

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**TERMOFİLİK *Geobacillus sp.* TF16 SUŞUNDAN FİTAZ ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE DOĞAL BİR BESİN  
KAYNAĞINDAKİ FİTATI PARÇALAMA ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kimyager Emre DOKUZPARMAK**

**HAZİRAN 2015**

**TRABZON**



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**TERMOFİLİK *Geobacillus sp.* TF16 SUŞUNDAN FİTAZ ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE DOĞAL BİR BESİN  
KAYNAĞINDAKİ FİTATI PARÇALAMA ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

**Emre DOKUZPARMAK**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce**

**“YÜKSEK LİSANS (KİMYA)”**

**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 08 / 05 / 2015**

**Tezin Savunma Tarihi : 11 / 06 / 2015**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA**

**Trabzon 2015**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Kimya Anabilim Dalında  
Emre DOKUZPARMAK Tarafından Hazırlanan**

**TERMOFİLİK *Geobacillus sp.* TF16 SUŞUNDAN FİTAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,  
KARAKTERİZASYONU VE DOĞAL BİR BESİN KAYNAĞINDAKİ FİTATI  
PARÇALAMA ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 26 / 05 / 2015 gün ve 1604 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK**

.....

**Üye : Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA**

.....

**Üye : Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ**

.....

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

“Termofilik *Geobacillus sp.* TF16 suşundan fitaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve doğal bir besin kaynağındaki fitatı parçalama etkinliğinin incelenmesi” adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek bu çalışmanın planlanıp değerlendirilmesinde yardımını ve ilgisini esirgemeyen değerli hocam sayın Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA’ya, tez çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yardımlarını ve ilgisini benden esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK’a şükranlarımı sunarım. Ayrıca, araştırmada kullandığımız mikroorganizmaların teminini sağlayan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Kadriye İNAN teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim süresince her an yanımda olan, maddi ve manevi yardımlarını benden esirgemeyen sayın hocalarım Dr. Şaban KESKİN’e, Ümmühan ÇAKMAK’a ve en yakın arkadaşım Yakup ŞİRİN’e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tek tek isimlerini saymadığım bütün Biyokimya Lisansüstü Araştırma Laboratuvarındaki arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmama sağladıkları maddi destekten ötürü TÜBİTAK’a (Proje No: 214Z190) teşekkürlerimi sunarım.

Maddi, manevi desteklerini ve sevgilerini benden esirgemeyen anneme, babama ve kız kardeşime sonsuz minnet duygularımı sunar, özellikle abim Arş. Gör. Ümit DOKUZPARMAK’a beni ikna ederek bu yolda yürümemi sağladığı ve her türlü imkanı bana sunarak bu tezi tamamlamama vesile olduğu için çok teşekkür ederim.

Emre DOKUZPARMAK  
Trabzon 2015

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Termofilik *Geobacillus Sp.* Tf16 Suşundan Fitaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Doğal Bir Besin Kaynağındaki Fitatı Parçalama Etkinliğinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA'nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 11/06/2015.

Emre DOKUZPARMAK

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa No</u></b>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VIII
SUMMARY .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ .....	XII
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Enzimler .....	1
1.1.1. Mikrobiyal Enzimler .....	4
1.1.2. Fitat ve Yapısı .....	4
1.1.3. Fitaz Enzimi (Myo-inositol-hegzafosfat fosfohidrolaz; EC 3.1.3.8) .....	6
1.1.3.1. Fitazların Optimum pH'ya Göre Sınıflandırılması .....	8
1.1.3.2. Fitazların Katalitik Merkeze Göre Sınıflandırılması .....	8
1.1.3.2.1. Histidin Asit Fosfataz (HAP).....	8
1.1.3.2.2. $\beta$ - Propeller Fitazı (BPPHy).....	9
1.1.3.2.3. Sistidin Fosfataz (CP) .....	10
1.1.3.2.4. Purple Asit Fosfataz (PAP) .....	10
1.1.3.3. Fitazların Stereospesifikliğine Göre Sınıflandırılması.....	10
1.2. Fitaz Enziminin Kaynakları .....	11
1.2.1. Bitkisel Fitazlar .....	11
1.2.2. Hayvansal Fitazlar.....	12
1.2.3. Mikrobiyal Fitazlar .....	12
1.3. Fitaz Enziminin Endüstride Kullanım Alanları .....	14
1.3.1. Fitaz Enziminin Hayvan Yemlerinde Kullanılması .....	15
1.3.2. Fitaz Enziminin Gıda Sanayisinde Kullanılması .....	16
1.3.3. Fitaz Enziminin Myo-İnositol Eldesindeki Önemi.....	18

1.3.4.	Fitaz Enziminin Protein Sindirimine ve Metabolik Enerjiye Etkisi .....	18
1.4.	Enzim Saflaştırılması .....	19
1.4.1.	Enzimlerin Saflaştırılma Amacı .....	19
1.4.2.	Enzim Saflaştırma Teknikleri .....	20
1.5.	Çalışmanın Amacı .....	22
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	23
2.1.	Kullanılan Materyaller .....	23
2.1.1.	Cihazlar .....	23
2.1.2.	Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler .....	24
2.1.2.1.	Kullanılan Mikroorganizma .....	24
2.1.2.2.	Kimyasallar .....	24
2.1.2.3.	Sıvı ve Katı Besiyerleri .....	24
2.1.2.4.	Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar .....	26
2.1.2.4.1.	Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler .....	26
2.1.2.4.2.	Protein Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler .....	26
2.1.2.4.3.	Tampon Çözeltiler .....	27
2.1.2.4.4.	Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler .....	28
2.1.2.4.5.	Diğer Çözeltiler .....	29
2.2.	Deneysel Çalışmalar .....	29
2.2.1.	Petri Testi .....	29
2.2.2.	Optimum İndükleme Süresinin Belirlenmesi .....	30
2.2.3.	Ham Enzim Özütünün Hazırlanması .....	30
2.2.4.	Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	30
2.2.5.	Fitaz Aktivitesi İçin Standart Kalibrasyon Grafiği ve Hazırlanışı .....	31
2.2.6.	Bradford Yöntemi ile Protein Tayini .....	32
2.2.7.	SDS-PAGE Elektrofrezinin Uygulanması .....	33
2.2.8.	Fitazın Saflaştırılması .....	34
2.2.8.1.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi .....	34
2.2.8.2.	Diyaliz .....	35
2.2.8.3.	DEAE İyon Değişim Kromatografisi .....	35
2.2.9.	Substrat Özgünlüğü .....	36
2.2.10.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi .....	36
2.2.11.	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....	36

2.2.12.	Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi .....	37
2.2.13.	Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi .....	37
2.2.14.	Enzimin ısı Kararlılığının İncelenmesi .....	37
2.2.15.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi .....	38
2.2.16.	Proteaz Varlığının Fitaz Aktivitesine Etkisi .....	38
2.2.17.	TF-16 Fitazının Soya Sütü Fitatını Parçalama Etkinliği .....	39
3.	BULGULAR .....	40
3.1.	Petri Testi .....	40
3.2.	Optimum İndükleme Süresinin Belirlenmesi .....	41
3.3.	Protein Tayini .....	42
3.4.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi .....	42
3.5.	Diyaliz .....	42
3.6.	DEAE İyon Değişim Kromatografisi .....	43
3.7.	SDS-PAGE Elektroforezi .....	44
3.8.	Substrat Özgünlüğü .....	45
3.9.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi .....	46
3.10.	Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....	46
3.11.	Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi .....	47
3.12.	Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi .....	47
3.13.	Isıl Kararlılığının İncelenmesi .....	48
3.14.	pH Kararlılığının İncelenmesi .....	49
3.15.	Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi .....	51
3.16.	Proteaz Varlığının Fitaz Aktivitesine Etkisi .....	53
3.17.	TF-16 Fitazının Soya Sütü Fitatını Parçalama Etkinliği .....	53
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	55
5.	ÖNERİLER .....	62
6.	KAYNAKLAR .....	64
ÖZGEÇMİŞ		



Yüksek lisans Tezi

ÖZET

TERMOFİLİK *Geobacillus sp.* TF16 SUŞUNDAN FİTAZ ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE DOĞAL BİR BESİN  
KAYNAĞINDAKİ FİTATI PARÇALAMA ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Emre DOKUZPARMAK

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA

2015, 69 Sayfa

Bu çalışmada endüstriyel önemi olan fitaz enzimi yeni tanımlanmış bir termofilik bakteri türü olan *Geobacillus sp.* TF16'dan amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi teknikleri ile 4,93 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzim SDS-PAGE ile analiz edildiğinde 106,04 kDa molekül ağırlığına sahip tek bir protein bandı tespit edildi. Saflaştırılan enzim sodyum fitat substratı varlığında 85 °C'de pH 4,0'de optimum sıcaklık ve pH'ya sahip olduğu ve optimum pH değerinde enzim 4, 37 ve 85 °C'de 24 saat sonunda aktivitesini yaklaşık olarak %80'nin üzerinde koruduğu tespit edildi. Fitaz enziminin ısıl kararlılığı incelendiğinde, 4 °C'de 24 saat sonunda ve 37 °C ve 85 °C'de 4 saat sonunda aktivitenin büyük oranda korunduğu tespit edildi. Sodyum fitat substratı için enzimin kinetik parametreleri olan  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerlerinin sırasıyla 526,28 U/mg ve 1,31 mM olduğu hesaplandı. Metal iyonlarının varlığında enzim aktivitesinin büyük oranda korunduğu,  $Cu^{2+}$  mevcudiyetinde aktivitenin 5 kat arttığı, EDTA mevcudiyetinde ise kısmen azaldığı tespit edildi. Proteaz enzimleri varlığında *Geobacillus sp.* TF16 fitazının %62 oranında aktivitesini koruduğu saptanmıştır. *Geobacillus sp.* TF16 fitazının soya sütü fitatını parçalama etkinliği incelenerek 4 saat sonunda fitaz enzimi yaklaşık %20 oranında hidrolizleme yeteneğine sahip olduğu tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Fitaz, Saflaştırma, Karakterizasyon, *Geobacillus sp.* TF16

Master Thesis

SUMMARY

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PHYTASE FROM *Geobacillus sp.* TF16 AND INVESTIGATION HYDROLYSIS OF SOYMILK PHYTATE

Emre DOKUZPARMAK

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Chemistry Graduate Program  
Supervisor: Doç, Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA  
2015, 69 Pages

In this study, phytase was purified from *Geobacillus sp.* TF16 by using ammonium sulfate precipitation and DEAE ion exchange chromatography. Phytase enzyme was purified 4.93 fold by chromatography techniques. The purified enzyme was determined as a single band 106.04 kDa on SDS-PAGE. Temperature and pH optimums of purified enzyme were found to be 85 °C and 4.0, respectively. The enzyme activity is preserved approximately %80 after 24 hours incubation at 4 °C, 37 °C and 85 °C. In the study of thermal stability, enzyme activity was conserved approximately %60-80 at 4 °C after 24 hours and at 85 °C and 37 °C after 4 hours. Sodium phytate as a substrate  $V_{max}$  and  $K_m$  values were calculated as 526.28 U/mg and 1.31 mM, respectively. Additionally, it was detected that some metal ions affect the enzyme activity at different ratios. In the presence of EDTA, enzyme activity was inhibited slightly. In the presence of proteases, it is conserved the activity approximately %62 at 37 °C after 1 hour incubation. The enzyme hydrolyzed approximately %20 of soymilk phytate at 85 °C after 4 hours.

**Key Words:** Phytase, Purification, Characterization, *Geobacillus sp.* TF16

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1. Fitik asit ( <i>myo</i> -inositol-1,2,3,4,5,6-hekzafosfat)'in yapısı.....	5
Şekil 2. Fitik asitin (A) ve fitik asit şelatının (B) yapısı .....	6
Şekil 3. Fitatın, fitaz enzimi ile inositol, fosfat ve diğer elementlere hidrolizi .....	6
Şekil 4. Fitik asidin 3-fitaz ve 6-fitaz ile hidrolizi .....	11
Şekil 5. Fitazın fitata bağlı fosfat gruplarını hidrolizi ile metalleri, metal bağlı enzimleri ve proteinleri serbest bırakması .....	19
Şekil 6. 7 farklı <i>Geobacillus sp.</i> termofilik bakteri türünün fitaz üretimi kontrolü için petri testi .....	40
Şekil 7. Optimum indükleme süresinin belirlenmesi .....	41
Şekil 8. İyon değiştirici kolon saflaştırma grafiği .....	43
Şekil 9. A: LB besiyerinde indükleme yapılmamış ham enzim özütü, B: Unlu Besiyerinde indüklenmiş ham enzim özütü, C: %60 Amonyum Sülfat çöktürmesi sonrası, D: Diyaliz işlemi sonrası, E: DEAE iyon değişim kolonu sonrası, M: Protein standardı (116 kDa, 66,2 kDa, 45 kDa, 35 kDa) .....	44
Şekil 10. Standart proteinler $\log(M_A)$ - $R_f$ grafiği .....	45
Şekil 11. TF16 fitazının pH-%bağıl aktivite grafiği .....	46
Şekil 12. TF16 fitazının sıcaklık-%bağıl aktivite grafiği .....	47
Şekil 13. TF16 fitazının sodyum fitat substratı varlığında çizilen Lineweaver-Burk grafiği .....	48
Şekil 14. TF16 fitazının ısı kararlılık grafiği .....	49
Şekil 15. TF16 fitazının 4 °C'de pH kararlılık grafiği .....	50
Şekil 16. TF16 fitazının 37 °C'de pH kararlılık grafiği .....	50
Şekil 17. TF16 Fitazı 85 °C'de pH kararlılık grafiği .....	51
Şekil 18. Organik çözücüler ve deterjanlar varlığında % kalan aktiviteler.....	52
Şekil 19. Metallerin varlığında % kalan aktiviteler .....	52
Şekil 20. Proteazların varlığında % kalan fitaz aktivitesi .....	53

## TABLULAR DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. Endüstride kullanılan enzimler ve kullanım alanları.....	3
Tablo 2. Mikrobiyal fitazların bazı özellikleri.....	14
Tablo 3. Bazı kanatlı yem hammaddelerindeki toplam fosfor, fitat fosforu ve toplam fitat fosfor oranları.....	15
Tablo 4. Bazı bitkisel kökenli gıdalardaki fitat miktarı (kurumaddede).....	17
Tablo 5. Özelliklerine göre protein saflaştırılmasında kullanılan kromatografi teknikleri.....	20
Tablo 6. Kullanılan cihazlar.....	23
Tablo 7. Unlu besiyeri bileşenleri.....	25
Tablo 8. Fitatlı besiyerinin bileşenleri .....	25
Tablo 9. Enzim aktivitesi belirlenmesinde kullanılan reaktifler ve hacimleri.....	31
Tablo 10. Fitaz aktivitesi tayini için kalibrasyon grafiği hazırlanması.....	32
Tablo 11. Bradford protein tayini pipetleme tablosu.....	32
Tablo 12. Elektroforez jeli için kullanılan madde miktarları .....	33
Tablo 13. Petri testi koloni ve zon çapı değerleri.....	40
Tablo 14. 7 farklı <i>Geobacillus sp.</i> suşunun spektrofotometrik aktivite sonuçları .....	41
Tablo 15. Saflaştırma tablosu .....	44
Tablo 16. TF16 Fitazına ait substrat- % bağıl aktivite değerleri.....	45

## KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

APS	: Amonyum persülfat
BSA	: Bovin serum albümin (Sığır Serum Albumini)
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
DEAE	: Dietilaminoetil
U	: Enzim ünitesi
kDa	: Kilodalton
$K_m$	: Michalis-Menten sabiti
mM	: Milimolar
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PMSF	: Fenilmetilsülfonilflorür
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TEMED	: N,N, N', N'- Tetrametiletildiamin
Tris	: Tris (hidroksimetil) aminometan
$V_{maks}$	: Maksimum hız
$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{L}$	: Mikrolitre

## 1. GİRİŞ

Biyokatalizörler canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları katalizler. Bu biyomoleküller farklı bilimsel ve teknolojik alanlarda kullanılmaktadır. Bunlardan biri de gıda ve yem katkı maddesi olarak gıdaların veya yemlerin işlenmesi esnasında bazı enzimlerin sıklıkla kullanılmasıdır. Özellikle gıda endüstrisinde; et, sebze, meyve, süt, fırın ürünleri ve içeceklerin işlenmesinde, yem sanayinde ise çiftlik hayvanı yemi ve balık yemlerinde alfa-amilaz, fitaz, glukoz izomeraz, beta-glukozidaz, glukanaaz, pullunaz, proteaz gibi enzimler kullanılmaktadır. Kullanılan mevcut enzimler özellikle ekstrem şartlara dayanıklı ve mikroorganizma orijinli olanlardır (Porta vd., 2010).

Fitik asit bitkilerde fosforun temel depo maddesidir ve özellikle tahıl, baklagil ve yağlı tohumlarda fazlaca bulunmaktadır. Fakat bu gıdalar yüksek fitat içeriğinden dolayı anti-besinsel özellik kazanmaktadırlar. Çünkü fitat insanlar ve monogastrik hayvanlar tarafından sindirilemez. Sindirilemediğinden dolayı besinsel değerinden yararlanılamaz, sindirim sisteminde istenmeyen bir durum olarak proteinleri ve bazı mineralleri bağlayarak emilimlerini de engeller. Fitaz enzimi, fitatın daha az fosforillenmiş inositol fosfatlara ya da bazı durumlarda inositle sıralı hidrolizini katalizleyen fosfataz sınıfı enzimdir. Böylece fitatın yapısındaki inositol ve organik fosforun, ayrıca şelat yapmış iyonların açığa çıkmasını sağlar. Bu da özellikle tahıl ve hububat orijinli besinlerin veya gıda katkılarının besinsel değerinin artmasını sağlar.

### 1.1. Enzimler

Eski çağlarda enzim uygulamalarının önemi bilinmemesine rağmen, yiyecek ve içecek üretimi gibi birçok alanda enzimlerden faydalanılmıştır. Enzimlerin yüz yılı aşkın bir süredir bilinmesine karşın enzimoloji ve enzim teknolojisi özellikle son 30 yılda gelişme göstermiştir. 19. Yüzyılda başlayan enzim çalışmaları 20. yüzyılda hızlanmış ve üreaz ve pepsin enzimleri, kristalize edilebilecek derecede saflaştırılan ilk proteinler olmuştur. Enzimler biyolojik katalizörlerdir ve bu kompleks moleküller yaşamın devamlılığı için gerekli biyokimyasal reaksiyonları katalizlerler. Biyokimyasal reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürerek hızlanmasını sağlayan enzimler, yüksek

katalitik aktivite, seçicilik, spesifikklik gibi özelliklere sahip mükemmel düzenlenmiş yapılarıdır. Bu davranışları inorganik katalizörlerle karşılaştırıldığında, enzimlerin yüksek sıcaklık ve basınçlara gerek duymadan da katalitik etki gösterdiği gözlenmiştir. Normal sıcaklık ve basınç altında, enzimlerin sulu çözeltiler içerisinde çok iyi katalitik etki göstermeleri, enzimlerin ticari ve endüstriyel olarak büyük öneme sahip olmasını sağlamıştır.

Sınırlı seçicilik gösteren kimyasal katalizörlerin aksine enzimlerin çoğu spesifiktir. Bir enzimin aktif bölgesi genellikle çok iyi organize olmuş ve üç boyutlu yapı kazanmış 3-12 amino asit kalıntısından oluşur. Enzimin aktif bölgesi o enzimin katalitik merkezidir ve bu alan substrata karşı yüksek ilgiye sahiptir. Bu amino asit kalıntıları kimyasal ve üç boyutlu yapısı gereği, substrat molekülü üzerindeki bazı grupların komplementeri durumundadırlar. Bu sebepten, enzim substratına doğru bir yönelim ile bağlanmak zorundadır. Aksi halde reaksiyon gerçekleşemez. Bir enzim substratına uygun bir şekilde bağlandığında, substratı ürüne dönüştürmek üzere katalizler (Stryer vd., 2005).

Enzimatik işlemlerde protein miktarından ziyade aktivite miktarı dikkate alınarak ölçüm yapılır. Enzim aktivitesini ölçmek için her birim zamanda oluşan ürünün veya kaybolan substratın miktarının ölçülmesi gerekir. Genellikle bu ölçüm oluşan ürün miktarı hesaplanarak gerçekleştirilir. Enzimlerin ölçü birimi olan enzim ünitesi (U) tanımı ise; optimum şartlarda 1 dakikada 1  $\mu\text{mol}$  substratı ürüne dönüştürebilen enzim miktarı olarak tanımlanır.

Enzimlerin katalizlediği reaksiyonlara etki eden faktörler aşağıda sıralanmıştır;

- Ortam pH'ının etkisi,
- Sıcaklık,
- Enzim konsantrasyonu,
- Substrat konsantrasyonu,
- Süre,
- Aktivatör/inhibitörlerin varlığı,
- Reaksiyon ürünleri,
- Ortamdaki iyonların varlığı,
- Organik çözücü ve deterjanların varlığı

Günümüzde enzimler farklı endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Endüstride enzim kullanımının avantajları aşağıda sıralanmıştır;

- Doğal kaynaklı ve toksik olmamaları,

- Yüksek spesifikliğe sahip olmaları,
- İlimli şartlarda (nötral pH ve oda sıcaklığı gibi) çok iyi çalışmaları,
- Kullanılan enzim miktarı, sıcaklık, pH ayarlanarak reaksiyon hızı ve oranının ayarlanabilir olması,
- İstenildiğinde çok kolay inaktif hale getirilebilmeleri,
- Yüksek ürün kalitesi, düşük maliyet ve daha az kayıp ile reaksiyonları gerçekleştirmeleri.

Enzimler kağıt endüstrisi, nişasta, deri işleme endüstrisi, fırıncılık, deterjan, atık imha ve tıbbi teşhis endüstrisi ile farmasötik ürünler gibi bir çok alanda kullanılmaktadır. Tablo 1’de farklı endüstri kollarında kullanılan bazı enzimler ve kullanım amaçları verilmiştir.

Tablo 1. Endüstride kullanılan enzimler ve kullanım alanları

Endüstri Alanı	Kullanılan Enzimler	Enzimin Kullanım Amacı
Çamaşır Deterjanları	Proteinaz (%91)	Protein temelli lekelerin giderilmesinde
	Lipaz (%6)	Katı ve sıvı yağların parçalanmasında
	Amilaz (%2)	Dirençli nişasta artıklarını temizlenmesinde
	Selülaz (%1)	Aşırı yıkama sonrası tüylenmeleri giderilmesinde
Nişasta Endüstrisi	Amilazlar, Amiloglukozidazlar, Glukoamilazlar	Niştayı glukoza ve diğer glukoz şuruplarına dönüştürmede
Süt Ürünleri Endüstrisi	Rennin	Peynir üretiminde
	Lipazlar	Küflü peynirin olgunlaşmasında
	Laktazlar	Laktozu glukoz ve galaktoza parçalamada
Tekstil Endüstrisi	Amilaz	Genellikle dokuma kumaşından nişastanın uzaklaştırılmasında
Maya Endüstrisi	Amilaz, Glukanaz, Proteinaz	Mayada bulunan protein ve polisakkaritlerin parçalanmasında
	Proteinaz	Biranın bulanıklığının giderilmesinde
	Amiloglukozidaz	Düşük kalorili bira üretiminde
	$\beta$ -Glukanlar	Filtrasyon özelliklerinin artırılmasında
Fırıncılık Endüstrisi	$\alpha$ -Amilaz	Un içerisindeki nişastanın parçalanmasında (ekmek üretiminde)
	$\beta$ -Ksilanaz	Ekmeğin kabarmasının ve kalitesinin artırılmasında
	Proteinaz	Un içerisindeki protein miktarının azaltılmasında (bisküvi üretiminde)
Deri Endüstrisi	Proteinaz (tripsin)	Derinin daha esnek hale getirilmesinde
Kağıt Endüstrisi	$\beta$ -Ksilanaz	Hamurun beyazlatılmasında
	Lipazlar	Kağıdın yapışkanlığının azaltılmasında
	Fitaz	Fitik asidin giderilmesinde
Yem Endüstrisi	Fitaz	Fitik asidin parçalanması ile fosfat kullanılabilirliğinin ve hayvan yemlerinin veriminin artırılmasında



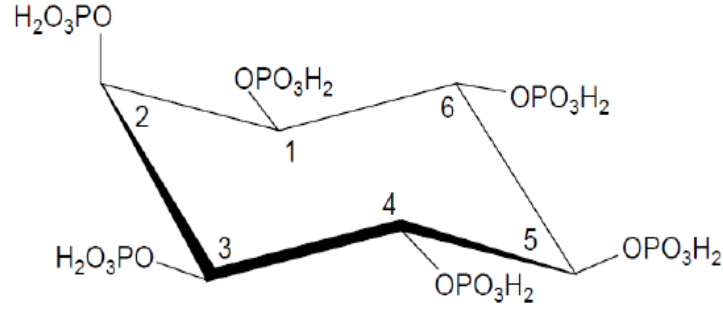
### 1.1.1. Mikrobiyal Enzimler

Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan birçok enzim mikrobiyal kaynaklıdır. Bununla birlikte çok az bir kısmı da bitkisel ve hayvansal kaynaklardan sağlanmaktadır. Enzim kaynağı olarak hayvansal kaynakların kullanılmasının daha pahalı olması ve bitkisel kaynakların da endüstriyel ham madde olarak kullanılmasından dolayı endüstri kollarının mikrobiyal kaynaklı enzimlere yönelmesini sağlamıştır. Enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların tercih edilmesinin diğer nedenleri ise, aktivitelerinin yüksek olması, bitki ve hayvan kaynaklarına göre daha geniş pH ve sıcaklık aralıklarında çalışabilir olmaları, yüksek oranda ve saflıkta üretilebilir olmalarıdır. Özellikle ekstrem pH ve sıcaklıklarda enzimlerin aktivite göstermesi endüstri için çok önemlidir (Wiseman, 1987). Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmalardan üretilmektedir (Wolfgang, 2004). Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlere örnek olarak amilaz, lipaz, selüloz, ksilanaz gibi karbohidrat parçalayan enzimler, alkalik proteazlar, diğer proteazlar verilebilir.

Enzimlerin endüstriyel kullanım alanlarına göre dağılımı incelendiğinde ise, %15'inin hayvan yemi endüstrisinde, %29'unun gıda sektöründe ve %56'sının genel teknik alanlarda kullanıldığı görülmektedir (Kirk vd., 2002; Schallmey vd., 2004).

### 1.1.2. Fitat ve Yapısı

Fitazın substratı olan fitik asit (*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hekzafosfat) baklagiller, tahıl, yağlı tohumlarda, meyvelerde %1-5 oranında bulunur. Özellikle buğday, pirinç, arpa, çavdar gibi bitkilerde ve fasulyede bulunur. Fitik asidin tuz formu olan fitat tahıl ve baklagillerde fosforun temel depo formudur ve toplam fosforun %80'den fazlasını içerir (Laboure vd., 1993). Fitatın büyük bir kısmı tahıl ve baklagillerin tohumlarında birikmektedir ve bu oran toplam fosforun %60'dan fazlasını oluşturmaktadır (Reddy vd., 1982). Ayrıca birçok bitkinin köklerinde, spor ve polenlerinde düşük miktarlarda fitat bulunabilmektedir.



Şekil 1. Fitik asit (*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hekzafosfat)'in yapısı

pH 0,5-9,0 aralığında inositol halkasının ikinci pozisyonundaki karbonuna, bir fosfat grubunun aksel pozisyonundan, diğer beş karbona da fosfat gruplarının ekvatoryal pozisyonundan bağlanması ile oluşan fitik asidin yapısı sterik olarak kararlı hale gelmektedir (Shamsuddin, 2002). Fitik asit ilk kez bitki tohumlarından izole edilmiş ve kalsiyum, magnezyum ve fosfor içeren, ancak azot içermeyen organik bir kompleks olduğunu belirtmiştir (Reddy vd., 1982).

Fitat insanlar ve geniş getiremeyen hayvanlar tarafından sindirilemediği ve etkin olarak kullanılmadığı için bu sistemler için anti-besinsel bir öğe olmaktadır. Bunun sebebi bu canlı sistemlerinde etkin bir fitaz enzimi üretimi olmamasıdır.

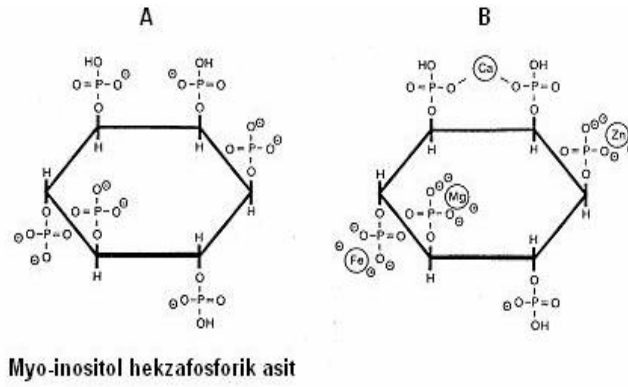
Fitik asidin tuz formu olan fitat, merkezinde *myo*-inositol halkasından uzanan altı fosfat grubundan dolayı negatif yüklü bir moleküldür. Bu özelliğinden dolayı  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$  gibi katyonları şelatlayıcı olarak rol oynar. Fitat ile divalent katyonların oluşturduğu kompleks, normal mide ve bağırsak sistemi pH'larında (pH 4,0-8,0 arasında) çözünürlüğü en düşük seviyededir. Bu durum, hayvanlar ve insanlarda bu minerallerin absorpsiyonu ve sindirimini olumsuz etkiler (Raboy, 2001). Bu özelliğiyle serbest mineral miktarını düşürür ve özellikle fitat ağırlıklı diyetlerde vücutta mineral eksikliğine sebep olur. Ayrıca bitkilerdeki fosforun başlıca depo kaynağı olan fitat insan ve bazı hayvanlar tarafından sindirilemediği için içerdiği fosfordan da yararlanılamaz. İlaveten fitik asit protein ve amino asitlerin sindirimi üzerinde de negatif bir etkiye sahiptir ve sindirim sistemi koşullarında fitat-protein kompleksleri oluşturarak pepsin ve tripsin gibi proteolitik enzimlerin aktivitesini engellemektedir. Bütün bu sebeplerden dolayı fitat gıda ve hayvan yemlerindeki besin değerini düşürücü faktör olarak kabul edilir (Kumar vd., 2010).

Fitik asitin olumlu bir özelliği ise serbest demir ile şelatlama yapmasıdır. Bu özelliği ile doğal bir antioksidan olarak bilinir (Laboure vd., 1993). Son zamanlarda, fitik asitin

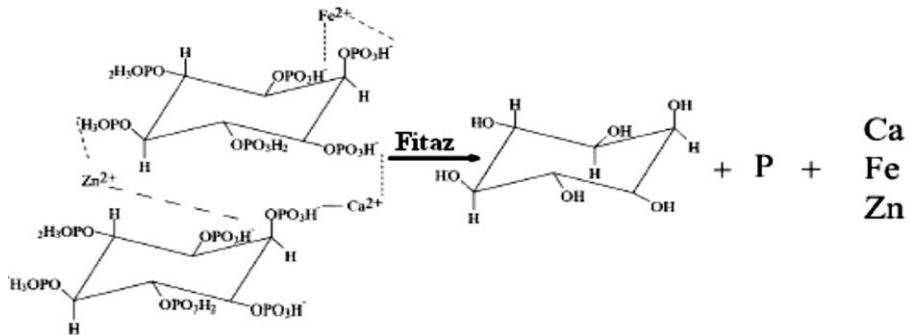
kanseri önleyici bir özellikte olup olmadığı hususunda araştırmalar yapılmış ve bu araştırmaların sonucunda, fitik asitin prostat, göğüs, pankreas ve kolon kanserlerine karşı bazı önleyici etki gösterdiği ortaya çıkmıştır. Fakat bunun mekanizması henüz anlaşılamamıştır.

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

Fitazlar son yıllarda beslenme ve çevre kirliliğinin azaltılması konularında dikkat çeken enzimlerden biri olmuştur. Fitazlar, bitki tohumlarında fosfatın temel depo formu olan fitatın daha az fosforillenmiş inositol fosfatlara ya da bazı durumlarda inositole sıralı hidrolizini katalizleyen fosfataz sınıfı enzimlerdir (Şekil 2 ve Şekil 3) (Kerovuo, 2000).



Şekil 2. Fitik asitin (A) ve fitik asit şelatının (B) yapısı



Şekil 3. Fitatın, fitaz enzimi ile inositol, fosfat ve diğer elementlere hidrolizi (Lei ve Porres 2003).

Fitatı parçalayan enzimler IUPAC-IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry) tarafından iki sınıfa ayrılmıştır: Fitatın D3 pozisyonundaki ortofosfatı uzaklaştıran 3-fitaz (myo-inositolheksakisfosfat 3-fosfohidrolaz, EC 3.1.3.8) ve myoinositol halkasındaki L-6 (D-4) pozisyonundaki defosforilasyonu sağlayan 6-fitaz (myo-inositolheksakisfosfat 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).

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 vd., 1997). İlk ticari fitaz enzimi Natuphos, *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 vd., 1993; Han vd., 1999) ve 1991 yılında piyasaya çıkmıştır.

Fitazlar bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan izole edilebilmektedir. Farklı özelliklere sahip fitazlar şu şekilde kendi içerisinde sınıflandırılır; Optimum pH'ya göre (alkali veya asidik fitazlar), katalitik mekanizmaların farkına göre (histidin asit fosfatazı (HAP),  $\beta$ - propeller fitaz, sistein fitaz veya "purple" asit fosfataz), fitat hidrolizinin stereospesifikliğine göre (3- ya da 6- fitaz) olarak gruplandırılır.

Fitazlar genelde 45-60 °C aralığındaki sıcaklıklarda aktivite gösterir. Fitazlar asidik pH'lardan alkali pH'lara kadar geniş bir aralıkta değişen optimum pH'ya sahiptir. Mikrobiyal fitazların çoğu 4,5-5,6 arasında optimum pH'ya sahiptir. Bazı bakteri fitazları (özellikle *Bacillus* suşları) 6,5- 7,5 arası optimum pH değerine sahiptir.

Bakteri ve funguslardan elde edilen fitazlar, Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ), optimum pH ve ısıl kararlılığı gibi fizikokimyasal özelliklerinde farklılık göstermektedir (Liu vd., 1998; Tambe vd., 1994). Bakteriyel fitazlar genelde funguslardan elde edilen fitazlara göre daha küçük moleküler ağırlığa sahiptir. Fungal fitazların molekül ağırlığı genellikle 80-120 kDa civarında iken bakteriyel fitazların 40-55 kDa civarındadır (Choi vd. 2001).

Son yıllarda yapılan çalışmalar özellikle tek mideli hayvanların beslenmesindeki fitata bağlı fosforun daha yüksek verimle kullanımını ve ayrıca bu hayvanların gübreleri ile çevreye atılan fosforun azaltılmasını amaçlamaktadır. Ayrıca, insanların beslenmesinde fitazın kullanılması besinle alınan fitata bağlı minerallerin serbest kalmasını ve insan sağlığına faydalı inositol fosfatların oluşumunu sağlar (Lei vd., 2007).

### 1.1.3.1. Fitazların Optimum pH'ya Göre Sınıflandırılması

Fitaz enzimleri optimum pH değerleri bakımından histidin asit fosfatazlar ve alkali fosfatazlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Histidin asit fosfotaz grubu enzimlerin optimum pH değerleri 5,0 civarında iken, alkali fosfataz enzimleri ise pH 8,0 civarında aktivite gösterir (Baruah vd., 2007). *Bacillus* dışında bir çok bakteri, fungus ve bitki fitazları geniş substrat özgülüğü olan histidin asit fosfataz (Selle vd., 2007) sınıfına ait olması nedeniyle, gıda endüstrisinde alkali fitazdan daha çok dikkat çekmiştir (Kumar vd., 2010).

Histidin asit fosfataz sınıfı üyelerinin tamamının aktif bölgesinde korunmuş bölge olarak RHGXRX dizilimi bulunur (Van Etten vd., 1991). Histidin asit fosfataz sınıfı geniş substrat spesifikliği gösterdiği asidik pH aralıklarında, metal içermeyen fitatı hidrolizlediği ve hidroliz sonucunda son ürün olarak *myo*-inositol monofosfatı oluşturduğu bildirilmiştir. Histidin asit fosfatazlara göre, substrat spesifikliği daha az olan alkalik fosfataz enzimlerinin kalsiyum fitata karşı oldukça spesifik olduğu ve hidroliz sonucu son ürün olarak *myo*-inositol trifosfatların oluşumunu katalizlediği bildirilmiştir (Oh vd., 2004).

### 1.1.3.2. Fitazların Katalitik Merkeze Göre Sınıflandırılması

Bitki, hayvan ve mikrobiyal canlılarda bulunan fitazlar, bu canlıların beslenme gereksinimini sağlamak adına, farklı substratları katalizlemek için yapısal değişimlere uğramışlardır. Günümüzde fitik asit hidrolizleyebilen dört fosfataz enzimi bilinmektedir. Bunlar; Histidin Asit Fosfataz (HAP),  $\beta$ -Propellar Fitaz (BPPHy), Sistidin Fosfataz (CP) ve Purple Asit Fosfataz (PAP). Bu enzimlerin her birinin farklı katalitik mekanizmaları ve kendine özgü özellikleri vardır (Lei vd., 2007).

#### 1.1.3.2.1. Histidin Asit Fosfataz (HAP)

HAP üyesi bütün fosfatazlar ortak bir mekanizmaya ve spesifik bir aktif bölgeye sahiptir. N-terminal aktif bölge RHGXRX ve C-terminal bileşeni HD'dir. Polipeptid zincirinin bu uzak kısımları uygun bir şekilde katlandığında iki aşamalı olan

fosfomonoesterlerin hidrolizini başlatan bir merkez oluşturacak şekilde birleşir (Van Etten vd., 1991).

Asit fosfatazların büyük kısmını oluşturan HAP'lar farklı substratları hidrolizleyebilir. Bu nedenle, HAP üyesi fosfatazların fitatı hidrolizleyebildiğinin belirlenmesi önemlidir. Fitat oldukça negatif yüklü olması nedeniyle, enzimin katalitik bölgesinin bu yapıya uyum sağlayabilecek özelliklere sahip olması gerekir. Bu nedenle, hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda, fitatı hidrolizleyebilen HAP'ların aktif bölgesi, substrat ile etkileşiminin kolaylaşması için asidik pH'larda çoğunlukla pozitif yüklüdür. Oh vd. (2004) fitatı hidrolizleyebilen HAP'ları etkin bir şekilde belirlemek için, histidin asit fitaz (HAPhy) terimini önermişlerdir. Hem ökaryotik hem de prokaryotiklerde histidin asit fitazlar HAPhy'ler olarak bilinir. En iyi karakterize edilen prokaryotik HAPhy *E. coli* fitazıdır (Greiner vd., 1993). HAPhy'ler ökaryotlarda birçok fungus izolatlarından klonlanmıştır (Mullaney vd., 2000). En çok çalışılan fungal fitazlar *Aspergillus niger* ve *Aspergillus fumigatus*'tur.

#### 1.1.3.2.2. $\beta$ - Propeller Fitazı (BPPhy)

$\beta$ -Proller fitaz (BPPhy) yeni bir sınıf olmakla birlikte diğer bilinen fosfatazlar ile benzerlik göstermemektedir (Kim vd., 1998; Kerovuo vd., 1998; Ha vd., 2000).  $\beta$ -propeller fitaz (BPPhy) ismi, moleküler yapısının belirlenip aydınlatılmasından sonra, yapısında bulunan  $\beta$ -tabakalar ve altı kanatlı bir pervaneye benzemesinden dolayı verilmiştir (Ha vd., 2000; Shin vd., 2001). BPPhy'ler ilk olarak *Bacillus* türlerinde olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonrasında bu enzimlerin hem katalitik faaliyetleri hem de termostabilitesi için  $Ca^{2+}$  iyonuna gereksinim duyduğu bulunmuştur. Bu gereksinim;  $Ca^{2+}$ 'nin fitata bağlanarak elektrostatik etkileri oluşturması sonucu substratın biyokatalitik dönüşüm için katalitik bölgeye bağlanabilmesi şeklinde açıklanır. Yapılan kinetik çalışmalar sonucunda BPPhy'lerin pH 7,0-8,0 aralığında kalsiyum fitatı hidrolizleyebildiği saptanmıştır (Oh vd., 2004). BPPhy'ler yapılarında katalitik mekanizmaları için iki temel bölge içermektedir. Biri substrata atakta bulunan "affinite bölgesi" diğeri ise fosfat gruplarının hidrolizlendiği "ayırma bölgesi"dir (Shin vd., 2001).

### 1.1.3.2.3. Sistidin Fosfataz (CP)

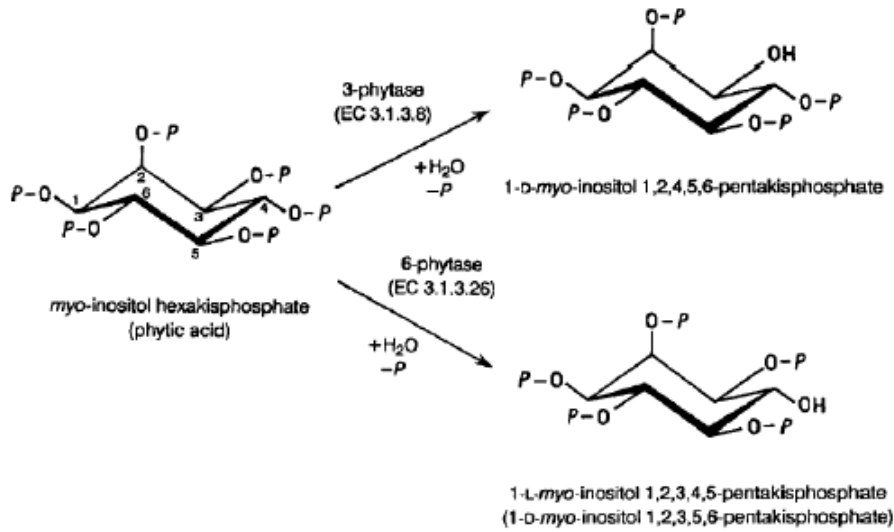
Rumendeki belirli mikroorganizmalarda tespit edilmiştir. Bu nedenle, ruminantlar fitik asidi hidrolizleyebilirken, tek mideli hayvanlar fitik asidi hidrolizleyemezler. Bu enzim anaerobik rumen bakterisi *Selenomonas ruminantium*'da saptanmıştır. Monomerik bir enzim olup, 46 kDa molekül ağırlığında, pH 4,0-5,5 ve 50-55 °C sıcaklıkta aktif olan bir enzimdir. Bu enzimin yapısı ne HAP'a ne de BPP'ye benzemektedir. Çünkü aktif bölgesinde HCXXGXXR(T/S) amino asit kalıntıları içermektedir (Lei vd., 2007).

### 1.1.3.2.4. Purple Asit Fosfataz (PAP)

Purple asit fosfataz, çimlenmekte olan soya fasülyesi tohumu ilk yapraklarından izole edilmiştir. PAP'lar aktif bölgesinde DXG..GDXXY.GNH(E,D)..VXXH..GHXH dizisine sahip olup, 7 tane metal bağlayan aminoasit kalıntısı içeren metalo enzimdir. Ayrıca; bitkilerde, hayvanlarda, funguslarda ve bakterilerde de saptanmıştır. Bitkilerde küçük monomerik proteinler (~35 kDa) ve büyük homodimerik proteinler (~55 kDa) olarak iki sınıfa ayrılmıştır. Diğer fitazlarla karşılaştırıldığında fitatı hidrolizleme yeteneği oldukça düşüktür (Lei vd., 2007).

### 1.1.3.3. Fitazların Stereospesifikliğine Göre Sınıflandırılması

IUPAC-IUB (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği ve Uluslararası Biyokimya Birliği) fitazı, fitat molekülünü hidrolizinin başladığı bölgeye göre iki sınıfa ayırmıştır (Selle vd., 2007). Bunlar, 3-fitaz (EC 3.1.3.8. veya *myo*-inositol hegzafosfat 3-fosfohidrolaz) ve 6- fitazdır (EC 3.1.3.26 veya *myo*-inositol hegzafosfat 6- fosfohidrolaz)



Şekil 4. Fitik asidin 3-fitaz ve 6-fitaz ile hidrolizi (Dvorakova, 1998).

3-Fitaz, *myo*-inositol hegzafosfat halkasındaki C 3 pozisyonundaki fosfor kalıntısını öncelikli olarak hidrolizleyerek, *D-my*o-Ins-1,2,4,5,6-pentafosfat ve ortofosfat oluşturur. 6-Fitaz ise, *myo*-inositol hegzafosfat halkasındaki C 6 pozisyonundan fosfatı öncelikli olarak hidrolizler ve hidroliz sonucunda *D-my*o- Ins-1,2,3,4,5-pentafosfat ve ortofosfat oluşur (Selle ve Ravindran, 2007). Mikrobiyal fitazlar genellikle 3-fitaz sınıfında yer alırken, bitkisel kökenli fitazlar 6-fitaz sınıfında yer almaktadır (Konietzny ve Greiner, 2002).

## 1.2. Fitaz Enziminin Kaynakları

### 1.2.1. Bitkisel Fitazlar

Fitaz aktivitesi hububat, bakliyat ve yağlı tohumlarda, günlük tüketilen meyve ve sebzelerde tespit edilmiştir (Phillippy ve Wyatt, 2001). Buğday, çavdar, arpa gibi bazı tahıllar yüksek miktarlarda fitaz aktivitesi gösterir. Bu tahılların ve ürünlerinin fitaz kaynağı olarak kullanıldığı hayvan beslenme çalışmaları mevcuttur (Han vd., 1997).

Bitkilerden elde edilen fitazlar genelde optimum pH'sı 4,5-6,0 ve optimum sıcaklığı 38-55 °C aralığında olan histidin asit fosfatazlardır. Histidin asit fosfotaz ailesindeki bitkisel fitazlar, genellikle 6-fitaz olarak kabul edilir. Yapılan çalışmalarda bazı bitkisel fitazların alkalik fosfataz ya da purple asit fosfataz olduğu saptanmıştır. Hegeman ve Grabau (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 alkali değerler gösteren bitkisel fitazlar da mevcuttur. Asidik bitki fitazları, pH 5,0, alkali fitazlar ise, pH 8,0 civarında optimum aktiviteye sahiptirler. Asidik fitazlara soya fasulyesi tohum fitazı (Gibson ve Ullah, 1988) örnek olarak verilebilir.

Alkali fitazlar *Lilium longiflorum* (Baldi vd., 1988) ve *Typha latifolia* (Hara vd., 1985) bitkilerinin farklı iki polen türünde tanımlanmıştır. Alkali fitazlar, asidik fitazdan farklı olarak, fitata oldukça spesifiktir ve üç ya da daha az ester grupları içeren *myo*-inositol fosfatları katalizleyemediği bildirilmiştir (Baldi vd., 1988).

### 1.2.2. Hayvansal Fitazlar

Fitaz aktivitesi çeşitli hayvan türlerinin dokularında tespit edilmesine rağmen, hayvansal kaynaklı fitazların hiçbirinin moleküler karakterizasyonu tamamlanmamıştır. 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 vd., 2002). Kalın bağırsak veya rumende bulunan fitaz aktivitesi esasen mikrobiyal kökenlidir (Yanke vd., 1998).

Bu fitazlar hayvanların bağırsak hücrelerinden izole edilmiştir. Tek mideli hayvanlarda besinsel fitazın kullanılabilirliğinin artırılması bakımından bakteriyel veya bitkisel kaynaklı gibi kaynaklardan elde edilen ve yem ile hayvana verilebilen fitazlar hem kullanılabilirlik hem de maliyeti üzerinden kıyaslandığında hayvansal fitazlar ihmal edilmiştir.

### 1.2.3. Mikrobiyal Fitazlar

Bu enzimler genellikle alkali fitazlar veya histidin asit fosfataz grubu fitazlardır. Çeşitli mikrobiyal fitazlar, hayvan yemi ilavesi olarak ticarileştirilmiştir (Lei vd., 2007). Fitaz enzimi bitkilerde, mikroorganizmalarda ve bazı hayvansal dokularda bulunmasına rağmen yapılan son araştırmalar mikrobiyal fitazların biyoteknolojik uygulamalar için en ümit verici olduğunu göstermiştir (Pandey vd. 2001; Vohra ve Satyanarayana, 2003).

Bakteri, maya ve funguslardan fitaz enzimleri karakterize edilmiş olup, günümüzde ticari olarak üretimde toprak fungusu olan *Aspergillus* üzerinde durulmaktadır. Ancak substrat spesifitesi, proteolizize 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 glikolizasyon farkı olduğu için fungal fitazlardan (80-120 kDa) daha küçüktür ve 40-55 kDa aralığındadır (Aşan, 2006).

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 vd. 2001; Kim vd., 1998). Mikrobiyal fitazların çoğunun sıcaklık optimumu ise 45-60 °C arasında yer almaktadır. Ancak Pasamontes vd.,1997a,b *A. fumigatus*'a ait sıcaklığa dirençli fitazın 100 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda 20 dakikalık inkübasyonlarda sadece %10'luk kayıpla aktivitesini koruduğu bildirilmiştir. Mikrobiyal fitazların bazı özellikleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Mikrobiyal fitazların bazı özellikleri (Aşan, 2006)

Fitaz Kaynağı	pH optimumu	Sıcaklık optimumu (°C)	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>Emmericella 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 lyicii</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>Panloea agglomerans</i>	4.5	60	23
<i>Citrobacter braaki</i>	4.0	50	3457
<i>Pseudomonas syringae</i>	5.5	40	769
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	4.0	45	-
<i>Bacillus subtilis</i>	6.5-7.5	55-60	9-15
<i>Bacillus amyloquelaciens</i>	7.0-8.0	70	20

### 1.3. Fitaz Enziminin Endüstride Kullanım Alanları

Fitazı parçalayan enzimlerle, yem ham maddelerinde ve insanlar için hazırlanan gıdalardaki fitat içeriğini azaltmak amacıyla özellikle son yıllarda birçok çalışma yürütülmektedir. Ayrıca bunların yanı sıra myo-inositol fosfatların hazırlanması, kağıt endüstrisi ve toprak iyileştirme alanlarında da fitaz enzimi kullanılmaktadır. Bu alanlarda kullanılan fitazlar hakkında aşağıda daha ayrıntılı bahsedilmiştir.

### 1.3.1. Fitaz Enziminin Hayvan Yemlerinde Kullanılması

Son zamanlarda, hayvan yemlerine enzim ilavesi ile yemlerin besin değerinin artırılması uygulamaları oldukça önem kazanmıştır. Fosfor hayvanların büyüme, üreme ve kemiklerdeki mineralizasyon için gerekli minerallerden biridir (Pandey vd., 2001). Domuz, kümes hayvanları, kuş ve balık gibi monogastrik hayvanlar sindirim sistemlerindeki düşük fitaz seviyesinden dolayı, fitik asidi metabolize edemezler ve dışkı ile atarlar (Han vd., 1999). Domuz ve kümes hayvan atıklarında büyük miktarlarda fosfor içeriğinin bulunması, bitkisel kaynaklı yem maddelerinde fitata bağlı fosforun kullanılabilirliğinin zayıf olduğunu göstermektedir (Selle vd., 2000). Yapılan son çalışmalar, yem üzerine enzim ilavesi ile fosfat kullanımının arttığını ve inorganik fosfat atılımının yaklaşık %50 kadar azaldığı gözlenmiştir (Li vd., 1997). Bazı kanatlı yem maddelerindeki toplam fosfor, fitat fosforu ve toplam fosfordaki fitat fosfor oranları Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Bazı kanatlı yem hammaddelerindeki toplam fosfor, fitat fosforu ve toplam fitat fosfor oranları (Aşan, 2006).

Yem Maddesi	Toplam P (g/kg)	Fitat-P (g/ kg)	Oran (%)
Tahıllar			
Arpa	3.21	1.96	61.0
Mısır	262	1.88	71.6
Sorgum	3.01	2.18	726
Buğday	3.07	2.19	71.6
Yağlı Tohum Küspeleri			
Kanola küspesi	9.72	6.45	66.4
Pamuk tohumu küspesi	1002	7.72	77.1
Soya fasulyesi küspesi	6.49	3.88	59.9
Yan Ürünler			
Pirinç kepeği	17.82	14.17	79.5
Buğday kepeği	1096	8.36	76.3

Gelişen rekombinant teknoloji teknikleri ve saflaştırma teknolojileri ile geçmişte yüksek maliyetli olan enzim üretimi günümüzde düşük maliyetlerle üretilebilmektedir. Ayrıca, mikrobiyal fitazların optimum pH’larının düşük olması ve bu sayede fitatın en çok

çözünür olduğu mide koşullarında çalışabilir olmaları, mikrobiyal fitazların yem uygulamalarında kullanımı yaygın hale getirmiştir (Campbell ve Bedford, 1992).

Birçok farklı kaynaktan elde edilen mikrobiyal fitaz ürünleri günümüzde ticari olarak kullanılmaktadır. Bunlar arasında yem katkısı olarak en yaygın olarak kullanılanları *A. niger* (3-fitaz), *Peniophora lycii* (6-fitaz) ve *Escherichia coli* (6-fitaz) fitazlarıdır. Kanatlı rasyonlarına fitaz, granül veya sıvı formda veya yüksek peletleme sıcaklığındaki (>80 °C) enzim denatürasyonu probleminde kaçınmak için peletleme sonrasında uygulanabilmektedir (Selle ve Ravindran, 2007).

Son yıllarda kanatlı, çiftlik hayvanları ve balık rasyonlarında mikrobiyal fitaz kullanımı ile ilgili bilimsel çalışmalar ve denemeler artmakta ve yem katkısı olarak yeni fitaz enzimleri araştırılmakta ve kullanılmaktadır.

Su ürünleri üretiminde, soya küspesi ve diğer bitki kökenli küspeler kullanılarak birçok çalışma yürütülmüştür (Mwachireya vd., 1999). Pahalı protein kaynakları yerine daha düşük fiyatlı bitkisel protein kaynakları kullanıldığında masraflarda önemli derecelerde azalmaların olabildiği bildirilmektedir. Balık üretim masraflarının %70'ini yem giderleri oluşturmaktadır (Rumsey, 1993). Kümes hayvanlarında olduğu gibi balıklarda yem maddeleri içerisindeki fitin fosforundan yararlanacak sindirim enzimine sahip olmadığından suda fosfor birikimi meydana gelmektedir. Bu nedenle fitaz su ürünleri üretiminde, hem düşük fiyatlı bitkisel kökenli maddelerin kullanımını artırmak hem de suda fosforu kabul edilebilir seviyede tutabilmek amaçları ile kullanılmaktadır (Aşan, 2006). Balık beslemesinde, yüksek seviyelerde bitkisel kökenli maddeler içeren yemlerde fitaz enziminin kullanılması ile ilgili birçok çalışma yürütülmektedir (Robinson vd., 1996, Mwachireya vd., 1999).

### **1.3.2. Fitaz Enziminin Gıda Sanayisinde Kullanılması**

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. Bazı bitkisel kökenli gıdalardaki kuru maddedeki fitat miktarı Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Bazı bitkisel kökenli gıdalardaki fitat miktarı (kurumaddede) (Aşan, 2006)

Gıda	Fitat (mg/g)
Karma unlu ekmek (%70 buğday, %30 çavdar)	0.4-1.1
Karma unlu ekmek (%70 çavdar, %30 buğday)	0-0.4
Buğday ekmeği	3.2-7.3
Mayasız buğday ekmeği	10.6-3.2
Çavdar ekmeği	4.3-8.2
Mayasız çavdar ekmeği	12.2-19.3
Yulaf kepeği	7.3-2.1
Mısır	9.8-21.3
Pirinç (kabuksuz, pişmiş)	1.2-3.7
Pirinç (kabuklu, pişmiş)	12.7-21.6
Sorgum	5.9-11.8
Nohut (pişmiş)	2.9-11.7
Börülce (pişmiş)	3.9-13.2
Soya fasulyesi	9.2-16.7
Mercimek (pişmiş)	2.1-10.1
Yeşil fasulye (pişmiş)	1.8-11.5
Yerfıstığı	9.2-19.7

Günlük diyetlerde fitat miktarının varlığı ile ilgilenilmesinin nedeni çinko, demir, kalsiyum, magnezyum, manganez ve bakır gibi minerallerin alınımındaki negatif etkisindedir (Konietzny ve Greiner 2003). Fizyolojik pH değerlerinde çözünmez mineral-fitat komplekslerinin oluşumu düşük mineral emiliminin temel nedeni olarak bildirilmektedir. Sindirim sisteminin üst kısmında sınırlı miktarda mikrobiyal popülasyonun olması ve fitatı hidrolize edici enzimlerin olmaması, fitatın çok sınırlı miktarda hidroliz olmasına neden olur (Iqbal vd. 1994). Gıda işleme ve hazırlama sırasında, fitat genel olarak, bitkilerde ve mikroorganizmalarda doğal olarak bulunan fitazlarla tamamen hidrolize olmamaktadır. Özellikle demir olmak üzere minerallerin yararlanımını artırmak için fitat çok düşük düzeylere indirilmelidir (Hurrell, 2003).

Fitaz enzimi yem katkısı 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.

### 1.3.3. Fitaz Enziminin *Myo*-İnositol Eldesindeki Önemi

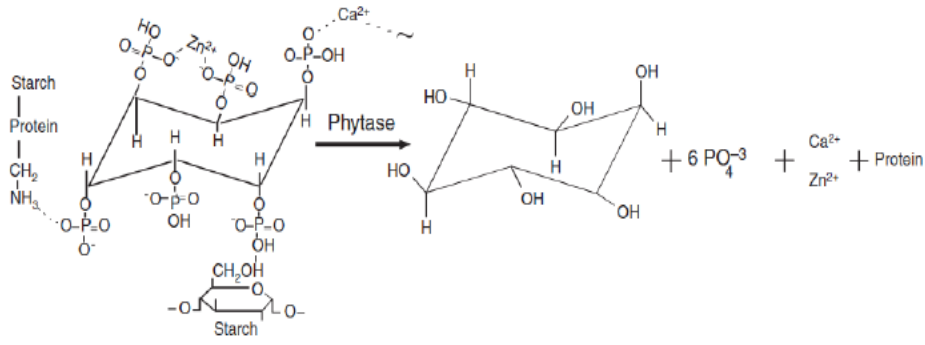
Günümüzde, transmembran sinyalizasyonunda ve hücreiçi kaynaklardan kalsiyumun hareketini sağlamada görev alan inositol fosfat ve fosfolipidlere olan ilginin artması, çeşitli inositol fosfatların hazırlanmasını gündeme getirmiştir (Billington, 1993). Genel olarak *myo*-inositol ve izomerleri veya biyokimyasal türevleri yüksek bitkiler, mikroorganizmalar ve memeli hücrelerinde önemli biyolojik fonksiyonlar yürütmektedirler. Beslenme ve metabolik fonksiyonlar için, esas formu *myo*-inositoldur. *Myo*-inositol fosfat esterleri insanlar için önemli fizyolojik özelliklere sahiptir (Shears, 1998). İnositol veya inositol fosfatların endüstriyel üretiminde, fitik asitten *myo*-inositol fosfat türevleri, serbest *myo*-inositoller ve inorganik fosfat eldesinde fitaz enzimi kullanımı önerilmektedir (Brocades, 1991). Bu nedenle fitaz enziminin gıda üretimi sırasında kullanılması ile fonksiyonel gıdaların üretilmesi mümkün olacak (Greiner vd. 2002) ve böylelikle fitaz enzimi ile biyokimyasal olarak aktif *myo*-inositol fosfat esterleri oluşacak ve insanlarda mineral maddelerin emilmesi de sağlanmış olacaktır.

Son zamanlarda elde edilen veriler, fitatın antikanser etkilerinin sinyal iletim yollarında ve tümör baskılayıcı genlerde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Greiner vd., 1997).

### 1.3.4. Fitaz Enziminin Protein Sindirimine ve Metabolik Enerjiye Etkisi

Fitatların hem yüksek hem de düşük pH değerlerinde proteinlerin bazik amino grupları ile çözünmez kompleks oluşturduğu bildirilmiştir. Bu durum, proteinlerin aktivitesini ve proteazların sindirimdeki fonksiyonlarını olumsuz etkiler (Kumar vd., 2010). Protein ile fitat etkileşimi hayvan besleme tekniklerinde ekonomik bir öneme sahiptir (Selle vd., 2000).

Yem maddelerinde meydana gelen protein-fitat komplekslerindeki proteinin fitaz yardımıyla serbest kalması ve böylece sindirim enzimleri üzerine fitatın olumsuz etkisinin azaltılması sağlanmış olur (Selle vd., 2000).



Şekil 5. Fitatın fitata bağlı fosfat gruplarını hidrolizi ile metalleri, metal bağlı enzimleri ve proteinleri serbest bırakması.

Fitat, hidrojen bağları aracılığıyla, nişasta ya da nişasta proteinlerine bağlanabilir (Laboure vd., 1993). Ayrıca fitatın, Ca<sup>2+</sup> iyonu ile kompleks oluşturmasının, amilaz aktivitesini inhibe ettiği düşünülmektedir (Selle vd., 2000). Karbohidratın biyolojik kullanılabilirliği üzerindeki olumsuz etkisinin yanı sıra, lipit kullanımını da negatif etkiler. Fitat, lipit ve lipit türevleri ile kompleks oluşturarak, lipofitin formunu oluşturur.

#### 1.4. Enzim Saflaştırılması

##### 1.4.1. Enzimlerin Saflaştırılma Amacı

Enzimatik reaksiyonlar genel bir anlatımla; bir enzimin, bir maddeyi (substratını) bir başka maddeye (ürüne) dönüştürdüğü reaksiyonlardır. Geçmiş çalışmalar göstermiştir ki, bir hücre enzim özütünün içerisindeki farklı enzimler ve kirleticiler istenilen enzimatik reaksiyonları araştıramaz ve anlayamaz hale getirir. Çünkü çalışılmakta olan enzim preparasyonları içerisinde, hedef olan enzimin %1'i kadar dahi başka bir enzimin bulunması, reaksiyon ortamında milyonlarca yabancı molekülün oluşmasına yol açabilmektedir.

Bir enzimin nasıl çalıştığını veya fizikokimyasal özellikleri ancak enzim saflaştırılması ile anlaşılabilir. Saflaştırma teknikleri ile ilk olarak 1930'lu yıllarda Otto Warburg tarafından yayınlanan çalışmalar ile hayata geçirilmiştir. Saf halde elde edilen enzimlerin, katalitik fonksiyonlarını yerine getirmelerini, regülatör sinyallere karşı nasıl cevap verdiğini ve hücre içerisinde nasıl bir form ve yapıda olması gerektiğini belirleyen enzim yapısı üzerinde çalışmalar yapılabilmektedir. Bu çalışmalar sonucunda glikoz



fermantasyonunda rol oynayan enzimler gibi birçok enzimin yapısı ve enzimatik reaksiyonları aydınlatılmıştır.

Elbette enzimlerin saflaştırılma oranları istenilen özelliklere göre değişmektedir. Özellikle endüstride kullanılacak olan enzimlerde tam bir saflık aranmayabilir. Bu amaçla maliyeti düşük basit saflaştırma teknikleri ile reaksiyon şartlarına uygun saflıkta enzim elde edilebilir.

#### 1.4.2. Enzim Saflaştırma Teknikleri

Bir enzimin saflaştırılmadan önce boyutu, yükü ve bağlanabilme özelliği gibi enzime özgü bazı özelliklerinin bilinmesi önemlidir. Bu özelliklerden yararlanılarak farklı türde saflaştırma teknikleri kullanılabilir (Nelson ve Cox, 2008).

Biyomoleküller bu özellikler kullanılarak kromatografik yöntemlerle saflaştırılabilirler. Kromatografik uygulamaların hem büyük hemde küçük boyutlu moleküller üzerindeki çalışmalarda kullanılabilmeleri saflaştırma proseslerinde çok fazla tercih edilmelerine neden olmuştur. Ayrıca, kromatografi mümkün olan en az denatürasyona sebep olarak çok küçük miktarlarda madde izolasyonuna olanak sağlar. Enzimlerin kendilerine özgü özelliklerine göre kullanılabilen başlıca kromatografik teknikler Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Özelliklerine göre protein saflaştırılmasında kullanılan kromatografi teknikleri

Özellik	Teknik
Boyut	Jel fitrasyon (boyut ayırma) kromatografisi
Yük	İyon değişim kromatografisi
Hidrofobiklik	Hidrofobik etkileşim kromatografisi
	Ters faz kromatografisi
Ligand spesifikliği	Affinite kromatografisi

Çalışmanın amacına uygun bir şekilde kullanılacak saflaştırma metodları ne kadar saflıkta enzime ihtiyaç duyulduğuna bağlı olarak tercih edilir. Bazı teknikler yüksek hacim ve yüksek protein derişimine izin verebilecek yapıda olurken, bazıları sınırlı kapasitelere sahiptir. Bu bağlamda, amonyum sülfat ile çöktürme ve adsorpsiyon kromatografisi gibi

yüksek yüksek kapasiteli teknikler saflaştırma basamaklarının erken aşamalarında tercih edilirken, jel filtrasyon gibi düşük kapasiteli teknikler ise saflaştırma prosedürünün sonuna doğru kullanılmaktadır. Günümüzde en fazla tercih edilen saflaştırma tekniklerinin başında ise kolon kromatografisi teknikleri gelmektedir. Basit bir anlatımla bu yöntemlerde, dik pozisyonda yerleştirilen ve içerisine durgun fazın istiflendiği kolon, bu kolon içerisinden ise sabit bir hız ve konsantrasyonda geçen hareketli faz yardımıyla kolona uygulanan protein karışımı bileşenlerinin kolona bağlanması veya kolonu farklı zamanlarda terk etmesinden yararlanılarak bir ayırım gerçekleştirilir. Kolon sonunda fraksiyonlar halinde toplanan örneklerde proteinlerin varlığı belirlenerek ayırımın gerçekleştiği saptanabilir.

Saflaştırma işlemlerinde, ortamdaki proteinlerin saflığı protein saflaştırma protokolünün her bir basamağından sonra fraksiyonun özgül aktivitesinin ve saflaştırma katsayısının belirlenmesi ile takip edilir. Bunu belirlemek için ise hem toplam protein miktarının belirlenmesi hem de enzimin aktivitesinin belirlenmesi için gerekli teknikler gerekmektedir. Çok küçük miktarlardaki örneklerle çalışıldığı durumlarda ise protein miktarının ve aktivitesinin belirlenmesi daha da zor olabileceğinden, daha özgül ve duyarlı olan tekniklerin kullanılması için sistemin yeniden kurulması gerekebilir. Bu tekniklerden en yaygın olarak kullanılanlardan birisi jel elektroforezidir. SDS-PAGE yöntemi ise bunlardan en çok tercih edilenidir. PAGE tekniği basit olmasının yanı sıra, tekrarlanabilir sonuçlar vermesi ve yüksek çözünürlüğe sahip olması nedeni ile sıklıkla kullanılmaktadır. Bu teknik aynı zamanda, kompleks protein karışımlarının ayrıştırılmasında da kullanılabilir.

Enzimleri doğal kaynaklarından özütlenmesinden başlayarak saflaştırmanın son basamağına kadar uygulanan her saflaştırma aşamasında bir miktar aktivite kaybı gözlenir. Bunun nedeni ise enzimlerin saflaştırma proseslerinde denatürasyona neden olan faktörlere maruz kalmasıdır. Enzimlerin denatürasyonuna neden olan başlıca faktörler;

- Aşırı yüksek veya düşük pH,
- Yüksek sıcaklık,
- Organik çözücüler,
- Deterjanlar,
- Ağır metaller,
- Katotrofik tuzlar ve H bağları ile hidrofobik etkileşimleri yıkan ajanlar.

Özellikle ekstrasellüler enzimler doğası gereği değişik çevresel faktörlere çok fazla maruz kaldığından saflaştırma basamaklarında kısmen de olsa denatürasyona karşı dirençlidirler.

### 1.5. Çalışmanın Amacı

Isıl kararlı enzimler oldukça yüksek özgünlüğe sahiptirler ve bu sebeple birçok endüstriyel uygulama için potansiyel oldukları düşünülmektedir. Bu tip enzimler yiyecek, kâğıt, deterjan, ilaç ve hayvan yemlerinin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tür enzimleri termofilik mikroorganizmalardan elde edebilmek mümkündür. Bu tür kararlı enzimlere endüstride duyulan ihtiyaç, gelecekte bu enzimlerin geliştirilmesi ve uygulama alanlarının genişletilmesini oldukça önemli hale getirmektedir (Gupta vd.,2003).

Termofilik organizmalar üzerinde yapılan çalışmalar sonucu bu organizmalardan elde edilen enzimlerin mezofilik analoglarına göre daha kararlı olduğu keşfedilmiştir. Hücre içi enzimlerin aksine, hücre dışına salınan enzimlerin kararlılığı yüksek olup, çevre koşullarında aktivitelerini uzun süre koruyabilirler(Woese vd., 1990). Bu nedenle termofilik bakterilerden enzim izolasyonuna, saflaştırılmasına ve karakterizasyonuna duyulan ilgi gün geçtikçe giderek artmaktadır.

Bu çalışmada KTÜ Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Kadriye İNAN tarafından Aydın Germencik Ömerbeyli jeotermal sahasından izole edilen 7 farklı *Geobacillus* termofil bakteri türünün,(*Geobacillus sp.* TF1, TF12, TF14, TF16, TF17, DF20 ve *Geobacillus thermodenitrificans* TH2), fitaz aktivitesi açısından incelenmesi, biyokimyasal özellikler açısından en iyi özellikli enzimi üreten organizmanın belirlenmesi, bu organizmanın ürettiği enzimin saflaştırılması, karakterizasyonu ve enzimin endüstride kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Materyaller

#### 2.1.1. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Firma	Model
Spektrofotometre	Perkin Elmer	Lambda 25
Santrifüj	Hettich Zentrifugen	Rotina 35 R
Protein Elektroforezi	BIO-RAD	Mini-PROTEAN Tetra System
Mikrosantrifüj	Sigma	1-14
Jel Görüntüleme Sistemi	Kodak	Gel Logic 200 Imaging System
Isıtıcı	HS31	Chiltren
Saf Su Cihazı	Sartorius	Arium 611UV
Hava Banyolu Çalkalayıcı	Barnstead/Lab-Line	MaxQ Mini 4450 Shaker
pH Metre	InoLab	WTW pH 720
Otoklav	Tomy	SS-325
Buz Makinesi	Hoshizaki	FM-80EE
Vorteks	Thermolyne	Type 37600 Mixer
Buzdolabı	Profilo	BD4303ANFE
Terazi	Ohaus	Pioneer
Derin Dondurucu (-30°C)	Regal	RDD-1280
Steril Kabin	Tezsan	-
Magnetik Karıştırıcı	HS31	Chiltren
Güç kaynağı	Thermo	EC 1000XL
Otomatik Pipet(1-10µL/100-1000µL/1000-5000µL)	Acura 825	Socorex
Diyaliz torbası	Sigma-Aldrich	MWCO-Molecular Weight Cut Off 12.000 Da.
Peristaltik Pompa	TRIS	Teledyne
Toplama Ünitesi ve UV Dedektör	ISCO	Retriever 500
Su Banyolu Çalkalayıcı	Memmert	WBU 45

## 2.1.2. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

### 2.1.2.1. Kullanılan Mikroorganizma

Çalışmada kullanılan termofilik mikroorganizmalar *Geobacillus sp.* TF16 kültür stokları KTÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Grubundan temin edilmiştir.

### 2.1.2.2. Kimyasallar

Sodyum asetat, asetik asit, askorbik asit, amonyum molibdat, trikloroasetik asit, amonyum monovanadat, etilendiamintetra asetik asit (EDTA), magnezyum klorür, tris(hidroksimetil) amino metan (TRIS), benzoik asit, hidrojen klorür, glisin, divalent  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve trivalent  $Al^{3+}$  iyonlarının klorür tuzları Merck A.G.'den temin edildi.  $CaCl_2$ , Tween 20, Triton X100, Triton X114 deterjanı, fenilmetilsülfonilflorür (PMSF), sığır serum albumin (BSA), sodyumdodesil sülfat (SDS), sülfosalisilik asit kimyasalları Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA)'dan temin edildi.

### 2.1.2.3. Sıvı ve Katı Besiyerleri

Luria-Bertani Besiyerinin (LB) hazırlanması: 10,0 g bakto-tripton, 5,0 g maya ekstrağı ve 5,0 g NaCl yaklaşık 990 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile titre edilerek 7,5'e ayarlandı. Sonra çözeltinin hacmi 1000 mL'ye tamamlandı ve 121 °C'de, 1 atm basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi (Sambrook vd.,1989).

Luria-Bertani Agar (LB Agar) Besiyeri: 10,0 g bakto-tripton, 5,0 g maya ekstrağı ve 5,0 g NaCl yaklaşık 990 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N NaOH ile 7,5'e ayarlandı. Hacmi 1000 mL'ye tamamlanan çözeltiye 15,0 g agar ilave edilip 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 20 dakika steril edildi (Sambrook vd.,1989).

%10'luk buğday unu ekstrağı: 100 g buğday unu 1 L su içinde 120 °C'de 60 dakika otoklava bırakıldı. Daha sonra 4 kat tülbent bezinde süzüldü.

Enzim Üretiminde kullanılan sıvı besiyeri (Unlu besiyeri): Enzim üretimi için kullanılan besiyeri Powal ve Jagannathan, 1982'de modifiye ettikleri besiyeri

kullanılmıştır. Bileşenleri Tablo 7’de verildi. pH 6,0-6,2’ye ayarlandı ve üzerine 2 g CaCl<sub>2</sub> ilave edildi. Hazırlanan besiyeri 120 °C’de 20 dakika otoklavlandı.

Tablo 7. Unlu besiyeri bileşenleri

Bileşimi	1 L besiyeri için miktarlar
%10’luk buğday unu ekstraktı	1 L
Magnezyum Sülfat (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0,2 g
Kazein	1 g
Potasyum dihidrojenfosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,5 g
Dipotasyum hidrojenfosfat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0,4 g
Amonyum Sülfat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,4 g

Buğday unu- agar besiyeri : %10 sıvı buğday unu ekstraktı ve %1,5 agar içeren besiyeri 20 °C’de 20 dakika otoklavlandı.

Fitatlı Besiyeri (zimogram testi): Fitaz pozitif organizmaların belirlenmesi amacıyla kullanılan ve Kerovuo ve arkadaşlarının (1998) geliştirdikleri yöntem kullanılmıştır. Besiyerinde kullanılan kimyasallar oranlarıyla birlikte Tablo 8’de verilmiştir. Besiyerinin pH’sı 7,0’a ayarlanmıştır.

Tablo 8. Fitatlı besiyerinin bileşenleri

Bileşimi	(g/L)
D-glukoz	20
Sodyum fitat	4
Kalsiyum klorür (CaCl <sub>2</sub> )	2
Amonyum nitrat (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	5
Potasyum klorür (KCl)	0,5
Magnezyum sülfat (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0,5
Demir sülfat (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0,01
Mangan sülfat (MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0,01
Agar	15

#### 2.1.2.4. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

##### 2.1.2.4.1. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- Coomassie Brilliant Blue G250 Çözeltisinin Hazırlanışı: Coomassie Brilliant Blue G250'nin 100 mg'ı 50 mL %95'lik etil alkolde çözüldü. Hazırlanan çözelti 100 mL %85'lik ortofosforik asitle karıştırıldı ve hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlandı. Boya çözeltisi daha sonra çözünmeyen boya kalıntılarını uzaklaştırmak için süzüldü.
- Protein Standartlarının Hazırlanışı: Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. BSA'nın 250 µg/mL'lik stok çözeltisi hazırlandı ve -20 °C'de saklandı. Her denemeden önce standart çözeltiler bu stoktan 5-100 µg/mL aralığında olacak şekilde seyreltilerek hazırlandı.

##### 2.1.2.4.2. Protein Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

- Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 45,42 g Tris 200 mL saf suda çözüldü, pH'sı 8,8'e ayarlandı, hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Yığıma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 30,28 g Tris 200 mL saf suda çözüldü, pH'sı 6,8'e ayarlandı, hacmi 250 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- SDS Çözeltisi (%10): 10 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 1 g APS saf suda çözülüp hacmi 10 mL'ye tamamlandı ve hazırlanan çözelti -20 °C'de saklandı.
- N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED): Orijinal şişesinden kullanıldı.
- Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30): 29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrilamid saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve 4 °C'de saklandı.
- Gliserol Çözeltisi (%80): 80 mL gliserolün hacminin saf su ile 100 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Bakteri stoğu hazırlamak için kullanılacaksa otoklavda steril edildi.
- Bromofenol Mavisi (%0,1): 10 mg bromofenol mavisi saf suda çözüldü ve hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

- SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi: 150  $\mu$ L 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 400  $\mu$ L %10 SDS, 100  $\mu$ L %0,1 bromofenol mavisi, 250  $\mu$ L %80 gliserol ve 60  $\mu$ L  $\beta$ -merkaptoetanol'ün karıştırılması ile hazırlandı ve küçük kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.
- SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g Tris ve 1,5 g glisin yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra üzerine 10 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edildi. pH 8,3'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
- Jel Boyama Çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Blue R250'nin 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde çözülmesi ile hazırlandı.
- Boya Uzaklaştırma Çözeltisi: 100 mL glasiyal asetik asit, 400 mL metanol ve 600 mL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlandı.

#### 2.1.2.4.3. Tampon Çözeltiler

- Glisin-HCl Tamponu (50 mM, pH 2,2): 0,187 g Glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 N HCl ile 2,2'ye ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- A Çözeltisi (0,1 M sitrik asit monohidrat): 5,253 g sitrik asit monohidratın saf su ile çözülüp hacminin 250 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- B Çözeltisi (0,2 M disodyum hidrojen fosfat dihidrat): 8,90 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'nun saf su ile çözülüp hacminin 250 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 3,0): 80,3 mL A çözeltisi ile 19,7 mL B çözeltisi karışımından 20,8 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 4,0): 62 mL A çözeltisi ile 38 mL B çözeltisi karışımından 18,1 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 5,0): 49 mL A çözeltisi ile 51 mL B çözeltisi karışımından 16,6 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.



- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 6,0): 37,4 mL A çözeltisi ile 62,6 mL B çözeltisi karışımından 15,3 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Mcilvaine Tamponu (50 mM, pH 7,0): 19 mL A çözeltisi ile 81 mL B çözeltisi karışımından 13,8 mL alınıp saf su ile hacminin 50 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı.
- Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 8,0): 0,187 g Glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 M NaOH ile 8,0'e ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 9,0): 0,187 g Glisin yaklaşık 45 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 M NaOH ile 9,0'a ayarlandı ve hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
- Sodyum Asetat Tamponu (50 mM pH 4,0): 6,80 g Sodyum asetat trihidrat yaklaşık 950 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1N HCl ile 4,0'a ayarlandı ve hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.

#### **2.1.2.4.4. Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

- Substrat çözeltisinin hazırlanışı: 100 mL 50 mM Sodyum Asetat (pH 4,0) çözeltisi içerisinde 2 mM Na-fitat ve 2 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  karıştırıldı (Kim vd. 1998).
- 6 N Sülfirik asit çözeltisinin hazırlanışı: 16 mL Sülfirik asit alındı ve distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- %2,5'lik Amonyum molibdat çözeltisinin hazırlanışı: 2,5 g Amonyum molibdat tartıldı ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- %10'luk Askorbik asit çözeltisinin hazırlanışı: 10 g Askorbik Asit tartıldı ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- Boyar maddenin hazırlanışı: sırasıyla 1:1:1 (6 N sülfirik asit: %2,5 amonyum molibdat: %10 askorbik asit) ve 2 birim distile su karıştırılarak aktivite için renk reaktifi hazırlandı.
- Reaksiyon sonlandırma çözeltisinin hazırlanışı: %15 TCA (Trikloroasetik asit) durdurucu çözelti olarak kullanıldı. 15 g TCA 100 mL'ye tamamlanacak şekilde distile suda çözüldü.

#### 2.1.2.4.5. Diğer Çözeltiler

- %1'lik ve %10'luk Triton X100 çözeltisinin hazırlanması: %1'lik için 1 mL, %10'luk için 10 mL Triton X100 alındı ve saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- %1'lik ve %10'luk Triton X114 çözeltisinin hazırlanması: %1'lik için 1 mL, %10'luk için 10 mL Triton X114 alındı ve saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- %1'lik ve %10'luk Tween 20 çözeltisinin hazırlanması: %1'lik için 1 mL, %10'luk için 10 mL Tween 20 alındı ve saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- $\text{Na}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  metallerinin klörür tuzlarından 100 mM stok çözelti hazırlanarak uygun konsantrasyonda seyreltilerek kullanıldı.
- Soya sütünün Hazırlanışı: 100 gr soya fasülyesi 12 saat suda bekletildi ve süzüldü. Süzülen soya fasülyeleri blender ile öğütülerek un haline getirildi. Öğütülen 100 g soya 1 L saf su içine alınarak 20 dakika otoklav edildi. Otoklav sonunda alınan karışım tülbent ile süzüldü. Süzüntü bir şişeye alınarak çalışmalarda kullanılmak üzere 4 °C'de saklandı.

## 2.2. Deneysel Çalışmalar

### 2.2.1. Petri Testi

Bu çalışmada, *Geobacillus sp.*TF1, *Geobacillus sp.* TF12, *Geobacillus sp.* TF14, *Geobacillus sp.* TF16, *Geobacillus sp.* TF17, *Geobacillus sp.* DF20, *Geobacillus sp.* TH2 olarak tanımlanan 7 farklı *Geobacillus* termofilik bakteri suşu fitaz enzimi üretip üretmedikleri açısından test edildi. Bu amaçla petri testi yapıldı. Fitatlı besiyeri steril edildikten sonra uygun büyüklükteki petriye döküldü. Agarlı besiyeri katılaştıktan sonra steril pipet ucu ile petride 7 kuyucuk açıldı. Bu kuyucuklara bakterilerin LB besiyerinde hazırlanmış gece kültürlerinden 10 µL aşılama yapıldı. Petri 55 °C de 4 gün büyümeye bırakıldı. Oluşan aktivite zon çapları kumpas ile ölçüldü.

### 2.2.2. Optimum İndükleme Süresinin Belirlenmesi

Fitaz enziminin elde edilip saflaştırılacağı bakteri suşunun optimum indükleme süresini belirlemek amacıyla *Geobacillus sp.* TF16 bakterisinin LB besiyerinde gece kültürü hazırlandı. Fitaz indüklemesi için gece kültürleri unlu besiyeri ortamına aktarıldı ve 55 °C’de büyümeye bırakıldı. 55 °C’de büyüyen bakterilerden 24 saat ara ile 8 gün boyunca örnekler alınarak ham enzim özütleri elde edildi. Aktivite tayin prosedürüne göre enzim aktiviteleri belirlendi. Spesifik aktivite değerleri hesaplanarak çalışmada kullanılacak olan inkübasyon süresi tayin edildi.

### 2.2.3. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması

*Geobacillus sp.* TF16, 3 mL LB besiyerine gliserol stoğundan 50 µL ilave edilerek gece kültürü hazırlandı. Hazırlanan gece kültürleri 50 mL unlu besiyerine aktarıldı ve 55 °C’de 100 rpm’deki hava banyolu çalkalayıcıda dört gece büyültüldü. Büyültülen bakteri hücreleri, 4 °C’de 20.000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant ham enzim özütü olarak kullanıldı.

### 2.2.4. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Fitaz aktivitesi tayini için substrat olarak sodyum fitatın kullanıldığı kolorimetrik yöntem kullanıldı. Her denemede substrat ve boya reaktifi taze olarak hazırlandı. Aktivite denemeleri optimum sıcaklık ve pH değerleri belirlendikten sonra optimum şartlar altında gerçekleştirildi. Deney koşulları Tablo 9’da gösterilen şekilde gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda reaksiyon 0,6 mL %15’lik (g/mL) trikloroasetik asit (TCA) ile enzim denatüre edilerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra karışıma 0,6 mL renk reaktifi ilave edilerek (1:1:1:2 oranında, 6 N sülfirik asit: %2,5 amonyum molibdat: %10’luk askorbik asit: saf su) oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Örnekler 625 nm’de köre karşı absorbansları spektrofotometre ile ölçüldü.

Tablo 9. Enzim aktivitesi belirlenmesinde kullanılan reaktifler ve hacimleri

Reaktifler	Kör (µL)	Örnek(µL)
Sodyum fitat	450	450
Fitaz enzimi	-	150
Tampon ( 50 mM)	150	-
Trikloroasetik asit (TCA)	600	600
Boya Reaktifi	600	600
Toplam Hacim	1800	1800

Enzim ünitesi (U), optimum deney koşullarında 1 mL reaksiyon karışımında, 1 dakikada 1 µmol sodyum fitattan inorganik fosfatın açığa çıkmasını sağlayan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir.

Enzim karakterizasyon çalışmalarının tümünde, bu enzim ünitesi kullanılmıştır. Fitaz enziminin aktivite hesaplamaları aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır.

$$Aktivite = \frac{Pi(\mu M) * V\tau(mL)}{t(dk) * V\epsilon(mL)} = U/ml$$

$$Spesifik Aktivite = \frac{Aktivite \left(\frac{U}{mL}\right)}{mg \text{ protein}/mL} = U/mg \text{ protein}$$

Pi : İnorganik fosfat konsantrasyonu

Vτ : Total reaksiyon hacmi

t : İnkübasyon süresi

Vε : Reaksiyon karışımındaki enzim miktarı

### 2.2.5. Fitaz Aktivitesi İçin Standart Kalibrasyon Grafiği ve Hazırlanışı

Standart grafiğinin belirlenmesi için Tablo 10'da belirtildiği gibi hazırlanan örneklerin her birinden 1 mL tüplere alındı ve 1,5 mL renklendirme çözeltisi ilave edildi. Vortekslenen karışımların absorbansı 625 nm dalga boyunda, spektrofotometrede köre karşı ölçüldü. Fosfat konsantrasyonuna (µg/mL) karşı okunan absorbans değerleri çizilerek kalibrasyon grafiği oluşturuldu.

Tablo 10. Fitaz aktivitesi tayini için kalibrasyon grafiği hazırlanması

	Kör	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5
ddH <sub>2</sub> O (mL)	5	4,95	4,9	4,75	4,5	4,25
Stok çözelti (mL) (50 µg/mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0	0,05	0,1	0,25	0,5	0,75
Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu (µg/mL)	0	0,5	1	2,5	5	7,5

- Renklendirme Çözeltisinin Hazırlanışı

Çözelti 1: 93,7 mL distile su içerisine 5,73 mL sülfirik asit (%96'lık) ilave edilerek %5,5 (v/v) sülfirik asit çözeltisi hazırlandı.

Çözelti 2: 2,5 g amonyum molibdat uygun oranda çözelti 1'de çözünmüş ve son hacim çözelti 1 ile 100 mL'ye tamamlandı.

Çözelti 3: 2,5 g demir sülfat uygun oranda distile suda çözülmüş ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. İçerisine 1-2 damla sülfirik asit ilave edildi.

Dört hacim çözelti 2, bir hacim çözelti 3 ile karıştırılarak renklendirme çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti deney öncesinde taze olarak hazırlandı.

### 2.2.6. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Tüm çalışma boyunca, protein tayini Bradford protein tayin yöntemi kullanılmıştır (Bradford, 1976). Coomassie Brilliant Blue G-250 negatif yüklüdür, bu durumda kırmızı renklidir. 470 nm'de maksimum absorbands verir. Boya proteindeki pozitif yüklü gruplara bağlandığında mavi renk alır ve 590 nm'de maksimum absorbands verir. Bradford yöntemine göre protein tayini yapılırken kullanılan çözeltiler ve standartlar aşağıda verildiği gibi hazırlandı (Tablo 11).

Tablo 11. Bradford protein tayini pipetleme tablosu

BSA (250 µg/mL)	4 µL	8 µL	16 µL	32 µL	48 µL	64 µL	80 µL
Saf Su (Steril) (µL)	196	192	184	168	152	136	120
Coomassie Brilliant Blue G 250 (mL)	1	1	1	1	1	1	1

Hazırlanan standart çözeltilerden tüplere 100'er µl aktarıldı, köre ise 100 µl ultrasaf su eklendi. Bütün tüplere 5'er mL hazırlanan Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltilerinden eklendi ve karıştırıldı. İki dakika sonra standartlar 595 nm dalga boyunda köre karşı okundu ve protein standart grafiği çizildi.

Ham enzim ortamında ve saflaştırma işlemlerinin her basamağında protein tayini yapıldı. Protein konsantrasyonları standart olarak kullanılan sığır serum albümini (BSA) kullanılarak konsantrasyona karşı absorban grafiğinin formülünden bilinmeyen protein konsantrasyonu hesaplandı.

### 2.2.7. SDS-PAGE Elektroforezinin Uygulanması

Jelin hazırlanışı: Elektroforez camları kirliliklerin giderilmesi ve jelin sızması için etil alkol ile silindi. Daha sonra cam levhalar elektroforez sistemine yerleştirildi. Tablo 12'de oranları verilen %8'lik ayırma jeline TEMED ilave edilerek polimerleşme başlatıldı. Polimerleşmenin başlatılmasıyla birlikte hazırlanan jel cam levhalar arasına döküldü hava ile teması kesildi. 1 saat kadar polimerleşmenin tamamlanması beklendi. Bu süre sonunda jelimizin üzerine %5'lik yığma jeli hazırlandı ve döküldü. Cam levhaya dökülen yığma jelimizin üzerine kuyucuklar oluşturmak için taraklar kondu ve hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Yığma jelinin içeriği Tablo 12'de verildi.

Tablo 12. Elektroforez jeli için kullanılan madde miktarları

Bileşenler	%5'lik Yığma Jeli	%8'lik Ayırma Jeli
Saf Su	2,7 mL	4,6 mL
%30'luk akrilamid/bisakrilamid	0,67 mL	2,7 mL
1,5M Tris Tamponu (pH 8,8)	--	2,5 mL
1,5M Tris Tamponu (pH 6,8)	0,5 mL	--
%10'luk Amonyum persülfat	0,04 mL	0,1 mL
SDS (%10 w/v)	0,04 mL	0,1 mL
TEMED	0,005 mL	0,006 mL

Örneklerin hazırlanışı ve jele uygulanışı: Jele uygulanacak olan örnekler ve standart, örnek tamponuyla uygun seyreltmeler yapılarak termoblok'ta 95 °C'de 5 dakika bekletildi. Jel üzerindeki tarak çıkartılarak, jel tamamen tampon içerisinde kalacak şekilde

elektroforez kütetine yerleştirildi ve kuyucuklara örnekler yüklendi. Güç kaynağı ile jelle 100 V 30 mA elektrik akımı verilerek proteinlerin ayrışma işlemi gerçekleştirildi.

Jelin boyanması: Cam plakalar arasından çıkartılan jelin boyanması için Coomassie Brilliant mavisi kullanıldı. Jel, boya ile 10 dakika ve 70 rpm'de çalkalanarak muamele edildi. Boyamadan sonra jeldeki fazla boya yıkama çözeltisi ile 70 rpm'de bantlar görünür hale gelene kadar yıkandı.

SDS-Page Elektroforez sonucunda jel üzerinde görünen tek bant ile fitaz enzimi belirlendi. Jel üzerindeki standartların ve enzimin yürüme mesafeleri ölçüldü. Enzim ve standartların  $R_f$  değerleri aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$R_f = \frac{\text{Örneğin aldığı yol}}{\text{Boyanın aldığı yol}}$$

Standartların molekül ağırlıklarının logaritması alındı ve  $R_f$  değerlerine karşı grafik çizildi. Elde edilen standart grafiğın denkleminde yararlanılarak enzimin molekül ağırlığı saptandı.

### **2.2.8. Fitazın Saflaştırılması**

Unlu besiyeri içerisinde büyütülen bakterilerin ürettiği ekstraselüler fitaz enzimleri santrifüjlenerek ham enzim özütü olarak elde edildi. Bu enzim karışımından fitaz enzimi aşağıdaki saflaştırma teknikleri sırası ile uygulanarak saflaştırma gerçekleştirildi.

#### **2.2.8.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi**

Ham özütteki fitaz enziminin saflaştırılmasında ilk adım kademeli amonyum sülfat çöktürmesidir. Amonyum sülfat çöktürmesi buz banyosu içerisinde gerçekleştirildi. Bu amaçla ham özüt %10- %90 aralığında amonyum sülfat doygunluğuna ulaştırıldı. İlgili amonyum sülfat doygunluğuna ulaşmak için gerekli amonyum sülfat miktarı, amonyum sülfat hesaplama programı kullanılarak belirlendi (URL 1). Tartılan katı amonyum sülfat ham özüte yavaş yavaş ilave edilerek ham özüt ilgili doygunluğa ulaştırıldı. İlgili doygunluğa ulaşmış ham özüt buz banyosunda bir saat daha karıştırıldı. İlgili doygunluğa

ulaşmış ham özüt 20.000 rpm'de 20 dk. santrifüjlendi. Her bir doygunlukta çöken proteinler pH 5,0 sodyum asetat tamponunda çözüldü. Aktivite ve protein tayinleri yapılarak enzimin en iyi çöktüğü amonyum sülfat doygunluğu belirlendi.

### **2.2.8.2. Diyaliz**

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen pellet uygun hacimde sodyum asetat (pH 5,0) tamponunda geri çözüldü. Daha sonra yarı geçirgen bir membrandan oluşan diyaliz torbası (Selüloz membran, Sigma-Aldrich, MWCO-Molecular Weight Cut Off 12.000 Da) uygun uzunlukta kesildi ve tek tip gözenek büyüklüğü sağlamak ve ağır metal kontaminantları gidermek için ön işlemde geçirildi. Ön işlem basamakları sırasıyla;

- %0,3'lük sodyum sülfat çözeltisinde 80 °C' de 1 dakika bekletildi,
- Sıcak su (60 °C) ile 2 dakika yıkandı,
- %0,2'lik sülfürik asitte 1 dakika bekletildi,
- Sıcak su (60 °C) ile 2 dakika yıkandı.

Diyaliz torbasına örnek aktarıldı ve her iki ucu klipsler yardımı ile bağlandı. Daha sonra pelletlerin çözüldüğü aynı tampon ile 24 saat süreyle tampon 2 defa değiştirilerek diyaliz edildi. Diyaliz işlemi manyetik karıştırıcı üzerinde 4 °C'de gerçekleştirildi. Diyalizat bir sonraki saflaştırma adımında kullanılmak üzere ayrıldı.

### **2.2.8.3. DEAE İyon Değişim Kromatografisi**

Amonyum sülfat ile kısmi saflaştırılan ve diyaliz ile ortamdaki iyonların uzaklaştırıldığı enzim, DEAE anyon değiştirici kolon dolgu maddesi ile dengelenmiş iyon değiştirici kolona yüklendi. %20 etanol içerisinde 4 °C'de saklanan kolon dolgu maddesi degaz edilerek 75 cm<sup>3</sup> yatak hacmine sahip olacak şekilde 2x30 cm ebatlarındaki kolonda dengelendi. Dengeleme işlemi 50 mM pH 5,0 sodyum asetat tamponu ile gerçekleştirildi. Dengeleme işleminin ardından degaz edilmiş amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen enzim çözeltisi kolona yüklendi. Enzim çözeltisi kolona verildikten sonra tutunmayan proteinlerin uzaklaştırılması için kolon 50 mM pH 5,0 sodyum asetat tamponu ile yıkandı. Kolona tutunan proteinler 0–1 M aralığında artan konsantrasyonda sodyum klorür çözeltisi ile elue edildi. Elüsyon işlemi her bir tüpe 100 damla elüat olacak şekilde ve 3,5 mL/dk



akış hızında gerçekleştirildi. Elüsyon işleminin ardından kolon 2,0 M NaCl çözeltisi ile yıkandı. Kolon, bir sonraki kullanıma hazır tutulmak için %20'lik etanol içerisinde saklandı.

Toplanan elüatların 280 nm'de absorbanları ölçüldü. Absorbsiyon gösteren tüplerde fitaz aktivitesi arandı. Fitaz aktivitesine sahip tüplerde protein tayinleri yapıldı. Spesifik aktivite değerleri hesaplandı. Saflaştırma grafiği çizildi. Elektroforetik analizler için ard arda gelen ve aktivite gösteren tüpler birleştirildi.

### **2.2.9. Substrat Özgünlüğü**

Saf enzimin substrat spesifikliğini belirlemek amacıyla sodyum fitat, 4-metilumbelliferil fosfat, glukoz 6-fosfat, ADP ve ATP substratlarının 5 mM'lık çözeltileri hazırlandı. 450 µL substrat üzerine 150 µL enzim çözeltisi ilave edildi. 30 dk 85 °C'de reaksiyon gerçekleştirildi. İlgili süre sonunda tüplere 600 µL TCA ve 600 µL renk reaktifi ilave edilerek köre karşı absorbanları 625 nm'de ölçüldü. Aktivite tayinleri 3 paralel gerçekleştirildi. Enzimin en iyi etkileştiği substrata ait aktivite değeri %100 kabul edildi. Sonuçlar % bağıl aktivite olarak hesaplandı.

### **2.2.10. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi**

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi çalışmalarında, standart deney ortamının pH'sı 1 birimlik aralıklarla pH 2,2-9,0 aralığında 55 °C'de çalışılmıştır. Tampon sistemi olarak 3,0-7,0 pH aralığında 50 mM Mcilvaine Tampon sistemi, pH 2,2'de 50 mM Glisin-HCl, 8,0 ve 9,0'da 50 mM Glisin-NaOH tamponları kullanıldı. Her bir pH değeri için ayrı kör hazırlandı. Enzim aktivitesi sadece pH parametresi değiştirilerek standart deney koşullarında spektrofotometrik olarak tayin edildi. Elde edilen sonuçlar % bağıl aktivite-pH grafiği çizilerek kıyaslandı.

### **2.2.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi**

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi 25-105 °C arasındaki sıcaklıklarda yapıldı. Deneyde kullanılan tamponlar ham enzim için pH 5,0'e (50 mM

sodyum asetat tamponu) saf enzim ile yapılan deneme için optimum pH değeri olan pH 4,0'a ayarlandı (50 mM sodyum asetat tamponu). 10 mM stok sodyum fitat çözeltisi standart deney ortamındaki final konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde ilave edildi. Enzim aktivitesi sadece sıcaklık parametresi değiştirilerek, standart deney koşullarında spektrofotometrik olarak tayin edildi. Elde edilen sonuçlar % bağıl aktivite-sıcaklık grafiği çizilerek incelendi.

### **2.2.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi**

Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi optimum sıcaklık ve pH'da (85 °C, ve pH 4,0), sabit inkübasyon süresinde (30 dk) ve farklı konsantrasyonlarda (son konsantrasyonu 0,08-3,33 mM aralığında sodyum fitat) substrat kullanılarak enzim aktivitesinin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlendi. Enzimin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplandı.

### **2.2.13. Enzimin pH Kararlılığının İncelenmesi**

Ortamın pH'sının enzim kararlılığına etkisini belirlemek için farklı pH ve sıcaklıklarda enzimin kararlılığı incelendi. Bu çalışma için enzim pH 4,0 (50 mM sodyum asetat tamponu) ve 85 °C'de, pH 2,2 (50 mM glisin-HCl tamponu) ve 85 °C'de, pH 6,0 (50 mM sodyum asetat tamponu) ve 85 °C'de, ayrıca enzimin saklama koşullarındaki kararlılığın incelenmesi için 4 °C'de pH 2,2, 4 °C'de, pH 4,0 ve 4 °C'de ve pH 6,0'da ve 37 °C'de pH 2,2, 37 °C'de, pH 4,0 ve 37 °C'de ve pH 6,0'da farklı zaman aralıklarında inkübe edildi. Inkübasyon boyunca belirli aralıklarla örnekler alındı ve standart deney koşullarında spektrofotometrik olarak aktiviteleri tayin edildi. Aktivite tayinleri üç paralel olarak gerçekleştirildi. Her bir deneme için başlangıçtaki aktivite ölçümü %100 olarak kabul edildi. Kalan aktiviteler % kalan aktivite olarak değerlendirildi.

### **2.2.14. Enzimin Isıl Kararlılığının İncelenmesi**

Enzim kararlılığı üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için, saflaştırılmış olan fitaz enzimi 4 °C, 37 °C ve 85 °C'de 50 mM pH 4,0 sodyum asetat tamponunda final

konsantrasyonu 5 mM olan sodyum fitat ile birlikte deney ortamına eklendi. Enzim bu sıcaklıklarda inkübe edildi ve belirli aralıklarda örnekler alınarak optimum deney koşullarında spektrofotometrik olarak aktivite tayini yapıldı. Aktivite tayinleri üç paralel olarak gerçekleştirildi. Her bir deneme için başlangıçtaki aktivite ölçümü %100 olarak kabul edildi ve aktivite değişimi kontrol değerine göre % kalan aktivite olarak belirlendi.

### 2.2.15. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi

Fitaz aktivitesi üzerine metal iyonu etkisini incelenmek amacıyla;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$  ve  $\text{K}^+$  iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Metal iyonlarının nihai konsantrasyonları 1 mM, 5 mM ve 10 mM olacak şekilde aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aynı zamanda metanol, etanol, aseton, PMSF, 2-propanol gibi organik çözücülerin, SDS, Triton X100, Triton X114, Tween 20 gibi bazı deterjanların ve EDTA'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Bu deterjanların ve organik çözücülerin reaksiyon ortamında ki derişimleri %1 ve %10, EDTA'nın derişimi ise 1 mM, 5 mM ve 10 mM olacak şekilde reaksiyon karışımları hazırlanarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Aktivite tayinleri üç paralel olarak gerçekleştirildi. Elde edilen aktivite sonuçları, herhangi bir kimyasal içermeyen reaksiyon karışımındaki enzim aktivitesi ile karşılaştırılarak bu kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkisi belirlendi.

### 2.2.16. Proteaz Varlığının Fitaz Aktivitesine Etkisi

Proteazların varlığında enzim kararlılığını incelemek için, proteaz ile ön inkübasyon işlemine tabi tutulan saf enzimin optimum şartlarda aktivite tayini yapılmış ve % kalan aktiviteler hesaplanmıştır. Ön inkübasyon işlemi enzim ile proteaz çözeltisi 1:1 (w/w) oranında karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. 0,1 mg/mL konsantrasyondaki saf enzim 0,1 mg/mL konsantrasyonda proteaz karışımı (Trypsin-Kimotripsin; Sigma-Aldrich, Protease Type VIII: Bakterial from *Bacillus licheniformis*) ile 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) tamponunda 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon ortamından 30, 60 ve 90 dakikalarda örnekler alındı ve kalan aktiviteler standart aktivite yöntemi ile belirlendi. % kalan aktiviteler belirlenerek grafiğe çizildi.

### 2.2.17. TF-16 Fitazının Soya Sütü Fitatını Parçalama Etkinliği

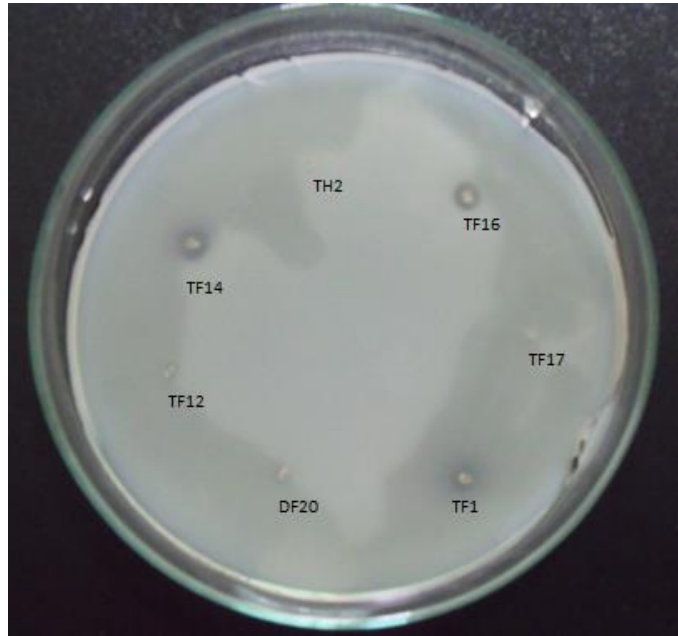
Fitat Standart Grafiğinin Hazırlanışı: Fitaz enziminin soya sütü fitatını parçalama etkinliğini belirlemek için fitat standart grafiği oluşturuldu. Bu amaçla 0,5-5,0 mM aralığında farklı konsantrasyonlarda sodyum fitat standartları hazırlandı ve standartlar üzerine renk reaktifi (%0,03  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ve %0,3 sülfosalisilik asit) ilave edildi. Karışım 4.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Toplanan süpernatant spektrofotometrede 500 nm'de köre karşı ölçüldü. Elde edilen grafikten soya sütü fitatının konsantrasyonu belirlendi (Latta ve Eskin, 1980).

Soya sütü ile enzim optimum şartlar altında inkübe edildi. 30 dakikalık aralıklarla örnekler alınarak standart aktivite yöntemi yardımıyla fosfat yayını yapıldı. 0-50 mM aralığında  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  standartları ile serbest fosfat grafiği çizilerek inkübasyon sonunda enzimin ürettiği serbest fosfat miktarı mM cinsinden hesaplandı. 6 molekül serbest fosfatın 1 molekül fitata denk geldiği düşünülerek bulunan serbest fosfat konsantrasyonu 6'ya bölündü (Chen vd., 1956). Hesaplanan nihai konsantrasyon soya sütü fitatına oranlanarak % hidroliz hesaplandı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Petri Testi

Bu çalışmada kullanılan 7 farklı *Geobacillus sp.* termofilik bakteri türü, fitaz enzimi üretip üretmediklerinin kontrol edilmesi amacıyla petri testi yapıldı. Bakteriler 4 gün fitatlı katı besiyerinde büyütüldü. Bu süre sonrasında zonlar belirgin hale geldi. Petri resmi Şekil 6'da verildi.



Şekil 6. 7 farklı *Geobacillus sp.* termofilik bakteri türünün fitaz üretimi kontrolü için petri testi

Zon çapları kumpas ile ölçüldü. Koloni ve zon çapı değerleri Tablo 13'de verildi. Fitaz aktivitesi tespiti yapıldı ve en yüksek aktiviteyi gösteren TF16 seçildi (Tablo 14).

Tablo 13. Petri testi koloni ve zon çapı değerleri

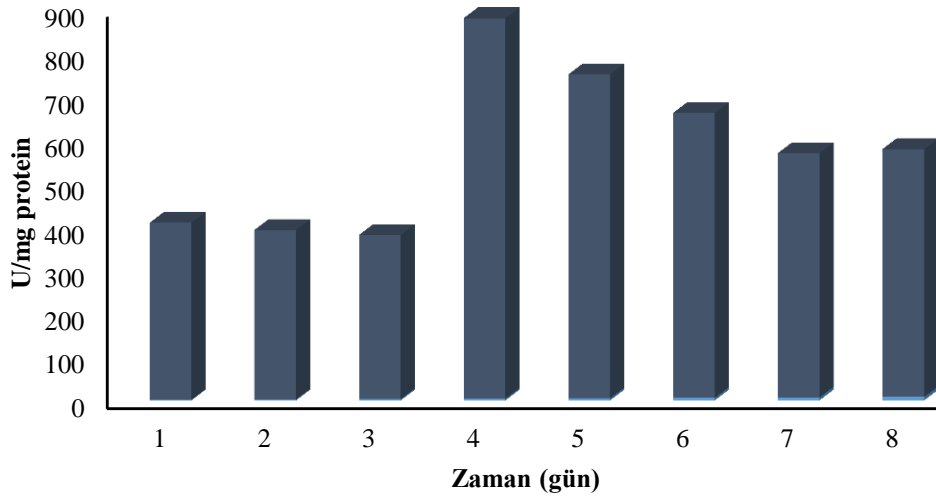
Bakteri türü	TF1	TF12	TF14	TF16	TF17	DF20	TH2
Zon Çapı (mm)	1,4	1,8	4	4	2	1,4	2

Tablo 14. 7 farklı *Geobacillus sp.* suşunun spektrofotometrik aktivite sonuçları

Bakteri türü	Fitaz aktivitesi (U)
<i>Geobacillus sp.</i> TF1	461,51
<i>Geobacillus sp.</i> TF12	579,88
<i>Geobacillus sp.</i> TF14	432,14
<i>Geobacillus sp.</i> TF16	627,92
<i>Geobacillus sp.</i> TF17	346,25
<i>Geobacillus sp.</i> TH2	307,41
<i>Geobacillus sp.</i> DF20	535,28

### 3.2. Optimum İndükleme Süresinin Belirlenmesi

Fitaz indüklemesi için unlu besiyeri kullanıldı. Daha önce LB besiyerinde hazırlanan gece kültürleri unlu besiyerine aşıl原因arak 55 °C’de büyümeye bırakıldı. Optimum indükleme zamanını tespit etmek amacıyla besiyeri ortamından 24 saat aralıklarla 8 gün boyunca uygun miktarlarda örnekler alınarak fitaz aktivite tayinleri ve protein tayinleri yapıldı. Spesifik aktivite değerleri hesaplandı. Sonuçlar Şekil 7’de verildi.



Şekil 7. Optimum indükleme süresinin belirlenmesi

### 3.3. Protein Tayini

Bu çalışmada protein tayini için Bradford metodu (Bradford, 1976) ve protein standardı olarak BSA kullanıldı. Elde edilen absorbanlar BSA konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi. Örneklerin protein miktarı, örneklerin absorbanlarının standart grafiğinin eğimine oranlanması ile hesaplandı.

### 3.4. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat ile proteinleri çöktürmek için ham enzim çözeltisi, %10-%90 doygunluk aralığında 10'ar birim artış olacak şekilde katı amonyum sülfat ilavesi ile doyuruldu. İlave edilecek katı amonyum sülfat miktarı "ammonium sulphate calculator" programı kullanılarak hesaplandı (URL 1). Fitaz aktivitesi ve protein tayinleri yapılarak enzimin en iyi çöktüğü amonyum sülfat doygunluğu belirlendi.

Aktivite tayinleri paralel 3 tekrarlı yapıldı. Ortalama değerler alınarak sonuçlar hesaplandı. Yapılan aktivite tayinleri neticesinde TF16 suşundan elde edilen fitaz enziminin en iyi %60 doygunlukta amonyum sülfat çözeltisinde çöktüğü belirlendi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu %60 doygunlukta çöken enzimin %35 verimle spesifik aktivite değeri ham özütün yaklaşık 2 katı olduğu belirlendi. Bu aşamadan sonraki çalışmalarda; ham enzim %40 doygunlukta amonyum sülfat ile çöktürüldü. Çökelek uzaklaştırılarak süpernatant %60 doygunluğa getirildi. Elde edilen protein çökeleği uygun hacimde 50 mM pH 5,0 olan sodyum asetat tamponunda çözüldü, 4 °C'de 1 gece bekletildi ve 6.000 rpm'de 8 dakika santrifüj edilerek süpernatant toplandı. Elde edilen kısmi olarak saflaştırılmış enzim çözeltisi daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 4 °C'de saklandı.

### 3.5. Diyaliz

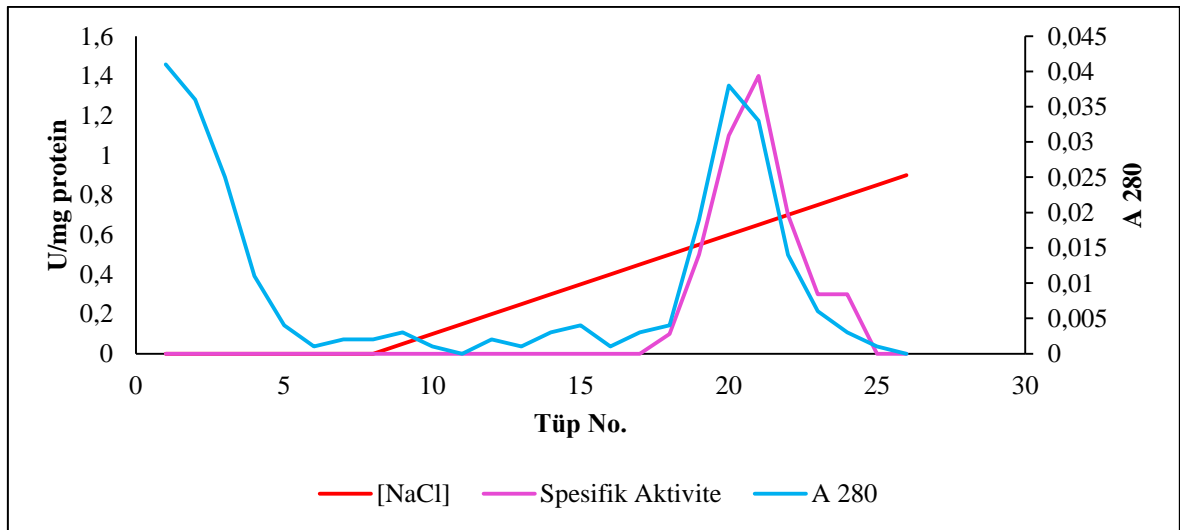
Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim özütü ön işlemleri yapılmış olan diyaliz torbasına aktarıldı ve her iki ucu klipsler yardımı ile bağlandı. Daha sonra 50 mM pH 5,0 olan sodyum asetat tamponu ile 24 saat süreyle diyaliz edildi. Diyaliz işlemi manyetik karıştırıcı üzerinde 4 °C'de gerçekleştirildi. Diyalizata fitaz aktivitesi ve protein tayinleri yapılarak enzimin spesifik aktivitesi hesaplandı. Diyaliz sonrasında fitaz

enziminin spesifik aktivite değeri ham özütün yaklaşık 2,5 katı olduğu belirlendi. Ham özüt ile diyalizatın spesifik aktiviteleri kıyaslanarak saflaştırma kat sayısı hesaplandı. Elde edilen enzim özütü daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 4 °C’de saklandı.

### 3.6. DEAE İyon Değişim Kromatografisi

Amonyum sülfat ve diyaliz ile kısmi olarak saflaştırılan enzim, DEAE (dietilaminoetil) sefaroz anyon değiştirici kolon dolgu maddesi ile dengelenmiş iyon değiştirici kolona yüklendi. 50 mM pH 5,0 olan sodyum asetat tamponu ile dengeleme işleminin ardından 20 mL enzim çözeltisi kolona yüklendi. Enzim çözeltisi kolona verildikten sonra tutunmayan proteinlerin uzaklaştırılması için kolon aynı tampon ile yıkandı. Kolona tutunan proteinler 0-1 M aralığında artan konsantrasyonda sodyum klorür (NaCl) çözeltisi ile elüe edildi. Elüsyon işlemi her bir tüpe 100 damla elüat olacak şekilde ve 3,5 mL/dk akış hızında gerçekleştirildi. Elüsyon işleminin ardından kolon 2,0 M NaCl çözeltisi ile yıkandı.

Toplanan elüatların 280 nm’de absorpsiyonları ölçüldü. Absorpsiyon gösteren tüplerde fitaz aktivitesi arandı. Fitaz aktivitesine sahip tüplerde protein tayinleri yapıldı. Spesifik aktivite değerleri hesaplandı. Saflaştırma grafiği çizildi. Grafik Şekil 8’de verilmiştir. Hesaplanan spesifik aktivite değerleri kullanılarak saflaştırma tablosu oluşturuldu. Sonuçlar Tablo 15’de verilmiştir.



Şekil 8. İyon değiştirici kolon saflaştırma grafiği

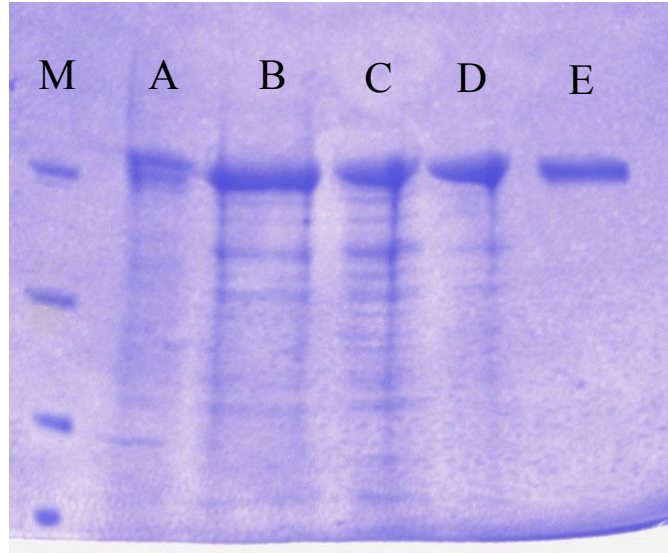


Tablo 15. Saflaştırma tablosu

Saflaştırma Adımı	Hacim (mL)	Protein Miktarı ( $\mu\text{g/mL}$ )	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Sps. Akt (U/mg)	Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham Özüt	100	1890	414,09	219,10	100	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Çöktürmesi	30	418	147,86	353,72	35,71	1,61
Diyaliz	40	266	142,71	536,50	34,46	2,45
DEAE Kolonu	10	120	129,61	1080,07	31,30	4,93

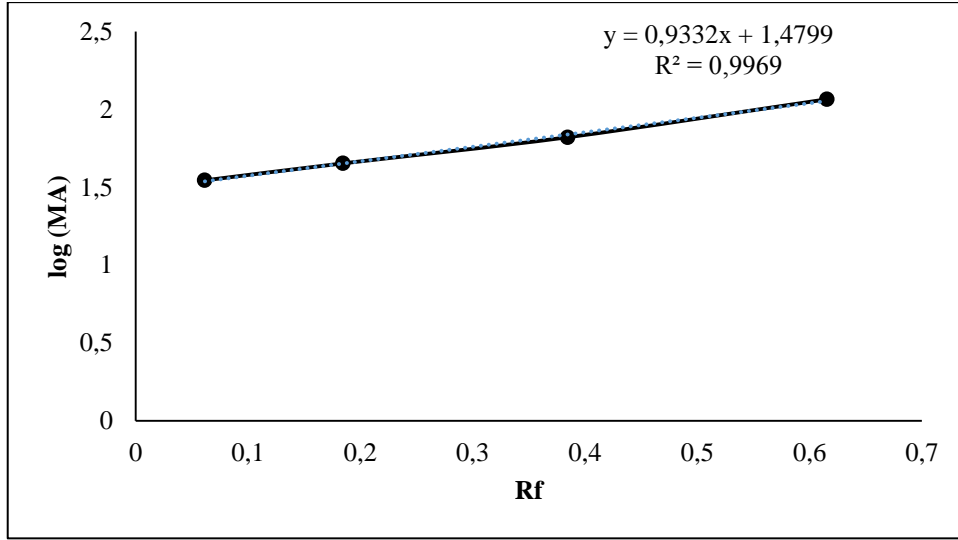
### 3.7. SDS-PAGE Elektroforezi

Saflaştırma basamaklarının her bir adımında bir miktar örnek elektroforetik analiz için  $4^\circ\text{C}$ 'de saklandı. % 8'lik Poliakrilamit Jel kullanılarak SDS-PAGE elektroforez işlemi uygulandı. Elektroforez işleminden sonra Jel Commassie Brilliant Blue R 250 ile boyandı. Boyama sonucu oluşan protein bantları incelendi. SDS-PAGE elektroforez jel görüntüleri. Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 9. A: LB besiyerinde indüklenme yapılmamış ham enzim özütü, B: Unlu besiyerinde indüklenmiş ham enzim özütü, C: %60 Amonyum Sülfat çöktürmesi sonrası, D: Diyaliz işlemi sonrası, E: DEAE iyon değişim kolonu sonrası, M: Protein standardı (116 kDa, 66,2 kDa, 45 kDa, 35 kDa)

SDS-PAGE ile enzimin molekül ağırlığı belirlendi. Standart proteinlerin  $R_f$  değerleri  $M_A$ 'larının logaritma değerine karşı grafiğe geçirildi. Grafik Şekil 10'de verildi. Saflaştırılan enzimin alt birim ağırlığı 106,04 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 10. Standart proteinler  $\log(M_A)$ - $R_f$  Grafiği

### 3.8. Substrat Özgünlüğü

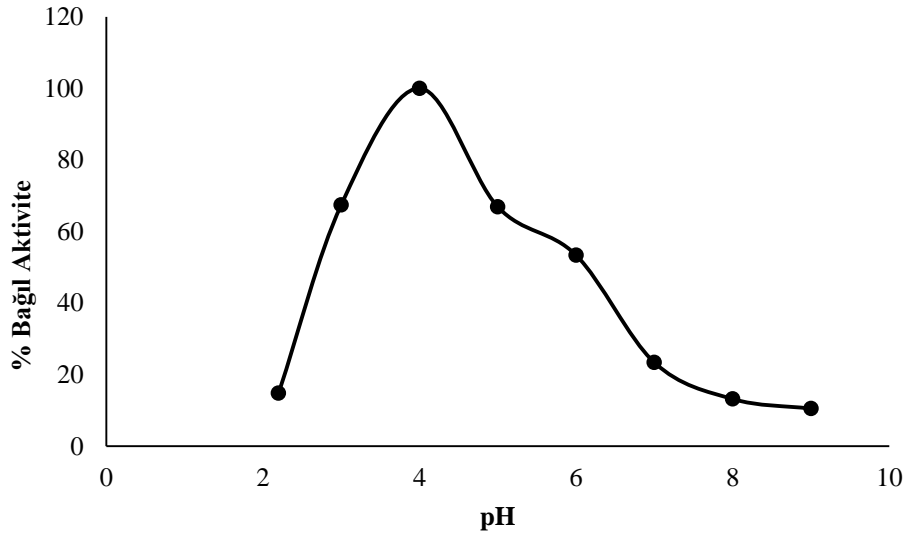
Saf enzimin substrat özgünlüğünü belirlemek amacı ile sodyum fitat, 4-metilumbelliferil fosfat, glukoz 6-fosfat, ADP ve ATP substratları kullanılarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Sonuçlar Tablo 16'de verilmiştir.

Tablo 16. TF16 Fitazına ait substrat- % bağıl aktivite değerleri

Substrat	% Bağıl aktivite
Sodyum Fitat	48,70
4 - Metilumbelliferil Fosfat	100
Glukoz 6-Fosfat	89,48
ADP	51,27
ATP	44,20

### 3.9. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

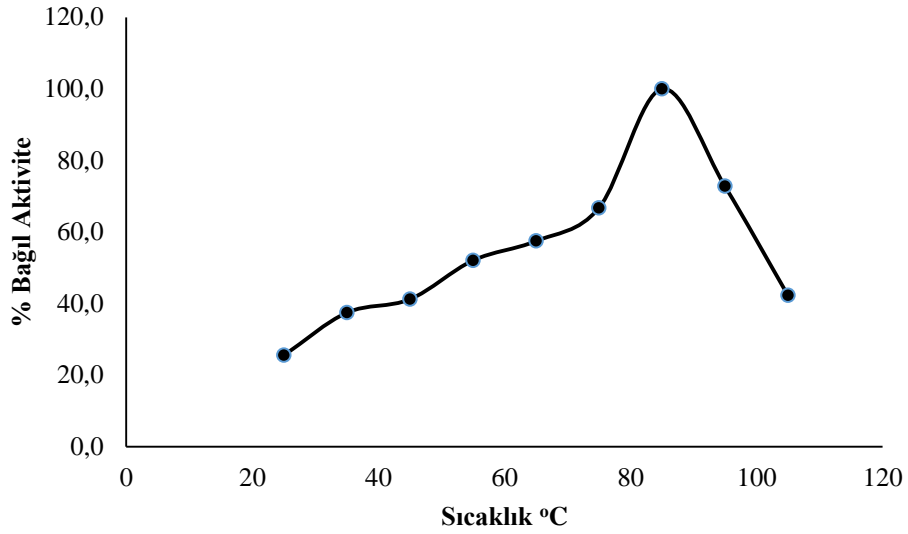
Fitaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği pH'yı belirlemek amacıyla tampon sistemi olarak 3,0-7,0 pH aralığında 50 mM Mcilvaine tampon sistemi, pH 2,2'de 50 mM Glisin-HCl, 8,0 ve 9,0'da 50 mM Glisin-NaOH tamponları kullanıldı. Aktivite tayinleri en az üç paralel olacak şekilde yapıldı. Sonuçlar hesaplanarak grafiğe geçirildi. TF16 Fitazına ait pH- % bağıl aktivite grafiği Şekil 11'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi saflaştırılan enzim en yüksek aktiviteyi pH 4,0'da göstermiştir. Bundan sonraki çalışmalarda optimum pH 4,0 olarak kullanılmıştır.



Şekil 11. TF16 fitazının pH-%bağıl aktivite grafiği

### 3.10. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Fitaz enzimin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 25-105 °C aralığında farklı sıcaklıklarda aktivite tayinleri gerçekleştirildi ve aktiviter hesaplandı. % bağıl aktivite sıcaklık grafiği çizilerek fitaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık belirlendi. TF16 fitazına ait sıcaklık- % bağıl aktivite grafiği Şekil 12'de verilmiştir. Fitaz enziminin optimum sıcaklığı 85 °C olarak belirlenmiştir.



Şekil 12. TF16 fitazının sıcaklık-%bağlı aktivite grafiği

### 3.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Protein Miktarının Etkisi

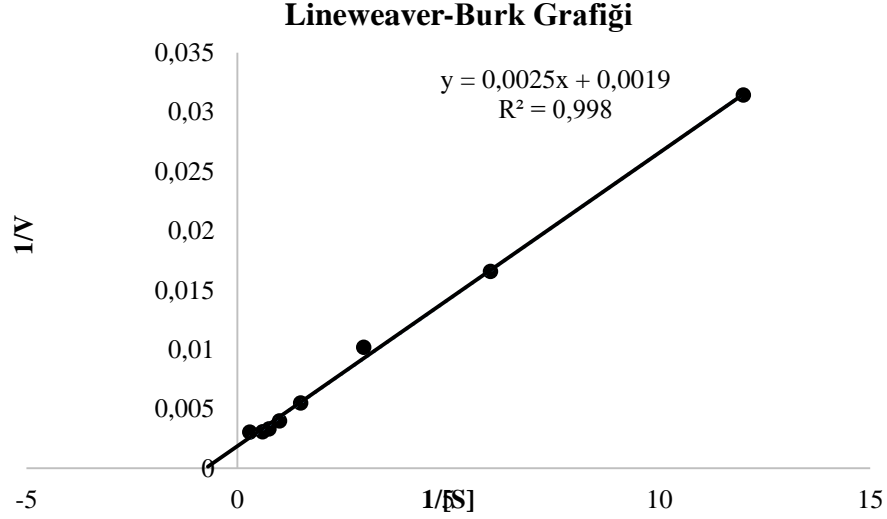
Fitaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum protein miktarını belirlemek için daha önce belirlenen optimum şartlarda ve sabit substrat miktarına karşılık proteinin değişen miktarlarında (0,5-50,3  $\mu\text{g/mL}$ ) reaksiyon karışımları hazırlanarak aktivite tayinleri yapıldı. Aktivite tayinleri üç paralel olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilerek enzimin doygunluğa eriştiği noktadaki protein miktarı bulundu.

Grafikten enzimin en etkin aktivite gösterdiği protein konsantrasyonu yaklaşık 25  $\mu\text{g/mL}$  olarak belirlendi. Bundan sonraki aşamalarda reaksiyon ortamına 25  $\mu\text{g/mL}$  olacak şekilde enzim çözeltisi ilave edildi.

### 3.12. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Fitaz enzimi aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacıyla 0,08-3,33 mM aralığında değişen substrat konsantrasyonlarında reaksiyon karışımları hazırlandı. Aktivite tayinleri daha önce belirlenen optimum şartlarda ve üç paralel olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen aktivite değerleri grafiğe geçirilerek fitaz enzimine ait substrat doygunluk eğrisi elde edildi. Elde edilen veriler kullanılarak Lineweaver-Burk

grafığı çizildi. Grafiklerden kinetik parametreler olan  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri hesaplandı. Fitaz enzimi için Lineawaver-Burk Grafığı Şekil 13’de verilmiştir.

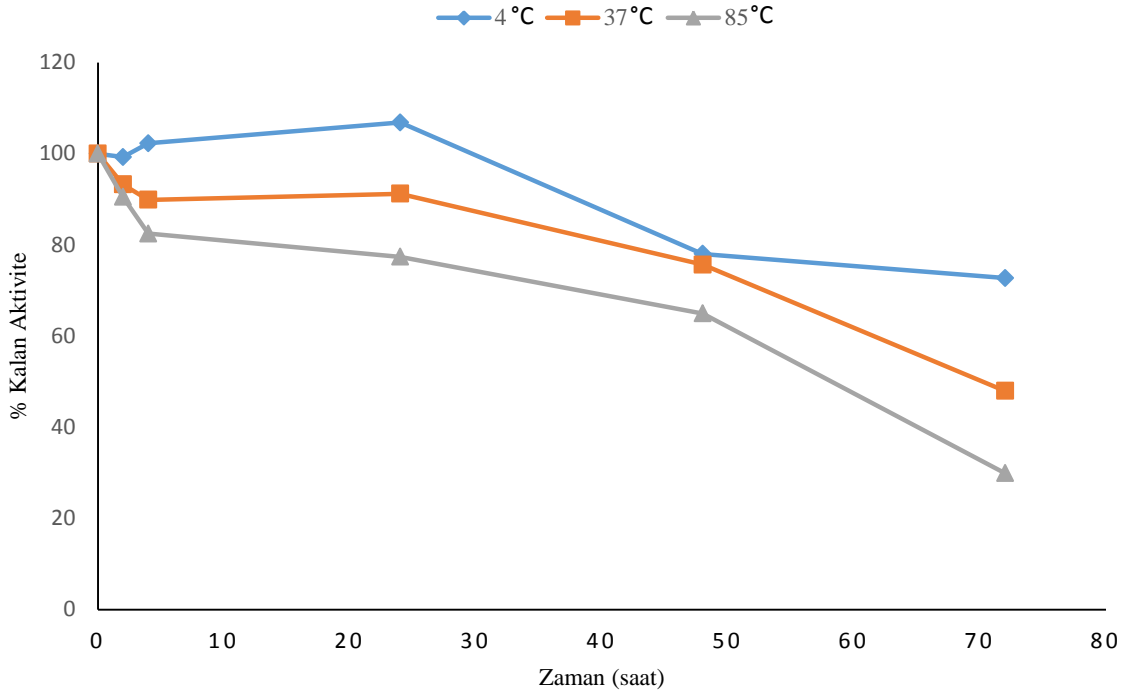


Şekil 13. TF16 fitazının sodyum fitat substratı varlığında çizilen Lineweaver-Burk grafığı

Serbest enzim Michaelis-Menten kinetiğine uyum göstermektedir. Enzimin kinetik parametreleri olan  $V_{maks}$  ve  $K_m$  değerleri, çizilen Lineweaver-Burk grafığından sırasıyla 526,28 U/mg protein ve 1,31 mM olarak belirlenmiştir.

### 3.13. Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Isıl kararlılığı belirlemek amacıyla fitaz enzimi 4 °C, 37 °C ve 85 °C’de bekletilerek 2., 4., 24., 48. ve 72. saat sonunda aktivite tayinleri belirlenen optimum şartlarda üç paralel olarak gerçekleştirildi. % kalan aktiviteler, herhangi bir ön inkübasyon işlemi uygulanmamış saf enzimin optimum şartlarda belirlenen aktivite değeri ile karşılaştırılarak hesaplandı. Sonuçlar Şekil 14’de verilmiştir.

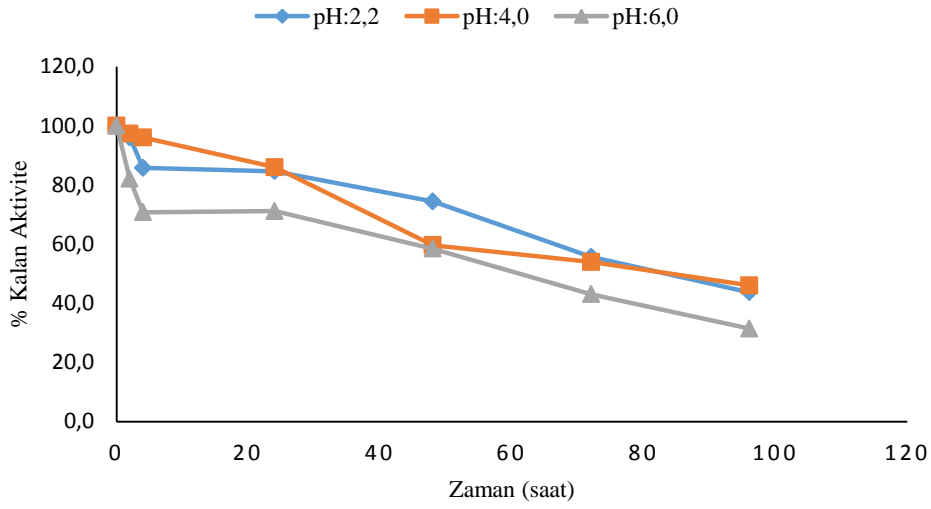


Şekil 14. TF16 fitazının ısıl kararlılık grafiği

Grafikten de görüldüğü gibi saf enzim 4, 37 ve 85 °C’de 24 saat sonunda aktivitesini yaklaşık olarak % 80’nin üzerinde koruduğu tespit edilmiştir.

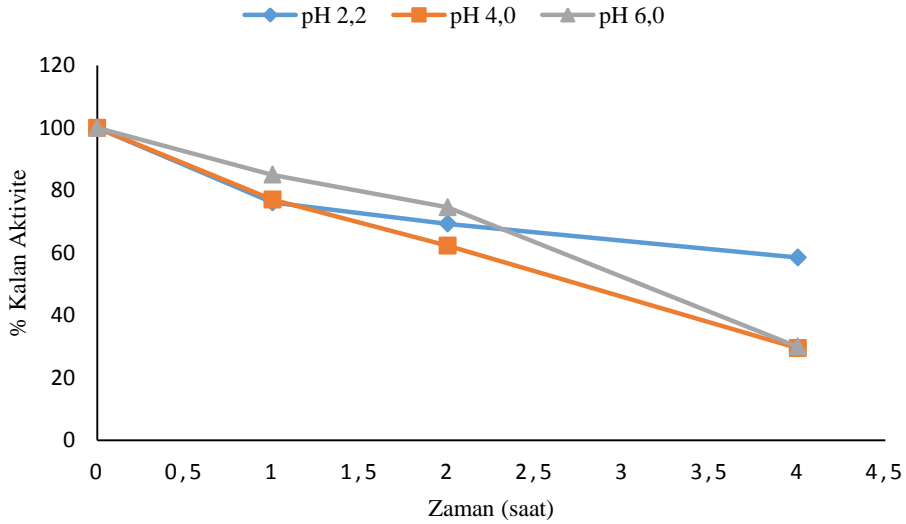
### 3.14. pH Kararlılığının İncelenmesi

Serbest enzimin pH kararlılığını incelemek amacıyla saf enzim uygun oranlarda farklı tampon çözeltileri (pH 4,0 ve 6,0 sodyum asetat, 2,2 glisin-HCl tamponu) ile karıştırılarak farklı sıcaklıklarda (4, 37 ve 85 °C) inkübe edilmiştir. Bu karışımlardan hiç bekletilmeden alınan örneklerle yapılan aktivite testleri ile belirli aralıklarla alınan örneklere yapılan aktivite testleri kıyaslanarak % kalan aktiviteler hesaplanmıştır (Şekil 15, Şekil 16 ve Şekil 17).



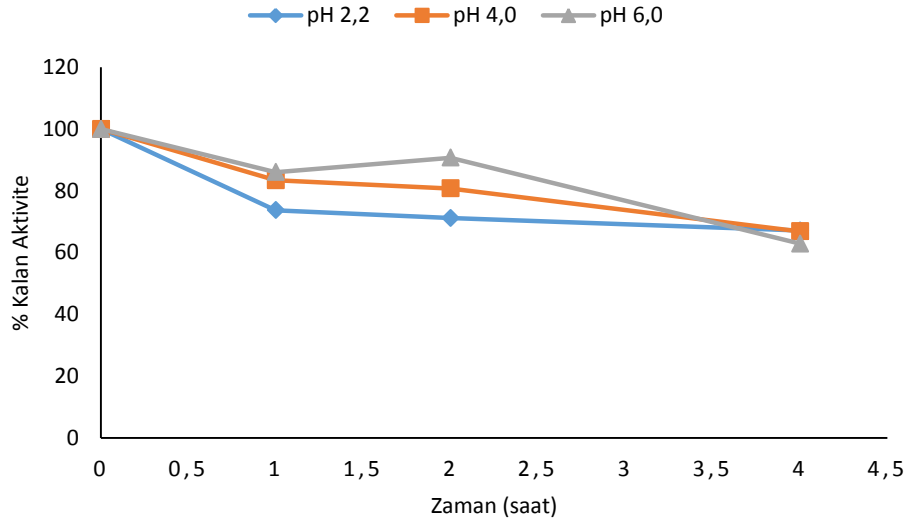
Şekil 15. TF16 fitazının 4 °C'de pH kararlılık grafiği

Şekil 15'te görüldüğü üzere fitaz enzimi 4 °C'de farklı pH değerlerinde 24 saat sonunda aktivitesini büyük oranda (%70-80) korumuştur. Ayrıca aktivitesini 96 saat sonunda farklı pH'larda yaklaşık %30-40 oranında koruduğu tespit edilmiştir.



Şekil 16. TF16 fitazının 37 °C'de pH kararlılık grafiği

Fitaz enziminin 37 °C'de pH 4,0'da 4 saat sonunda aktivitesinin %30, pH 2,2'de 4 saat sonunda %58, pH 6,0'da 4 saat sonunda da %30'unu koruduğu belirlenmiştir. İlk saatin sonunda ise tüm pH değerlerinde aktivite yaklaşık %80 oranında korunmuştur.



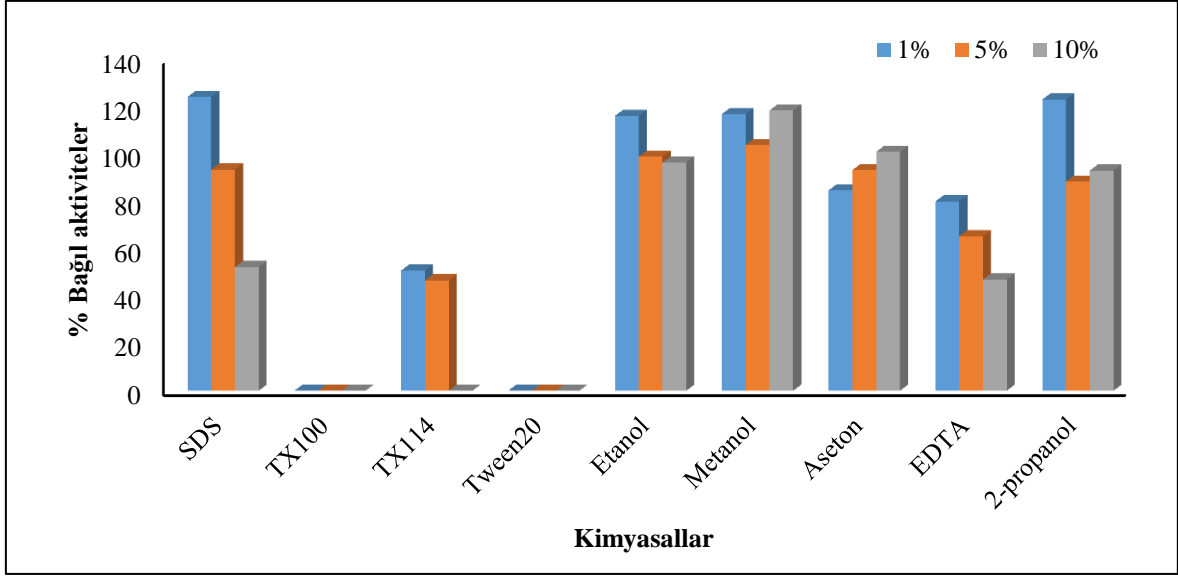
Şekil 17. TF16 Fitazı 85 °C’de pH kararlılık grafiği

Fitaz enziminin 85 °C’de pH 4,0’da 4 saat sonunda aktivitesini %66 oranında, pH 2,2’de 4 saat sonunda %67 oranında, pH 6,0’da 4 saat sonunda ise %62 oranında koruduğu belirlenmiştir. İlk saatin sonunda ise tüm pH değerlerinde aktivite yaklaşık %70 oranında korunmuştur.

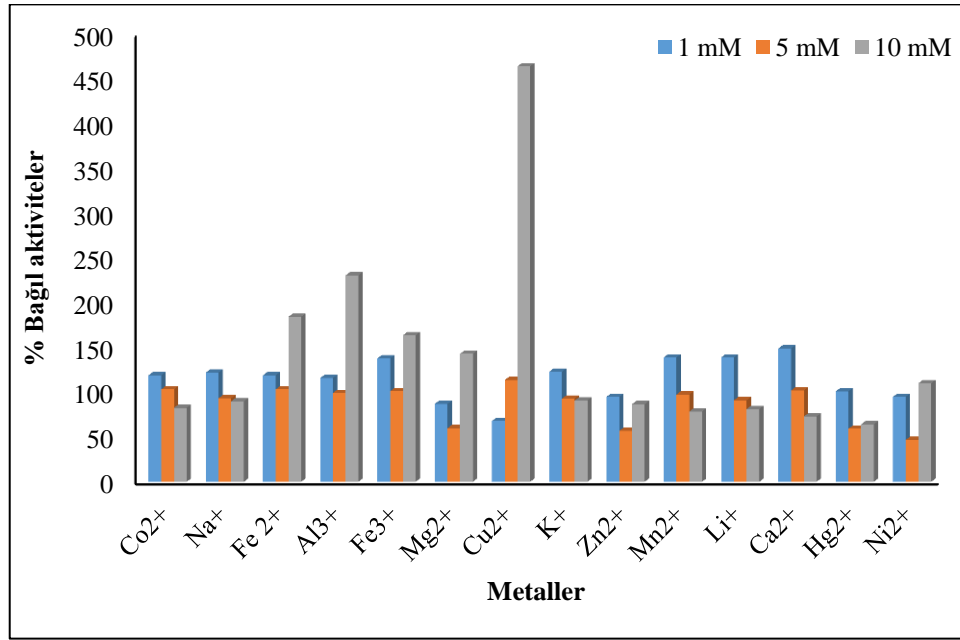
### 3.15. Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi

Serbest enzimin aktivitesi üzerine metal iyonu etkisini incelemek amacıyla;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  iyonları reaksiyon karışımında 1 mM, 5 mM ve 10 mM olacak şekilde aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar metal iyonu içermeyen denemeden elde edilen sonuçla karşılaştırılarak metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Aynı zamanda Etanol, Metanol, Aseton, 2-Propanol, SDS, Triton X100, Triton X114, Tween 20 ve EDTA gibi bazı kimyasalların da enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Aktivite tayinleri üç paralel olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 18 ve Şekil 19’da verilmiştir.





Şekil 18. Organik çözücüler ve deterjanlar varlığında % kalan aktiviteler



Şekil 19. Metallerin varlığında % kalan aktiviteler

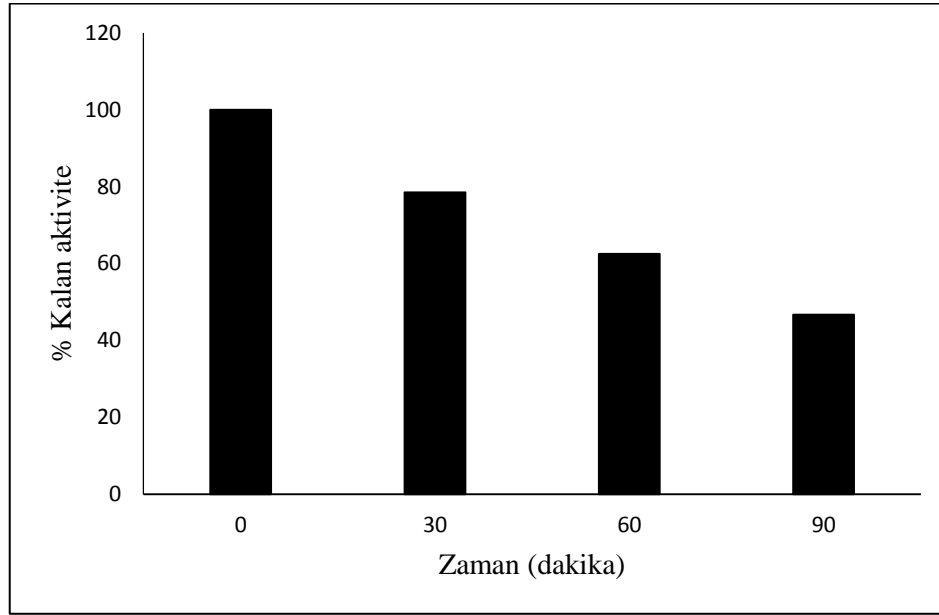
Reaksiyon ortamında, son konsantrasyonun 1 mM olduğu metal varlığında fitaz enziminin aktivitesini büyük oranda korunduğu, %1'lik Triton X100 ve Tween 20 varlığında ise enzimin tamamen inhibe olduğu görülmüştür.

10 mM'lık metallerin varlığında ise enzim genel anlamda aktivitesini korumuştur. Artan Cu<sup>2+</sup> konsantrasyonu ise aktiviteyi yaklaşık 4,5 kat kadar arttırmıştır. Ayrıca, düşük

konsantrasyonlarda bile enzimi tamamen inhibe edebilen Triton X100 ve Tween 20'nin yanı sıra artan Triton X114 konsantrasyonu da enzimi tamamen inhibe etmiştir.

### 3.16. Proteaz Varlığının Fitaz Aktivitesine Etkisi

Proteazların varlığında enzim kararlılığını belirlemek için, saflaştırılmış olan fitaz enziminin aktivitesi optimum şartlar altında belirlendi. Daha sonra 0,1 mg/mL konsantrasyondaki saf enzim 0,1 mg/mL konsantrasyonda proteaz karışımı (Sigma-Aldrich. Protease Type VIII: Bakterial from *Bacillus licheniformis*) ile 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) tamponunda inkübe edildi. İnkübasyon ortamından 30, 60 ve 90 dakikalarda örnekler alındı. Sonuçlar Şekil 20'de verilmiştir. Proteazlar varlığında 90 dakika sonrasında fitaz enzimi aktivitesinin %46'sını koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 20. Proteazların varlığında % kalan fitaz aktivitesi

### 3.17. TF-16 Fitazının Soya Sütü Fitatını Parçalama Etkinliği

Fitaz enziminin soya sütü fitatını parçalama etkinliğini belirlemek için fitat standart grafiği oluşturuldu. Grafikten soya sütü fitatı konsantrasyonu 28,16 mM olarak hesaplandı. Soya sütü ile enzim optimum şartlar altında inkübe edildi. 30 dakikalık aralıklarla örnekler

alınarak standart aktivite yöntemi yardımıyla fosfat yayini yapıldı. 0-50 mM aralığında  $K_2HPO_4$  standartları ile serbest fosfat grafiği çizilerek 4 saatlik inkübasyon sonunda enzimin ürettiği serbest fosfat miktarı 25,39 mM olarak hesaplandı. 6 molekül serbest fosfatın 1 molekül fitata denk geldiği düşünülerek bulunan serbest fosfat konsantrasyonu 6'ya bölündü ve hidrolizlenen fitat miktarı 4,23 mM olduğu bulundu. 4 saat sonunda hidrolizlenen fitat miktarı toplam soya sütü fitatına oranlanarak *Geobacillus sp* TF16 fitazının hidrolizleme kapasitesi % 18,78 olarak hesaplandı.

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Fitazlar, bitki tohumlarında fosfatın temel depo formu olan fitatın daha az fosforillenmiş inositol fosfatlara ya da bazı durumlarda inositole sıralı hidrolizini katalizleyen fosfataz sınıfı enzimlerdir (Kerovuo, 2000). Fitazı parçalayan enzimlerle ilgili olarak yem ham maddelerinde ve insanlar için hazırlanan gıdalardaki fitat içeriğini azaltmak amacıyla son yıllarda birçok çalışma yürütülmektedir. Ayrıca bunların yanı sıra myo-inositol fosfatların hazırlanması, kağıt endüstrisi ve toprak iyileştirme alanlarında da fitaz enzimi kullanılmaktadır. Yapılan son çalışmalar, yem üzerine enzim ilavesi ile fosfat kullanımının arttığını ve inorganik fosfat atılımının yaklaşık %50 kadar azaltıldığı gözlenmiştir (Li vd., 1997).

Çeşitli alanlarda kullanılmak üzere piyasada ticari olarak farklı organizmalardan elde edilen farklı enzimler mevcut olmakla birlikte, bunlar arasında en çok tercih edilenler, pratikteki eldelerinin kolaylığı, yüksek aktiviteleri ve ekstrem şartlardaki kararlılıklarından dolayı mikrobiyal ve termofilik orijinli olanlardır. Endüstriyel olarak özellikle ısıya dayanıklı enzimlerin eldesi oldukça önemli olduğundan termofilik organizmalardan enzim izolasyonu ve karakterizasyonuna ilgi gittikçe artmaktadır. Birçok endüstriyel uygulama için ısıl kararlı ve yüksek sıcaklıklarda aktivite gösteren fitazlara ihtiyaç vardır.

Fungus fitazları genellikle *A. ficuum* ve *A. niger* gibi *Aspergillus* türleri ve bakteriyel kaynaklı fitazlar ise *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Bacillus* sp. ve *Enterobacter* sp. türlerinden elde edilmiştir (Kim vd.,1998).

Bu çalışmada ticari potansiyele sahip endüstriyel bir enzim olan fitaz enzimi, yeni izole edilmiş termofilik bir bakteri olan *Geobacillus* sp.TF16 suşundan saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin biyokimyasal karakterizasyonu yapılarak sonuçlar literatür verileri ile kıyaslandı. Yapılan literatür araştırmalarında çoğunlukla fungus kökenli fitazlar üzerine çalışmaların olduğu ayrıca *Geobacillus* fitazları üzerine henüz bir çalışma yapılmadığı görüldü. *Geobacillus* sp.TF16 suşunun ürettiği fitaz enzimi kolon kromatografisi teknikleri kullanılarak saflaştırıldı. Amonyum sülfat çöktürmesinin ardından uygulanan iyon değişim kromatografisi sonucu enzim 4,93 kat saflaştırıldı (Tablo 15). *Aspergillus ficuum* NTG-23'dan klonlanan ve saflaştırılan fitaz enzimi 71,5 kat saflaştırılmıştır (Zhang vd.,2010). *Aspergillus niger* ATCC 9142'dan saflaştırılan fitaz enzimi ise 24,89 kat saflaştırılmıştır (Casey ve Walsh, 2003). *Geobacillus* sp. TF16 fitazının saflaştırma kat sayısının düşük

olmasının sebebi ise, bakterinin unlu besiyeri içerisinde 4 günlük indüklenme sonrası yüksek oranda fitaz üretmesi ve ham enzim özütünde yüksek oranda fitaz enzimi ihtiva etmesinden kaynaklanmaktadır. Bu yönüyle, indüklenme sonrası sadece amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak da yüksek oranda fitaz enzimi elde edilebilir ve saflaştırma maliyeti düşürülebilir.

Saflaştırılan enzim elektroforetik olarak analiz edildiğinde, SDS-PAGE sonucu tek bir protein bandının görülmesi enzimin saflaştırıldığını desteklemektedir (Şekil 9). Ayrıca gerçekleştirilen SDS-PAGE sonucu enzimin altbiriminin molekül ağırlığı 106,04 kDa olarak belirlendi (Şekil 10). Fitaz enziminin molekül ağırlığı ile ilgili yapılan literatür araştırmalarında genellikle bakteriyel fitazların (40-55 kDa) fungus kökenli fitazlardan (80-120 kDa) daha düşük molekül ağırlığına sahip olduğu görülmüştür (Aşan, 2006). *Bacillus* sp. DS11 suşundan saflaştırılan fitaz enziminin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 44 kDa (Kim vd., 1998), *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1'den izole edilen fitaz enziminin molekül ağırlığı 50 kDa (De Angelis vd., 2003). *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959'dan saflaştırılan fitaz enziminin molekül ağırlığı 124 kDa olarak bulunmuştur (Casey ve Walsh, 2004). Genel literatür verilerinden farklı olarak, *Geobacillus* sp. TF16 fitazının fungal fitazlar gibi nisbeten yüksek molekül ağırlığına sahip olduğu tespit edilmiştir.

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi incelendiğinde enzimin en yüksek aktiviteye pH 4,0 olan sodyum asetat tamponun'da sahip olduğu görüldü (Şekil 11). Literatüre bakıldığında bakteri fitazları ile ilgili yapılan çalışmalar az olmakla birlikte mevcut çalışmalar incelendiğinde *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens* fitazlarının optimum pH değerlerinin sırası ile 5,5-7,5 ve 7,0-8,0 olduğu (Aşan, 2006), *B. subtilis* YMN2f20 suşu fitazının pH değerlerinin 5,0 (Sogut vd., 2013) ve *Klebsiella pneumoniae* 9-3B fitazının pH değerlerinin ise 4,0 (Escobin-Mopera vd., 2012) olduğu görülmüştür. Genel olarak bakıldığında yapılan mikrobiyal fitaz çalışmalarında optimum pH değerleri genellikle pH 3,5 ile 5,5 arasında olduğu bulunmuştur (Tablo 2) (Aşan, 2006).

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi incelendiğinde ise enzimin en yüksek aktiviteye 85 °C'de sahip olduğu görülmektedir (Şekil 12). Literatür araştırmalarında, yapılan mikrobiyal fitaz çalışmalarının optimum sıcaklık değerleri genellikle 40-80 °C arasında olduğu görülmüştür (Aşan, 2006). *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens* fitazlarının optimum sıcaklık değerlerinin sırası ile 55-60 ve 70 °C olduğu (Aşan, 2006), *B. subtilis* YMN2f20 suşu fitazının optimum sıcaklık değerlerinin 40 °C (Sogut vd., 2013) ve *Klebsiella pneumoniae* 9-3B fitazının optimum sıcaklık değerlerinin ise 50 °C (Escobin-

Mopera vd., 2012) olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda *Geobacillus* sp. TF16 fitazının literatürdeki saflaştırılan bir çok enzimin optimum sıcaklık değerlerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. *Geobacillus* sp. TF16 fitazının sindirim sistemi pH'larında (pH 2,0-5,0) ve hayvan yemi hazırlama proseslerinde çıkılan yüksek sıcaklıklarda (70-90 °C) aktivite göstermesi, bu enzimin ticari olarak kullanılma potansiyelini destekleyen verilerdir.

Saflaştırılan enzimin ısı kararlılığı incelendiğinde, enzimin depolama sıcaklığı olan 4 °C'de 72 saat sonunda aktivitesini %75 oranında koruduğu, enzimin yem katkı maddesi olarak kullanılması durumunda hayvanın yaklaşık vücut sıcaklığında (37 °C'de) 48 saat sonunda aktivitesini %70 oranında koruduğu, optimum sıcaklık ve yem üretim proses sıcaklığı olan 85 °C'de ise 48 saat sonunda aktivitesini büyük oranda koruduğu belirlendi (Şekil 14). Saflaştırılan enzimin pH kararlılığı 4, 37 ve 85 °C değerlerinde zamana karşı incelendiğinde 4 °C'de, pH 2,2 ve pH 4,0'da 24 saat sonunda enzimin %80 aktivitesini koruduğu, pH 6,0 da ise 24 saat sonunda enzimin %70 aktivitesini koruduğu gözlemlendi (Şekil 15.). 37 ve 85 °C'lerde ise pH 2,2, 4,0 ve 6,0'da 1 saat sonunda *Geobacillus* sp. TF16 fitazı %80 oranında, 2 saat sonunda ise %70 oranında aktivitesini korumuştur (Şekil 16 ve Şekil 17). Bu konuda yapılan literatür araştırmaları sonuçlarına göre, *Aspergillus ficuum* NTG-23'dan saflaştırılan fitaz enziminin 60 ve 70 °C'de 1 saat sonunda %100'e yakın aktivitesini koruduğu gözlenmiş, fakat 80 °C'de 10 dakika sonunda aktivitenin tamamen kaybolduğu anlaşılmıştır (Zhang vd., 2010). *L. Sanfranciscensis* CB1 fitazını pH 4,0 sodyum asetat tamponunda 60 ve 70 °C'lerde 30 dakika sonunda aktivitesini yüksek oranda koruduğu, fakat 80 °C'de ve pH 4,0 sodyum asetat tamponunda 10 dakika sonunda aktivitesinin %10'unu 30 dakika sonunda ise tamamını kaybettiği bildirilmiştir (De Angelis vd., 2003). *Aspergillus niger* ATCC 9142'den saflaştırılan fitaz enzimi 2 farklı ticari fitaz ile kıyaslanarak 80 °C'deki ısı kararlılığı incelenmiş ve optimum şartlar altında ticari fitaz enzimlerinin 4 saat sonunda tamamen aktiviteyi kaybettiği, *Aspergillus niger* ATCC 9142 fitazının ise %80 oranında aktivitesini kaybettiği saptanmıştır (Casey ve Walsh, 2003). Literatür sonuçları ile karşılaştırılan *Geobacillus* sp. TF16 fitazı özellikle 85 °C gibi yüksek sıcaklıklarda farklı pH değerlerinde aktivitesini uzun süre koruyabildiği anlaşılmıştır ve bu özelliği, *Geobacillus* sp. TF16 fitazının hayvan yem üretim proseslerinde yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen ön işlem basamaklarında kullanılabilme potansiyeline sahip olabileceğini desteklemektedir.

Saflaştırılan enzimin kinetik parametreleri olan  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri Lineawaver-Burk grafiğinden sırasıyla 1,31 mM ve 526,28 U/mg olarak hesaplandı (Şekil 13).  $K_m$  değeri enzimin substratına ilgisinin bir göstergesidir. Enzimler substratlarını ürüne dönüştürürken reaksiyon bir enzim-substrat ara kompleksi üzerinden gerçekleşir.  $K_m$  değeri oluşan bu ara kompleksin kararlılığının bir göstergesidir. Düşük  $K_m$  değeri güçlü bir bağlanmayı ifade eder (Keha ve Küfrevioğlu, 2000). Ayrıca, bir enzimin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri izole edilen organizmanın türüne ve kullanılan substrata göre değişiklik gösterir. *Bacillus* sp. DSII'den saflaştırılan fitaz enziminin  $K_m$  değerinin 0,55 mM olduğu (Kim vd., 1998), *Aspergillus ficuum* NTG-23'dan saflaştırılan fitaz enziminin  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerlerinin sırasıyla 0,295 mM ve 55,9 nmol/min olduğu (Zhang vd., 2010), bir başka *Aspergillus niger* suşundan saflaştırılan fitaz enziminin ise  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla 7,7 mM ve 5137,9 U/mL olduğu (Akturk vd., 2013) rapor edilmiştir. Literatür araştırması sonucunda geniş bir aralıkta  $K_m$  değerine sahip birçok çalışma olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca, bu çalışmaların büyük çoğunluğu fungus temelli fitazlar üzerine yapılan çalışmalardır. Literatür sonuçlarına göre, çok daha düşük  $K_m$  değerleri olmasına karşın literatür aralığında  $K_m$  değerine sahip olan *Geobacillus* sp. TF16 fitazı yüksek bir  $V_{maks}$  değerine sahiptir.

*Geobacillus* sp. TF16'dan saflaştırılan fitaz enzimi en yüksek aktiviteyi 4-metilumbelliferil fosfat substratı varlığında göstermiştir. Glukoz 6-fosfat varlığında %90 bağıl aktivite gösteren *Geobacillus* sp. TF16 fitazı ATP, ADP ve sodyum fitat substratlarına yaklaşık %50 bağıl aktivite göstermektedir (Tablo 16). Literatür sonuçlarında, *Aspergillus niger* ATCC 9142'dan saflaştırılan fitazın sodyum fitata en yüksek ilgiye sahip olduğu, ATP, ADP'ye sırasıyla %38,8 ve %25,6 bağıl aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Casey ve Walsh, 2003). *Candida krusei* WZ-001'dan saflaştırılan fitaz enziminin en yüksek ilgisinin fitata olduğu, ATP, ADP ve D-glukoz 6-fosfata sırası ile %7, %8 ve %20 bağıl aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Quan vd., 2002). *Aspergillus ficuum* NTG-23'dan saflaştırılan fitaz enzimi için sodyum fitata ilgisi %100 kabul edilerek ATP, ADP ve glukoz 6-fosfat için % bağıl aktivitelerin sırasıyla 250,6, 177,5 ve 190,6 olduğu bulunmuş (Zhang vd., 2010). *Geobacillus* sp. TF16 fitazı literatür sonuçları ile kıyaslandığında *Aspergillus ficuum* NTG-23 fitazına yakın değerlerde substrat özgünlüğüne sahip olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, *Geobacillus* sp. TF16 fitazının tek bir substrata özgü aktivite göstermediği ve birçok fosfat grubu içeren substratı hidrolizleyebilme yeteneğine sahip olduğu anlaşılmıştır.

Bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde, farklı konsantrasyonlarda metaller varlığında enzim aktivitesinin bazı metaller hariç fazla değişmediği tespit edilmiştir (Şekil 19).  $\text{Cu}^{2+}$  iyonunun farklı konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde; 1 mM'lık nihai konsantrasyonda enzim aktivitesinin %30 azaldığı, 10 mM'da ise %350 arttığı tespit edilmiştir (Şekil 19). Yani 10 mM'lık nihai  $\text{Cu}^{2+}$  konsantrasyonu enzim aktivitesini yaklaşık 4,5 kat arttırmıştır.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ve  $\text{Al}^{3+}$  iyonlarının farklı konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde; 1 ve 5 mM'lık nihai konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin fazla değişmediği, 10 mM'lık nihai konsantrasyonlarda ise enzim aktivitesinin %50-150 oranlarında arttığı tespit edilmiştir.  $\text{Ca}^{2+}$  iyonunun farklı konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde; 1 mM'lık nihai konsantrasyonda enzim aktivitesinin %40 arttığı, 10 mM'da ise %20 düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 19). EDTA'nın artan konsantrasyonlarının enzim aktivitesini yaklaşık %50 oranında azalttığı gözlenmiştir. Genel anlamda EDTA'nın enzim aktivitesini düşük oranda inhibe ettiği söylenebilir. Organik çözücülerin ve deterjanların varlığındaki kalan aktivite çalışmalarında ise SDS'in %1'lik konsantrasyonunda enzim aktivitesinin %30 oranında arttığı, artan SDS konsantrasyonlarında ise aktivitenin %50 oranında azaldığı görülmüştür. Triton X100 ve Tween 20 deterjanlarının tüm konsantrasyonlarda enzim aktivitesinin tamamen kaybolduğu görülmüştür. Ayrıca %1 ve 5'lik Triton X114 varlığında aktivite %50 oranında korunmasına karşın %10'luk Triton X114 konsantrasyonu ile tamamen kaybolmuştur (Şekil 18). Organik çözücülerin değişen konsantrasyonlarında ise genel anlamda enzim aktivitesinin korunduğu ve hatta aktivitenin artma eğiliminde olduğu görülmüştür.

Metal iyonları enzim aktivitelerini farklı şekillerde etkilemektedir. Mullaney vd. 2000 yılında *Bacillus* fitazının hem aktivite hem de ısıl kararlılık için  $\text{Ca}^{2+}$  iyonuna ihtiyaç duyduğunu ifade etmiştir. *Lactobacillus brevis* fitazının divalent metal iyonları varlığındaki aktivite çalışmalarında 1 ve 5 mM konsantrasyonlar enzim aktivitesi büyük oranda korunmuştur (Sümengen vd., 2012). *Klebsiella pneumoniae* 9-3B'den saflaştırılan fitaz enziminin metal iyonları varlığındaki aktivite çalışmaları sonucunda 1 mM metal varlığında aktivite büyük oranda aktivite gözlenmiş, 5 mM konsantrasyonda metal varlığında ise aktiviteler yüksek oranda düşmektedir ve bu çalışmada 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  konsantrasyonda %103 aktivite alınırken, 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ 'de %78,90 aktivite görülmüştür (Escobin-Mopera vd., 2012). *Aspergillus ficuum* NTG-23 fitazının metallerin varlığındaki



çalışmasında artan metal konsantrasyonu sonucu (1,25-2,5-5-10 mM) enzim aktivitesi %100'e kadar korunmuştur (Zhang vd., 2010). *Aspergillus niger* ATCC 9142 fitazında metaller varlığında  $Ca^{2+}$  için %68,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  varlığında yaklaşık %150 bağıl aktivite gözlemlenmiştir (Casey ve Walsh, 2003). Literatür sonuçlarına göre düşük konsantrasyonlardaki  $Ca^{2+}$  aktiviteyi artırırken, yüksek konsantrasyonlarda aktiviteyi azaltan bir etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır. Bazı kimyasalların varlığında kapsamında yapılan literatür çalışmalarında, *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1 fitazı için EDTA varlığında %92,5 aktivite gösterdiği gözlenmiştir (De Angelis vd., 2003). *Sporotrichum thermophile*'den izole edilen fitaz enziminin %10'luk organik çözücüler varlığındaki aktivite çalışmaları yapılmış, %10 aseton varlığında %94,72, etanol varlığında %77,2 bağıl aktivite, %0,5 oranında detarjan varlığındaki çalışmalarda ise Triton X100 için %82,34, Tween 20 için %124,48 ve SDS için %32,98 bağıl aktivite gözlenmiştir (Singh ve Satyanarayana, 2009). Metal iyonları ve organik çözücüler varlığında *Geobacillus sp.* TF16 fitazı genel olarak aktivitesini korurken, deterjanlar varlığında ise aktivitesini kaybettiği veya kaybetme eğiliminde olduğu söylenebilir.

Sindirim sisteminde yer alan tripsin ve kimotripsin gibi proteazların varlığında enzim kararlılığını belirlemek için *Geobacillus sp.* TF16 fitazının aktivitesi yine sindirim sistemi sıcaklığı olan 37 °C'de proteazlar ile inkübe edildikten sonra ölçülerek belirlendi. 30 dakika sonunda aktivitenin %78,5, 1 saat sonunda ise %62,46 oranında korunduğu bulundu (Şekil 20). *Aspergillus ficuum* NTG-23 fitazının proteazlar varlığındaki kararlılığı çalışmasında, ticari olarak üretilen *A. niger*, *A. oryzae* ve *E. coli* fitazları ile kıyaslama yapılmış ve 20 dakika sonrasında kalan aktiviteler hesaplanmıştır. 20 dakikalık inkübasyon sonucunda *A.niger* fitazı pepsin varlığında %68 tripsin varlığında %10,2, *A. oryzae* fitazı pepsin varlığında %70,1 tripsin varlığında %84,7, *E. coli* fitazı pepsin varlığında %123,7 tripsin varlığında %79,0 oranında aktivitesini koruduğu bildirilmiştir (Zhang vd., 2010). *Aspergillus niger* fitazının proteaz dayanıklılığı incelemesinde proteazların varlığındaki 1 saatlik inkübasyon sonucunda enzimin %60 oranında aktivitesini koruduğu bildirilmiştir (Karaman vd., 2004). *Geobacillus sp.* TF16 fitazının proteaz varlığındaki performansı literatür ile uyumlu sonuçlar gösterdiği ve nisbeten sindirim sisteminde yer alan proteazlara karşı dirençli olduğu söylenebilir. Bu da enzimin hayvan yemi katkısı olarak kullanılabilirliğini ve hayvan sindirim sisteminde de proteazlardan fazlaca etkilenmeden etkisini gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

*Geobacillus sp.* TF16 fitazının soya sütü fitatı hidrolizleme performansı 4 saatlik inkübasyon (85 °C) sonunda yaklaşık %20 olarak belirlenmiştir. Literatür araştırmalarında, soya fasülyesi tohumundan izole edilen fitaz enzimi 60 °C'de 5 saat sonunda soya sütü fitatını %76 oranında hidrolizlediği, ticari olarak satın aldıkları fitaz enziminin ise aynı şartlar altında 5 saat sonunda %42 hidrolizleme kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Çelem ve nal, 2009).

Sonuç olarak; fitaz enzimi bakterilerde fazla çalışılmamış ve *Geobacillus* türlerinde böyle bir çalışmaya hiç rastlanmamıştır. Bu yüzden bu alışma *Geobacillus* türlerinde yapılan ilk fitaz çalışmasıdır. Ayrıca enzim literatürde pek rastlanmayan yüksek bir sıcaklık optimumuna da sahiptir. Isıl ve pH kararlılık yönünden de birçok mikrobiyal fitazdan daha kararlıdır. İlaveten birçok enzimden daha yüksek bir spesifik aktiviteye de sahiptir. Ayrıca proteazlara karşı dirençlidir ve doğal substratı olan soya sütünü fitatını hidrolizleyebilmektedir. Bütün bu sonuçlar değerlendirildiğinde *Geobacillus sp.* TF16 fitazının yem sanayinde kullanım potansiyeline sahip olabilecek değerli bir enzim adayı olduğu görülmektedir.

## 5. ÖNERİLER

Enzim endüstrisi, modern biyoteknolojik araçların da kullanımı ile birçok üretim işleminin geliştirilmesine önemli derecede katkı sağlamaktadır. Daha az miktarda enerji, su ve hammadde tüketimi ile daha az atık ve çevresel kirlilik bu teknolojinin hedeflenen yararları arasındadır. Enzim teknolojilerinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, endüstriyel enzimler ile ilgili yapılan araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Endüstride enzim kullanımının gün geçtikçe yaygınlaşması, çok değişik kaynaklardan enzimlerin saflaştırılması ve karakterizasyonunu da beraberinde getirmektedir. Enzimlerin ilaç, tekstil, kozmetik, temizlik, gıda ve ziraat gibi temel alanlarda kullanımı günümüzde rutin uygulamalar haline gelmekle beraber, ülkemiz enzim kullanımında Avrupa ve Amerika'ya nazaran daha geridedir. Avrupa'da ve Amerika'da farklı firmaların ürettiği ticari enzimlerin piyasalarda olmasına rağmen, yeni ve farklı özelliklere sahip enzimlerin keşfi hala sıcak bir araştırma alanıdır.

Yapılan bu çalışmada, yeni izole edilen bu bakterilerin 7 tanesi fitaz üretme kapasiteleri açısından incelendi ve *Geobacillus sp.* TF16 suşundan bu enzim saflaştırılarak karakterize edildi. Ülkemiz kaplıcalarından izole edilen ve yeni suşlar olan termofilik organizmalardan endüstriyel öneme sahip ısıl kararlı enzimlerin elde edilmesi, kendi kaynaklarımızı kullanmak açısından oldukça önemlidir.

Klasik kromatografik metotlarla enzim saflaştırmaları, saflaştırma verimi açısından düşük etkinliğe sahiptir. Özellikle mikroorganizmaların enzimleri az miktarda ekspres ettiği de göz önüne alındığında birkaç adımlık saflaştırma prosesi sonucu mikrogram düzeyinde saf enzim elde edilebilmektedir. Saflaştırılan enzimin N-ucundan ve C-ucundan aminoasit sırası belirlenerek enzimi kodlayan gen için primerler tasarlanabilir ve bu primerler kullanılarak enzimi kodlayan gen rekombinant DNA teknikleri ile klonlanabilir. Böylece orijinal kaynağında düşük seviyede ekspres edilen bu enzim bol miktarda üretilebilir hale getirilebilir.

Ayrıca enzim farklı destek materyallerine farklı şekillerde immobilize edilerek enzim etkinliği incelenebilir. Enzimin farklı konsantrasyonlarda metaller ( $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Al}^{3+}$  gibi) varlığındaki davranışları daha detaylıca incelenebilir. Ayrıca şartları optimize ederek fitaz enziminin soya sütü hidrolizleme kapasitesi de iyileştirilebilir. Saflaştırılan enzimin

Özellikle balık yemi üretim endüstrisinde kullanılabilirliğini ortaya koymak açısından, yem üretim proseslerindeki ön işlem aşamalarında yem ile muamele edilerek yem verimliliğinin arttırma etkinliği incelenebilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Akturk, S., Korkmaz, G. H. ve Dinçer, S., 2013. Poster Presentations / Current Opinion in Biotechnology, 24, 48–143.
- Aşan, M., 2006. Mikrobiyal Fitazlar, Uygulama Alanları ve Biyoteknoloji, Tarım Bilimleri Dergisi, 13, 147-155.
- Baldi, B.G., Scott, J.J., Everard, J.D. ve Loewus, F.A., 1988. Localization of constitutive phytases in lily pollen and properties of the pH 8 form, Plant Science, 56, 137-147.
- Baruah, K., Sahu, N.P., Pal, A.K., Debnath, D., Yengkokpam, S. ve Mukherjee, S.C., 2007. Interactions of dietary microbial phytase, citric acid and crude protein level on mineral utilization by Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), Juveniles, Journal of The World Aquaculture Society, 38, 238-249.
- Billington, D.C., 1993. The inositol phosphates, Chemical Synthesis and Biological Significance, Verlag Chemie, Weinheim, 364 S.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Analytical Biochemistry, 72, 248-254.
- Brocades, G., 1991. DNA sequence encoding phytase, Pat EP, 420, 358.
- Campbell, G.L. ve Bedford, M.R., 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: A review, Canadian Journal of Animal Science, 72, 449-466.
- Casey, A. ve Walsh, G., 2004. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest, Journal of Biotechnology, 110, 313–322.
- Casey, A. ve Walsh, G., 2003. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142, Bioresource Technology, 86, 183–188.
- Chen, P. S., Tosibara, T. Y. ve Warner, H., 1956. Microdetermination of phosphorus, Analytical Chemistry, 28, 1756.
- Choi, Y.M., Suh, H.J. ve Kim, J.M., 2001. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10, Journal of Protein Chemistry, 20, 287-292.
- Quan, C.S., Sheng-Di, F., Zhang, L.H., Wang, Y.J. ve Ohta, Y., 2002. Purification and Properties of a Phytase from *Candida krusei* WZ-001, Journal of Bioscience and Bioengineering, 94, 5, 419-425.
- Çelem, E. B. ve Onal, S., 2009. Immobilization of phytase on epoxy-activated Sepabead EC-EP for the hydrolysis of soymilk phytate, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 61, 150–156.

- De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M. R., McSweeney, P. L., Faccia, M., Giovine, M. ve Gobbetti, M., 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1, International Journal of Food Microbiology, 87, 3 259-270.
- Ellestad, L.E., Angel, R. ve Soares J. 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.
- Escobin-Mopera, L., Ohtani, M., Sekiguchi, S., Sone, T., Abe, A., Tanaka, M. ve Asano, K., 2012. Purification and characterization of phytase from *Klebsiella pneumoniae* 9-3B, Journal of Bioscience and Bioengineering, 113, 5, 562-567.
- Gibson, D.M. ve Ullah, A.H., 1988. Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds, Archives of Biochemistry Biophysics, 260, 503-513.
- Greiner, R., Haller, E., Konietzny, U. ve Jany, K.D., 1997. Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*, Archives Biochemistry Biophysics, 341, 201-206.
- Greiner, R., Konietzny, U. ve Jany, K.D., 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*., Archives of Biochemistry and Biophysics, 303, 107-113.
- Greiner, R., Larsson Alminger, M., Carlsson, N.G., Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., Pedrosa, M.M. ve Goyoaga, C., 2002. Enzymatic phytate degradation-A possibility to design functional foods, Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 21, 50-54.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. ve Chauhan, B., 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective, Process Biochemistry, 38, 1599–1616.
- Ha, N.C., Oh, B.C., Shin, S., Kim, H.J., Oh, T.K., Kim, Y.O., Choi, K.Y. ve Oh, B.H., 2000. Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states, Nature Structural Biology, 7, 147-153.
- Han, Y., Wilson, D.B. ve Lei, X.G., 1999. Expression of an *Aspergillus niger* Phytase Gene (phyA) in *Saccharomyces cerevisiae*, Applied Environmental Microbiology, 65, 1915-1918.
- Han, Y.M., Yang, F., Zhou, A.G., Miller, E.R., Ku, P.K., Hogberg, M.G. ve 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.
- Hara, A., Ebina, S. ve Kondo, A., 1985. A new type of phytase from pollen of *Typha latifolia* L., Agricultural and Biological Chemistry, 49, 3539-3544.

- Hegeman, C.E. ve 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.
- Hurrell, R.F., 2003. Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability, Journal of Nutrition, 133, 2973-2977.
- Iqbal, T.H., Lewis, K.O. ve Cooper, B.T., 1994. Phytase activity in the human and rat small intestine. Gut, 35, 1233-1236.
- Karaman M., Gürbüz Y., Özköse E. ve Ekinçi M.S., 2004. Study on stability of fungal phytase as poultry feed additive, Journal of Animal and Feed Sciences, 13, 313-321.
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 2000. Biyokimya 2. Baskı, Aktif Yayınevi, Trabzon, 638 S.
- Kerovuo, J., 2000. A Novel Phytase from *Bacillus*, Characterization and Production of the Enzyme, Academic Dissertation, 68.
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N. ve Apajalahti, J., 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*, Applied Environmental Microbiology, 64, 2079–2085.
- Kim, Y.O, Kim, H.K., Bae, K.S., YU, J.H. ve OH, T.K., 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus sp.* DS11, Enzyme and Microbial Technology, 22, 2-7.
- Kirk, O., Borchert, T.V. ve Fuglsang, C.C., 2002. Industrial Enzyme Applications, Current Opinion in Biotechnology, 13, 345-351.
- Konietzny, U. ve Greiner, R., 2002. Molecular and catalytic properties of phytase-degrading enzymes (phytases), International Journal of Food Science and Technology, 37, 791-812.
- Konietzny, U. ve Greiner, R., 2003. Phytic acid: Nutritional Impact. In: Encyclopedia of Food Science and Nutrition, B. Caballero, L. Trugo, P. Finglas (Eds.), Elsevier, 4555-4563.
- Konietzyn, U. ve Greiner, R., 2004. Bacterial phytase: Potential application, in vivo function and regulation of its synthesis, Brazilian Journal of Microbiology, 35, 11-18.
- Kumar, V., Sinha, A.K. , Makkar, H.P.S. ve Becker, K., 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review, Food Chemistry, 120, 945-959.
- Laboure, A.M., Gagnon, J. ve 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.

- Lei, X.G. ve Porres, J.M., 2003. Phytase enzymology, applications, and biotechnology, Biotechnology Letters, 25, 1787-1794.
- Lei, X.G., Porres, J.M., Mullaney, E.J. ve Brinch-Pedersen, H., 2007. Phytase: source, structure and application, In Industrial Enzymes, 505–529.
- Li, J., Hegeman, C.E., Hanlon, R.W., Lacy, G.H., Denbow, M.D. ve Grabau, E.A., 1997. Secretion of active recombinant phytase from soybean cell-suspension cultures, Plant Physiology, 114, 1103–1111.
- Liu, B.L., Rafiq, A., Tzeng, Y. ve Rob, A., 1998. Induction and characterization of phytase and beyond, Enzyme and Microbial Technology, 22, 415-424.
- Latta, M. ve Eskin, M., 1980. Journal of Agricultural Food Chemistry, 28, 1313–1315.
- Mitchell, D.B., Vogel, K., Weimann, B. J., Pasamontes, L. ve A Van Loon, 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. ve Ullah, A.H.J., 2000. Advances in phytase research. Advances in Applied Microbiology, 47, 157–199.
- Mwachireya, S.A., Beames, R.M., Higgs, D.A. ve Dosanjh, B.S., 1999. Digestibility of canola protein products derived from the physical, enzymatic and chemical processing of commercial canola meal in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) held in fresh water, Aquacultural Nutrition, 5, 73-82.
- Nelson, D.L. ve Cox, M.M., 2008. Lehninger Principles of Biochemistry, 1158 S.
- Oh, B.C., Choi, W.C., Park, S., Kim, Y.O. ve Oh, T.K., 2004. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phosphatase, Applied Microbiology and Biotechnology, 63, 362-372.
- Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A. ve Soccol, A.T., 2001. Production, purification and properties of microbial phytases, Bioresource Technology, 7, 203-217.
- Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier M. ve A.P.G.M., Vanloon, 1997a. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*, Applied and Environmental Microbiology, 63, 5, 1696-1700.
- Pasamontes, L., Haiker, M., HenriquezHuecas, M., Mitchell, D.B. ve A.P.G.M. Vanloon, 1997b. Cloning of the phytases from *Emericella nidulans* and the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*, Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression, 1353, 3, 217-223.
- Phillippy, B.Q. ve Wyatt, C.J., 2001. Degradation of phytate in foods by phytases in fruits and vegetable extracts, Journal of Food Science, 66, 535-539.



- Porta, C., Paglino, C., De Amici, M., Quaglini, S., Sacchi, L., Imarisio, I. ve Canipari, C., 2010. Predictive value of baseline serum vascular endothelial growth factor and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in advanced kidney cancer patients receiving sunitinib, Kidney international, 77, 9, 809-815.
- 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.
- Reddy, N.R., Sathe, S.K. ve Salunkhe, D.K., 1982. Phytases in legumes and cereals. Advances in Food Research, 28, 1-92.
- Robinson, E.H., Jackson, S. ve Li, M.H., 1996. Supplemental phytase in catfish diets, Aquaculture Magazine, 22, 80-82.
- Rumsey, G.L., 1993. Fish meal and alternate sources of protein in fish feeds, Fisheries, 18, 14-19.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. ve Maniatis, T., 1989. Molecular cloning. Vol. 2. New York: Cold spring harbor laboratory press,
- Schallmeyer, M., Singh., A. ve Ward, O. P., 2004. Developments in the Use of Bacillus Species for Industrial Production, Canadian Journal of Microbiology, 50, 1-17.
- Selle, P. H., Walker, A. R. ve Li Bryden, W., 2003. Total and phytate-phosphorus contents and phytase activity of Australian-sourced feed ingredients for pigs and poultry, Animal Production Science, 43,5, 475-479.
- Selle, P.H. ve Ravindran, V., 2007. Microbial phytase in poultry nutrition, Animal Feed Science and Technology, 135, 1-41.
- Selle, P.H., Gill, R.J. ve Scott, T.A., 2007. Effects of pre-pelleted wheat and phytase supplementation on broiler growth performance and nutrient utilisation, Proceedings of Australian Poultry Science Symposium, 19, 182-185.
- Selle, P.H., Ravindran, V., Caldwell, R.A. ve Bryden, W.L., 2000. Phytate and phytase: Consequences for protein utilisation, Nutrition Research Reviews, 13, 255-278.
- Shamsuddin, A.M., 2002. Anti-cancer function of phytic acid, International Journal of Food Science Technology, 37, 769-782.
- Shears, S.B., 1998. The versatility of inositol phosphates as cellular signals, Biochimica et Biophysica Acta, 1436, 49-67.
- Shin, S., Ha, N.C., Oh, B.C., Oh, T.K. ve Oh, B.H., 2001. Enzyme mechanism and catalytic property of  $\beta$ -propeller phytase, Structure, 9, 851-858.
- Singh, B. ve Satyanarayana, T., 2009. Characterization of a HAP-phytase from a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*, Bioresource technology, 100, 6, 2046-2051.

- Sogut, M. S., Gokce, A., Ozturk, Y., Mandaci, S., Cayir, E., Karasu, D. ve Ozturk, D. C., 2013. Cloning, overexpression and characterization of the *Bacillus* phytase encoding gene, YMNphyA, in *E.coli.*, Current Opinion in Biotechnology, 24, 95.
- Sümengen, M., Dinçer, S. ve Kaya A., 2012. Phytase production from *Lactobacillus brevis*, Turkish Journal of Biology, 36, 5, 533-541.
- Stryer, L., Berg, J. M. ve Tymoczko J. L., 2005. Journal of Biochemistry, 190.
- Tambe, S.M., Kaklij, G.S., Kelkar, S.M. ve 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, 77, 23-27.
- URL-1, <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>. 11 Mart 2015.
- Van Etten, R.L., Davidson, R., Stevis, P.E., MacArthur, H. ve Moore, D.L., 1991. Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase, The Journal of Biological Chemistry, 266, 2313-2319.
- Van Hartingsveldt, W., Van Zeijl, C.M.J., Harteveld, M., Gouka, R.J., Suykerbuyk, M.E.G., Luiten, R.G.M., Van Paridon, P.A., Selten, G.C.M., Veenstra, A.E., Van Gorcom, R.F.M. ve Van den Hondel, C.A.M.J.J., 1993. Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (phyA) of *Aspergillus niger*, Gene, 127, 87-94.
- Vohra, A. ve Satyanarayana, T., 2003. Phytases: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications, Critical Reviews in Biotechnology, 23, 1, 29-60.
- Wiseman, A., 1987. The Application of Enzymes in Industry, Handbook of Enzym Biotechnology, 274-373.
- Woese, C.R., Kandler, O. ve Wheelis, M.L., 1990. Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains *Archea*, *Bacteria* and *Eucarya*, Proceeding of the National Academy of Sciences, 97, 4576-4579.
- Wolfgang, A., 2004. Enzymes in industry: Production and applications, Wileyvch Verlag GmbH&Co. KgaA, 485 S.
- Yanke, L. J., Bae, H.D., Selinger, L. B. ve Cheng, K. J., 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria, Microbiology, 144, 1565-1573.
- Zhang, G.Q. Dong, X.F., Wang, Z.H., Zhang, Q., Wang, H.X. ve Tong, J.M., 2010. Purification, characterization, and cloning of a noval phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23, Bioresource Technology, 101, 4125-4131.

## ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2004 yılında Balıkesir Üniversitesi, Kimya Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı ve 2009 yılında bu bölümden mezun oldu. Mezuniyet sonrasında askeri görevini kısa dönem er olarak Adıyaman'da tamamladı. 2 yıl boyunca farklı kimya firmalarında Kimyager olarak çalıştı. 2012 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında yüksek lisans programına başladı. Yabancı dili İngilizce'dir.