.

Lopez, H.W., F. Leenhardt, C. Coudray and C. Rèmèsy. 2002. Minerals and phytic acid interactions: Is it a real problem for human nutrition? *Int. J. Food Sci. Technol.*, 37: 727-739.

Maenz, D.D., Classen, H.L. 1998. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poultry Science*, 77: 557–563.

Mao, W., Pan, R., Fredman, D., 1992. High production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in a fed-batch fermentation using synthetic medium. *J. Indust. Microbiol.* 11: 1-6

Metin, K. 2007. *Moleküler Biyoloji Teknikleri II: Protein Analiz Teknikleri*. Moleküler Biyoloji (Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B.), Nobel Yayıncılık, Sayfa 555-598, Ankara.

Miksch, G., Kleist, S., Friesh, K., Flaschel, E. 2002. Overexpression of the phytase from *E. coli* and its extracellular production in bioreactors. *Appl. Microbiol. And Biotech.*, p.253.

Mitchell, D.B., Vogel, K., Weimann, B. J., Pasamontes, L., Van Loon, A.P.G.M. 1997. The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology*, 143: 245-252.

Mullaney, E.J., Daly, C.B., Kim, T., Porres, J.M., Lei, X.G., Sethumadhavan, K., Ullah, A.H.J. 2002. Site-directed mutagenesis of *Aspergillus niger* NRRL 3135 phytase at residue 300 to enhance catalysis at pH 4.0, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297: 1016–1020.

Mullaney, E.J., Ullah, A.H.J. 2003.The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochem Biophys Res Comm* 312: 179-184

Nelson, D.L., Cox, M.M. 2004. Enzymes. *Lehninger Principles of Biochemistry* (Nelson, D.L., Cox, M.M). W. H. Freeman, p. 190-249, Madison.

Nelson, T.S., Shieh, T.R., Wodzinski, R.J., and Ware, J.H. 1968. The availability of phytate phosphorus in soya bean meal before and after treatment with a mold phytase. *Poultry Science*, 47: 1842-1848.

Oh, B.C., Choi, W.C., Park, S., Kim, Y.O., Oh, T.K. 2004. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytase. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 362-372.

Özler, A. 2009. Malatya kayısısından (*Prunus armeniaca* L.) pektinesteraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A, And Soccol, V.T., 2001. Production, Purification and Properties of Microbial phytases. *Bioresource Technol.*, 7: 203-214.

Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M. and van Loon, A.P.G.M. 1997. Gene cloning and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Applied Environmental Microbiology*, 63: 1696-1700.

Pekşen, E., Ark, C., 2005. Antibesinsel maddeler ve yemeklik tane baklagillerin besleyici değerleri, *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20 (2) : 116-117

Pfeffer, M. 1872. Comprehensive study of aleurone grains, identification of globoid and approximation of its chemical nature. *Johrb. Wiss. Bot.* 8: 429-574.

Phillippy, B.Q., Johnston, M.R., Tao, S.H., Fox, M.R. 1998. Inositol phosphates in processed foods. *J Food Sci* 53: 496-499.

Phillippy, B.Q., Wyatt, C.J. 2001. Degradation of phytate in foods by phytases in fruits and vegetable extracts. *Journal of Food Science*, 66: 535-539.

- Polaina, J., MacCabe, A.P. 2007.** Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. Springer. The Netherlands
- Powar, V.K., Jagannathan, V. 1982.** Purification and properties of phytatespecific phosphatase from *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 151: 1102-1108. Publishers Inc., New York, p 1-11.
- Purva, V., Uttam, C.B. 2004.** Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolase): an overview, Enzyme Micob. Technol. 35: 3-4.
- Raboy, V. 2001.** Seeds for a better future: Low phytate grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. Trends in Plant Science, 6: 458-462.
- Raghavendra, P., Halami, P.M. 2009.** Screening, selection and characterization of phytic acid degrading lactic acid bacteria from chicken intestine. International Journal of Food Microbiology 133, 129-134.
- Rande, B. D., Augusto, E.S.Jr., Sharon, N., Christopher, M. A. C. 2011.** Production and characterization of phytase from *Bacillus* spp. as feed additive in aquaculture. AACL Bioflux, Volume 4, Issue 3.
- Rao, B.M., Tanksale, M.A., Ghathe, S.M., Deshpande, V.V. 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology, 62: 597-635.
- Reddy, N.R., Sathe, S.K., Salunkhe, D.K. 1982.** Phytases in legumes and cereals. Advances in Food Research, 28: 1-92.
- Robert, PH., Nordin, BEC., J. Am. Coll. Nutr. 2002,** 21,239.
- Rodriguez, E., Wood, Z.A., Karplus, P.A., Lei, X.G. 2000a.** Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*. Arch. Biochem. Biophys., 382: 105-112.
- Rose, A. R. 1912.** A resume of the literature on inosite-phosphoric acid with special reference to the relation of that substance to plants. Biochem. Bull. 2: 21-49.
- Sandberg, A.S., Brune, M., Carlsson, N.G., Hallberg, L., Skoglund, E., Rossander-Hulthèn, L. 1999.** Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption of human. Department of Food Science, Chalmers University of Technology, University of Göteborg, Sahlgrenska Hospital, Göteborg, Sweden.
- Sarıkaya, E. 1995.** α -Amilaz üreten bazı *Bacillus* suşlarının gelişme parametreleri, enzim özellik ve üretim koşullarının optimizasyonu. *Doktora Tezi*, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Sarkar, S., B., Sreekanth, S. Kant, R. Banarjee, B.C. Bhattacharyya, 1998.** Production and optimization of microbial lipase. Bioproc. Engineer., 19: 29-32.

Sasirekha, B., Bedashree, T., Champa, K.L. 2012. Optimization and partial purification of extracellular phytase from *Pseudomonas aeruginosa* p6. Eur. J. Exp. Biol. 2: 95-104.

Schallmeyer, M., Singh, A. and Ward, O. P. 2004. Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. Canadian Journal of Microbiology, 50: 1-17.

Schulze, E. And Winterstein, E. 1896. Physiol. Chem. 40:120??????

Scott, J.J., Loewus, F.A. 1986. A calcium-activated phytase from pollen of *Lilium longiflorum*, Plant Physiol. 82: 333-335.

Seo, M-J., Kim, J-N., Cho, E-A., Park, H., Choi, H-J., Pyun, Y-R., 2005. Purification and Characterization of a Novel Extracellular Alkaline Phytase from *Aeromonas* sp. J. Microbiol. Biotechnol., 15(4), 745-748.

Shah, V., Parekh, L.J. 1990. Phytase from *Klebsiella* sp. No. PG-2: Purification and Properties. Indian J. Biochem. Biophys., 27: 98-102.

Shamna, K. S., Rajamanikandan, K. C. P., Kumar, M.D. J., Balakumaran, M. D., Shimizu, M., 1992. Purification and characterization of a phytase from *Bacillus*

Simell, M., Trunen, M., Piironen, J. And Vara, T. 1989. Feed and food applications of phytase. Lecture at 3rd Meet. Industrial Applications of Enzymes, Barcelona, Spain.

Simons, P., H. Versteegh, A.W. Jongbloed, P.A. Kemme, P. Slump, K.D. Bos, M.G.E. Wolters, R.F. Beudeker and G.J. Verschoor. 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. British Journal of Nutrition, 64: 525-540.

Singh, N. K., Joshi, D.K., Gupta, R. K. 2013. Isolation of Phytase Producing Bacteria and Optimization of Phytase Production Parameters. Jundishapur Journal of Microbiology, Vol. 6 Issue 5, p1.

Soni, S.K., and Khire, J.M. 2007. Production and partial characterization of two types of phytase from *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerged fermentation conditions. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23: 1585-1593.

Sreedevi, S., Reddy, B.N., 2013. Purification and Biochemical Characterization of Phytase from newly isolated *Bacillus subtilis* C43. Adv Bio Tech: 12(08): 01- 06

Sreedevi, S., Reddy, B.N. 2012. Isolation, screening and optimization of phytase production from newly isolated *Bacillus* sp. C4. Int J Pharm Biol Sci; 2(2): 218-231.

Sreeramulu, G., Srinivasa, D.S., Nand, K., And Joseph, R., 1996. *Lactobacillus amylovorus* as a phytase producer in submerged culture. Letters in Applied Microbiology, 23, 385–388.

Sweeten, J.M. 1992. Livestock and poultry waste management: a national overview in: Blake, J.D., Magette, W.(eds) National livestock, poultry and aquaculture waste management. Amer Soc. Agric. Eng. St Joseph, Minnesota, pp: 4-15.

Tambe, S.M., Kaklij, G.S., Kelkar, S.M., Parekh, L.J. 1994. Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: Evidence for unusually small active enzyme peptide. *Journal of Fermentation and Bioengineering* Vol.77, No.1, 23-27.

Temiz, A. 1994. Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri. Ankara, s. 26-120.

Tran, T. T. 2010. Thermostable phytase from a *Bacillus* sp. (Heterologous production, mutation, characterization and assay development). *Doctoral Thesis*, Department of Biotechnology Lund University, Sweden.

Tran, T. T., Hashim, S. O., Gaber, Y., Mamo, G., Mattiasson B. and Hatti-Kaul, R. 2010. Thermostable alkaline phytase from *Bacillus* sp. MD2: effect of divalent metals on activity and stability. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.* 37: 279–287

Trautwein, G. and Kuhlmann, K.P. 1982. Immunofluoreszenz, Theorie and Praxis, Hannover, p:52.

Van Etten, R.L. 1982. Human prostatic acid phosphatase: a histidine phosphatase. *Annals of the New York Academy of Science*, 390: 27-51.

Van Hartingsveldt, W., C.M.J. Van Zeijl, M. Harteveld, R.J. Gouka, M.E.G. Suykerbuyk, R.G.M. Luiten, P.A. Van Paridon, G.C.M. Selten, A.E. Veenstra, R.F.M. Van Gorcom, and C.A.M.J.J. Van den Hondel. 1993. Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*. *Gene*, 127: 87-94.

Vats, P., Banerjee, U. C. 2005. Biochemical characterisation of extracellular phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) from a hyper-producing strain of *Aspergillus niger* van Teighem. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32: 141–147

Viveros, A., Centeno, C., Brenes, A., Canales, R., and Lozano, A. 2000. Phytase and acid phosphatase activities in plant feedstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4009-4013.

Vohra, A. and T. Satyanarayana. 2003. Phytases: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23(1): 29-60

Wang, M., N.S. Hettiarachchy, M. Qi, W. Burks and T. Siebenmorgen. 1999. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 411-416.

Weremko, D., Fandrewski, H., Zebrowska, T., Han, K., Kim, J.H., and Cho, W. T. 1997. Bioavailability of phosphorus in feeds of plant origin for pigs Review. *Asian-Australians Journal of Animal Sciences*, 10: 551-566.

Whitehurst, R.J., van Oort, M. 2010. *Enzymes in Food Technology*. Wiley-Backwell, pp. 388, USA.

Wise, A., and Gilbert, D. J. 1982. Phytate hydrolysis in germfree and conventional rats. *Applied Environmental Microbiology*, 43: 753–756.

WN. Jeri, Am. J. Clin. Nutr. 2005, 81,1232

- Wolfgang, A. 2004.** Enzymes in industry: Production and applications. Wileyvch Verlag GmbH&Co. KgaA, pp 485, Weinheim.
- Wolfson, D., Olmstead, S., Meiss, D., And Ralston, J. 2008.** MakingSense of Digestive Enzymes. Klaire Labstm . A division of ProTheraR, Inc.
- Yanke, L. J., Bae, H.D., Selinger, L. B. and Cheng, K. J. 1998.** Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology*, 144: 1565-1573.
- Yoon, S.J., Choi, Y.J., Min, H.K., Cho, K.K., Kim, J.W., Lee, S.C., Jung, Y.H. 1996.** Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme and Microbial Technol.*, 18: 449-454.
- Yu, S.,Cowieson, A., Gilbert, C., Plumstead, P., Dalsgaard, S.2012.**Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters: Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP1-5) including IP5 isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin. *Journal of Animal Science*, 90:1824-1832.
- Zamudio, M., Gonzales, A., And Medina, J.A. 2001.***Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. *Letters inApplied Microbiology*, 32, 181-184.
- Zeman, N.W., Mccrea, J.M., 1985.** Alpha-amylase Production Using a Recombinant DNA Organism. *Cereal Foods World*. 30(1) : 777-780.
- Zeman, N.W., Mccrea, J.M. 1985.** Alpha-amylase Production Using a Zhou, J.R. and Erdman, J.W.Jr., 1995. Phytic acid in health and disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35 (6): 495-508.
- Zhou, J.R. and Erdman, J.W.Jr., 1995.** Phytic acid in health and disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35 (6): 495-508.
- Zuo, R., Chang, J., Oingqiang, Y., Chen, L., Chen, Q., Yang, X., Zheng, Q., Ren, G., Feng, H. 2010.** Phytase gene expression in *Lactobacillus* and analysis of its biochemical characteristics. *Microbiological Research* 165, 329-335.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Dilara AKÇAKOCA

Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul – 28.01.1990

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lise : Yalova Lisesi – 2005-2007

Lisans : Uludağ Üniversitesi – 2008-2012

Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi – 2013/2015

Çalıştığı Kurum/Kurumlar: -----

İletişim (e-posta) : Dilara.akcakoca@gmail.com

Yayınları* : -----