

Brevibacillus brevis (P14) VE *Brevibacillus borstelensis* (P35)
BAKTERİLERİ TARAFINDAN AYNI ORTAMDA
MANNANAZ VE FİTAZ ENZİMLERİNİN
ÜRETİLEBİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Shadi SADIGH

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Mikrobiyoloji Bilim Dalı

Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

2014

Her Hakkı Saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Brevibacillus brevis (P14) VE *Brevibacillus borstelensis* (P35)
BAKTERİLERİ TARAFINDAN AYNI ORTAMDA MANNANAZ VE
FİTAZ ENZİMLERİNİN ÜRETİLEBİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

Shadi SADIGH

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ BİLİM DALI

ERZURUM
2014

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

***Brevibacillus brevis* (P14) VE *Brevibacillus borstelensis* (P35) BAKTERİLERİ
TARAFINDAN AYNI ORTAMDA MANNANAZ VE FİTAZ ENZİMLERİNİN
ÜRETİLEBİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, Shadi SADIGH tarafından hazırlanan bu çalışma 24/12/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Hayrunisa NADAROĞLU

İmza:

Üye: Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

İmza:

Üye: Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 31 / 12 / 2014 tarih ve 52 / 1760 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Brevibacillus brevis* (P14) VE *Brevibacillus borstelensis* (P35) BAKTERİLERİ TARAFINDAN AYNI ORTAMDA MANNANAZ VE FİTAZ ENZİMLERİNİN ÜRETİLEBİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Shadi SADIGH

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Bu çalışmada; fitaz ve mannanaz enzimlerinin üretimi, serbest ve immobilize *Brevibacillus brevis* (P14) ve *Brevibacillus borstelensis* (P35) bakterileri kullanılarak keçiyoynuzu (KB) ve mısır (MSR) bulunan doğal besiyerortamında yapılmıştır. Bu amaçla farklı oranlarda KB (10, 20, 30 ve 40 g) ve MSR (10, 15 ve 20 g) ihtiva eden ortama, test bakterileri inoküle edildikten sonra büyüme koşulları olan pH 7.0 ve 55°C' de inkübasyona bırakıldı.

Florosil destek materyaline öncelikle APTES ile -NH₂ grubu takıldı. Ardından glutaraldehit ile ara kolu oluşturuldu ve oluşan schiff bazı kararlı hale getirmek için sodium borhidrür ile indirgendi. Aktifleştirilmiş florosil destek materyali nano Fe₃O₄ bileşiği ile magnetik hale getirildi ve bakterilerin immobilizasyonu için kullanıldı. Her iki bakteri hazırlanan magnetit florosil nanopartiküllerine yaklaşık %65 oranında immobilize edildiği belirlendi.

Fitaz ve mannanaz enzimlerinin üretimi ise hem serbest hem de matrikse bağlı mikroorganizmalar ile gerçekleştirildi. KB ve MSR doğal karbon kaynakları kullanılarak yapılan *B. brevis* (P14) ve *B. borstelensis* (P35) bakterilerinin fitaz ve mannanaz enzim üretiminin, serbest haldeki izolatlara göre, bağlı olanlarda yaklaşık % 59-81 civarında bir artış gözlemlendi. Elde edilen bu bulgular ışığında magnetit florosil nanopartiküle bağlı test strainlerinin gıda, ziraat, ilaç başta olmak üzere birçok endüstriyel alanda güvenle kullanılabileceği sonucuna varıldı.

2014, 49 sayfa

Anahtar Kelimeler: Mannanaz, Fitaz, *Brevibacillus brevis*, *Brevibacillus borstelensis* Enzim, Immobilizasyon

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE PRODUCIBILITY OF THE MANNANASE AND PHYTASE ENZYMES BY *Brevibacillus brevis* (P14) AND *Brevibacillus borstelensis* (P35) IN THE SAME CONDITIONS

Shadi SADIGH

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Science

Department
of Molecular Biology and Genetics
Department of Microbiology
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet ADIGUZEL

In this study, production of the mannanase and phytase enzymes was carried out in a natural medium which includes corn (C) and carob (CB), using free and immobilized *Brevibacillus brevis* (P14) and *Brevibacillus borstelensis* (P35) bacterial strains. For this purpose, the test bacteria were inoculated in a medium containing different amounts of CB (10, 20, 30 and 40 g) and C (10, 15 and 20 g) and then they were incubated under the growth conditions; pH 7.0 and 55°C.

First, florasil support material was attached to the NH₂ group by APTES. Then intermediate arm was created with glutaraldehyde and schiff base was reduced with sodium borohydride, in order to make it stable. Activated florasil support material was made magnetic with nano Fe₃O₄ compounds and used for the immobilization of bacteria. It was determined that both bacteria were immobilized on the prepared magnetic florasil nanoparticles approximately 65%.

The production of phytase and mannanase enzymes was performed with both free and matrix-immobilized microorganisms. An increase was observed approximately 59-81% in the immobilized ones compared to free ones of *B. brevis* (P14) and *B. Borstelensis* (P15) bacteria used in the production of phytase and mannanase enzymes that C and CB were used as a carbon source. According to the findings, it was concluded that the test strains that were immobilized to magnetic florasil nanoparticles could be safely used in many industrial fields like food, agriculture and particularly medicine.

2014, 49 pages

Keywords: Mannanases, phytase, *Brevibacillus brevis*, *Brevibacillus borstelensis*, enzyme, immobilization

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmam boyunca hiçbir şekilde desteğini esirgemeyen, birikimini sürekli sabır çerçevesinde sunan, çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde bana yol gösteren, bilgisini her zaman yanımda hissettiğim tez danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e, çalışmalarımın değerlendirilmesinde büyük emeği geçen, Sayın hocam Doç. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na (Atatürk Üniversitesi, Erzurum Meslek Yüksekokulu Öğretim Üyesi), desteklerinden dolayı Sayın hocam Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a (Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi ve Bölüm Başkanı) ve laboratuvardaki çalışmalarım sırasında yardımları için sayın Araştırma Görevlisi M. Özkan BALTACI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma, ayrıca eğitimimin her aşamasında maddi, manevi desteklerini esirgemeyen anneme ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

Shadi SADIGH
Aralık, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	18
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	24
3.1. Kullanılan Materyal, Cihaz ve Kimyasal Maddeler	24
3.1.1. Materyal.....	24
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	24
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	31
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	40
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	50

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat derecesi
Ca ²⁺	Kalsiyum
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
DNSA	Dinitrosalisilikasid
FeSO ₄	Demirsulfat
Fe ₃ O ₄	Demiroksit
g	Gram
HCl	hidrojen kloür
HNO ₃	Nitrik asit
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
Na ⁺	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür
NaCNBH ₃	Sodyum siyanoborohidrit
NaOH	Sodyum hidroksit
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
PCA	Plate Count Agar
TCA	Triklorasetik asit
Tris-HCl	Trihidroksimetil amino metan-hidroklorik asit
TSA	Tripticase soy agar
TSB	Tripticase soy broth
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enzim reaksiyonunun hızı ile enzim konsantrasyonunun bağlantısı.....	5
Şekil 1.2. Enzimin reaksiyon hızı ile substrat konsantrasyonunun bağlantısı.....	6
Şekil 1.3. Enzimin reaksiyon hızı ile sıcaklıkbağlantısı	6
Şekil 1.4. Enzimin reaksiyon hızı ile pH'ın bağlantısı	7
Şekil 1.5. Michaelis–Menten grafiği.....	9
Şekil 1.6. Lineweaver-Burk grafiği	10
Şekil 1.7. Fitik asidin 3-fitaz ve 6-fitaz ile hidrolizi	11
Şekil 1.8. β -mannanaz yapısı	14
Şekil 1.9. Florisil destek materyalinin 3-APTES ile active edilmesi.....	27
Şekil 1.10. Aktifleştirilmiş florisil desteğinin glutaraldehit ile reaksiyonu.....	28
Şekil 1.11. Aktifleştirilmiş florisil desteğinin glutaraldehit ile reaksiyonu sonucu oluşan Schiff bazının indirgenmesi.....	28
Şekil 1.12. Aktifleştirilmiş florisil desteğinin nano Fe_3O_4 ile muamele edilmesi	29

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Termofilik mikroorganizmalara ait enzimlerin endüstriyel uygulamaları	3
Çizelge 4.1. Serbest ve immobilize <i>B. brevis</i> (P14) ve <i>B. borstelensis</i> (P35)'e ait dilüsyon oranları ve bakteri sayıları.....	31
Çizelge 4.2. Fitaz enziminin P14 bakterisi tarafından üretiminde zamana bağlı değişimi.....	33
Çizelge 4.3. Fitaz enziminin <i>B. borstelensis</i> (P35) tarafından üretiminin zamana bağlı değişimi	35
Çizelge 4.4. Mannanaz enziminin <i>B. brevis</i> (P14) tarafından üretiminin zamana bağlı değişimi	37
Çizelge 4.5. Mannanaz enziminin <i>B. borstelensis</i> (P35) bakterisi tarafından üretiminin zamana bağlı değişimi.....	39

1. GİRİŞ

Modern moleküler yöntemler kullanılarak canlılar; *Bacteria*, *Archaea* ve *Eucarya* olarak üç domaine ayrılmıştır. Bu ayrım, 16S ve 18S rRNA dizileri başta olmak üzere, hücre duvarı, lipid içerikleri, RNA polimeraz ve protein sentezi gibi özellikleri temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan filogenetik incelemelerde, *Archaea*'ların, *Bacteria*'dan ziyade köken olarak *Eucarya*'ya daha yakın oldukları gözlemlenmiştir (Madigan *et al.* 2000).

Mikroorganizma; mikroskobik canlıların genel adı olup, çoğunlukla tek hücreli olmalarına karşı, çok hücreli olanları da bulunmaktadır. Genel olarak optimum büyüme sıcaklıkları açısından; psikrofil, mezofil ve termofil olmak üzere 3 gruba ayrılırlar (Jakob and Kristjansson 1992). Termofilik organizmalar; yüksek sıcaklıklarda yaşamaya adapte olup, kendi aralarında ılımlı termofiller (45-65°C) ve hipertermofiller (85°C) şeklinde 2 gruba ayrılır (Demirjian *et al.* 2001).

Termofilik basiller; genellikle sıcak su kaynaklarından, solfatarlardan ve jeotermal kaynaklardan, lağım arıtma sistemlerinden, gübreden, nehir ve göllerden, hava kontaminantların dan ve konservelerden izole edilmektedir. Bu ortamlardan saflaştırılan *Bacillus*'lar; endospor oluşturmaları, çubuk şeklinde olmaları ile pek çok öbakter cinsinden ayrılmaktadırlar (Baker *et al.* 2001). Termofillerin hücre membranı, doymuş yağ asitlerinden oluşturmaktadır. Bu özellik hücreye hidrofobik bir ortam sağlamak ve yüksek sıcaklıkta yaşaması için hücreyi sıkı ve sert tutmaktadır (Güven 2011). Termofilik organizmaların membranı ve bileşenleri; yüksek derecede asidik ve alkali şartlara, proteolize, yüksek sıcaklığa dayanıklıdır (65-85°C) (Kristjansson and Asgeirsson 2002). Ayrıca bu organizmaların sıcaklık toleransında, içerdikleri aminoasitlerin pozitif ve negatif yükleri arasındaki bağ sayısı artışı ve proteinlerin sitozolde hidrofobik özelliklerinden dolayı ortaya koydukları çözünmeme direnci önemli rol oynar (Fujiwara 2002; Haki and Rakshit 2003).

Bacillus; Cohn tarafından 1872'de belirlenen bu cins, çok büyük taksonomik değişikliklere uğramıştır. İlk önceleri *Bacillus* cinsinin sınıflandırması, aerobik çoğalma ve endospor oluşturma gibi iki temel özelliğe göre yapılırken, son yıllarda konvansiyonel özelliklerin yanında moleküler yöntemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Fritze 2004). Bu cinse ait bakteriler sporlu, aerop veya fakültatif olup, 0.5-1.2 µm eninde ve 2.5-10 µm boyundadır. Köşeleri birbirine paralel ve düz olan vejetatif formlar içeren bu cinsin üyeleri gram pozitiflerdir. Birkaç türü hariç genellikle patojen olmayan bir ailedir. *Bacillus* cinsinin doğadaki avantajı; antibiyotik üretimleri ve böcekler için toksik etki oluşturmalarıdır. Oluşturdukları bu endosporlar kimyasal ve fiziksel etkilere karşı dayanıklı olup, laboratuvar ortamında bu mikroorganizmaların eldesini kolaylaştırmaktadır (Chao and Hsu 2004). Bu grup içinde alkalofilik, psikrofilik, asidofilik, termofilik ve halofilik organizmalar yer aldığı gibi hetetrofik büyüme için farklı karbon kaynaklarını kullanabilen bakteriler de bulunmaktadır (Nazina *et al.* 2001).

Brevibacillus brevis: *Bacillus brevis* ilk kez 1900 yılında tanımlandı. Daha sonra Goto *et al.* (2004) tarafından *Brevibacillus brevis* olarak yeniden sınıflandırıldı. Bu organizma genellikle toprak, hava, su ve çürüyen maddelerin üzerinde bulunur. Gram-pozitif, sporlu, aerop veya fakültatif anaerob bir basildir. Farklı karbon kaynaklarını kullanabilen psikrofilik, asidofilik, halofilik formları bulunmaktadır. Nadiren enfeksiyon oluşturan suşları bulunmakla birlikte en uygun gelişim sıcaklıkları 35-55°C'dir (Goto *et al.* 2004; Panda *et al.* 2014).

Brevibacillus borstelensis: *Bacillus borstelensis* ilk kez 1995 yılında Shida *et al.* (1995) tarafından tanımlandı ve daha sonra *Brevibacillus borstelensis* olarak yeniden sınıflandırıldı. Bu türün strainleri; katalaz, oksidaz, gram, endospor pozitif, aerobik olup, çubuk şeklinde bir hücre morfolojisine sahip termofillerdir (Panda *et al.* 2014).

Termofilik bakteriler, diğer bakteriyal strainlere göre olumsuz koşullara karşı göstermiş olduğu yüksek direnç ve termal stabiliteden dolayı, bilim insanlarının ilgi odağı haline gelmiş ve bu organizmalar kullanılarak çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Özellikle

bu bakterilerden elde edilen enzimler endüstriyel açıdan oldukça önemli olup, modern moleküler biyolojide ve farklı endüstri kollarında yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Adiguzel 2006; Başbülbul ve Biyik 2010). Ticari olarak kullanılan enzimlerin; %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır olup, biyoteknolojik açıdan önemli olan termostabil enzimler günümüzde, ektermofilik ve hipertermofilik bakterilerden, *archaealar*'dan elde edilmektedir (Çizelge 1.1). Bu enzimler: besin, kimya ve ilaç endüstrisi ile çevre biyoteknolojisinde potansiyel kullanım alanına sahiptir (Eichler 2001).

Çizelge 1.1. Termofilik mikroorganizmalara ait enzimlerin endüstriyel uygulamaları (Demirjian *et al.* 2001).

Mikroorganizma	Enzimler	Uygulama
İlımlı termofiller (45-65°C)	Amilazlar Ksilanaz	Tatlandırıcılar için glukoz, fruktoz hidrolizi ve kağıt beyazlatma
Termofiller (65-85°C)	Beta-galaktozidaz Proteazlar	Süt ve süt ürünlerinde laktoz hidrolizi ve ekmekçilik, deterjan sanayisi
Hipertermofiller (<85°C)	DNA polimerazlar	Genetik mühendisliği

Enzimler: Hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden, katalitik RNA moleküllerinin küçük bir gruba hariç protein yapısına sahip olan moleküllere enzim denir. Enzimlerin protein kısmına “**Apoenzim**” denir. Bazı enzimler, fonksiyonlarını protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bazıları da aktivite gösterebilmek için, protein yapısında olmayan organik bileşiğe veya metal yonuna bazen de her ikisine de ihtiyaç duyarlar. Sonradan eklenen kısma “**kofaktör**” denilir. “**Kofaktör**” bir enzimi aktif hale getiren, enzimin protein olmayan organik bileşenidir. Kofaktör ile beraber halde bulunan Apoenzim-kofaktör bütününe, “**Haloenzim**” denilir. Koenzim veya kofaktörü ile birlikte katalitik olan haloenzimler aktif durumdadır. Koenzimlerin yapısında çoğunlukla vitaminler bulunmaktadır. Enzimler hücre içinde üretildikten sonra görevini bitirmek için hücre dışına salınırlar ve bunlara “**Ekzoenzimler**” ve üretildikleri hücre içinde kalanlara ise, “**Endoenzimler**” adı verilir. Protein yapıları farklı, fakat

katalizledikleri kimyasal reaksiyonu aynı olan enzimlere ise, “**izoenzim**” veya “**izozim**” adı verilmektedir (Maruta *et al.* 2010).

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler, zaman zaman mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktiviteleri, bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre çok daha yüksek olup, daha stabil ve fiyat açısından uygundur. Ayrıca istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi pozitif avantajları da bulunmaktadır (Burg 2003). Biyoteknolojide endüstriyel önemi olan enzimlerin farklı bilim insanları tarafından araştırma konusu olarak seçilmesinin nedenleri ise; ürünlerin kullanım alanlarının farklı, ekonomik değerinin oldukça yüksek olması ve enzim teknolojisinde sağlanan önemli ilerlemelerdir (Gessesse 1998).

Enzimlerin adlandırılması, genel olarak katalize ettikleri reaksiyonun niteliğine göre yapılır. Çoğu zaman enzimin etki ettiği substrata “**az**” eki getirilirken, bazen de substratın sonuna “**litik**” eki getirilmek substratıyla isimlendirilir. Mesela proteinleri parçalayan enzimlere “**proteazlar**” denildiği gibi “**proteolitik enzimler**” de denilir.

Enzimler başlıca altı büyük sınıfa ayrılır. Bunlar kısaca şunlardır:

1. Oksidoredüktazlar: Oksidasyon-redüksiyon yani, yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir.
2. Transferazlar: Fonksiyonel bir grubun, transfer reaksiyonunu katalize eden enzimlerdir.
3. Hidrolazlar: Çeşitli bağların hidrolizini yani, hidrolitik reaksiyonları katalize eden enzimlerdir.
4. Liyazlar: Bu enzimler C-C, C-O ve C-N arasındaki bağları, hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir yolla yıkar veya bu atomlar arasına bir çift bağ ilave ederler.
5. İzomerazlar: Bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değişiklikleri yani, izomerizasyon reaksiyonlarını katalize ederler.

6. Ligazlar: C-O, C-S, C-N ve C-C arasında bir bağ oluşmasını sağlayan enzimlerdir. Bu enzimler genellikle ATP'deki veya diğer trifosfatlardaki pirofosfatı hidrolize ederek, iki molekülün birbirine bağlanmasını katalize ederler (Turgut 2009).

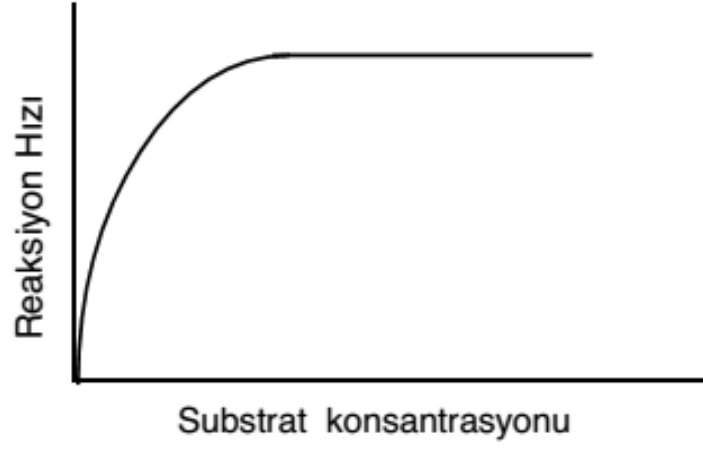
Enzimlerin aktiviteleri birtakım çevresel faktörlerden etkilenirler. Bunlar oldukça önemlidir ve enzim-substrat reaksiyonunu etkilemektedir:

1. Enzim konsantrasyonunun etkisi: Enzimin miktarı çoğaldıkça reaksiyonun hızı da artar ve bu nedenle enzim reaksiyonu hızı konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Şekil 1.1).



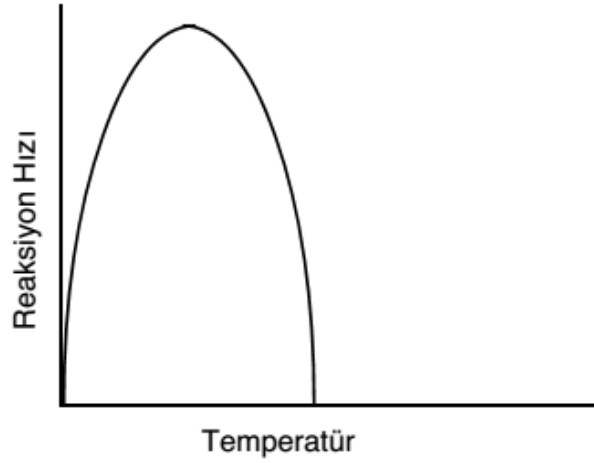
Şekil 1.1. Enzim reaksiyonunun hızı ile enzim konsantrasyonunun bağlantısı (Lehninger 2005).

2. Substrat konsantrasyonunun etkisi: Sabit enzim konsantrasyonunda, enzim reaksiyonunun hızı belirli bir noktaya kadar substrat konsantrasyonu ile artarken, belli bir noktadan sonra substrat konsantrasyonundaki artış reaksiyon hızını değiştirmez (Şekil 1.2).



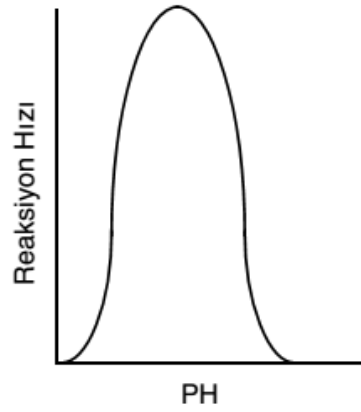
Şekil 1.2. Enzimin reaksiyon hızı ile substrat konsantrasyonunun bağlantısı (Lehninger 2005).

3. Enzimatik aktiviteye sıcaklığın etkisi: Enzim reaksiyonlarının hızı sıcaklıkla artar. Fakat belirli bir sıcaklığın üzerinde (optimum sıcaklık) enzimler denatüre olduklarından etkilerini kaybederler (Şekil 1.3)



Şekil 1.3. Enzimin reaksiyon hızı ile sıcaklık bağlantısı (Lehninger 2005).

4. pH'nın enzim aktivitesindeki rolü: Enzimler genellikle belirli bir pH değerinde en yüksek aktiviteyi gösterirler. Bu pH'ya enzimin optimum pH'sı denir (Şekil 1.4). Her enzimin aktivitesinin optimum olduğu bir pH değerleri bulunmaktadır. Bu değerlerin üstünde ve altında aktivite düşmektedir. Bununla beraber bütün enzimlerin pH aktivite eğrileri değişiklik gösterir.



Şekil 1.4. Enzimin reaksiyon hızı ile pH'ın bağlantısı (Lehninger 2005).

5. Zamanın rolü: Enzim aktivasyonunda reaksiyon süresi ve oluşan ürünlerin de etkisi vardır (Develioğlu ve Taner 1998).

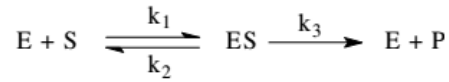
Enzim-substrat kompleksini oluşturan aktif bir bölge bulunmaktadır. Substratın bağlandığı, enzim tarafından değişikliğe uğratıldığı ve başka yeni bir bileşiğe dönüştürüldüğü bu bölgeye aktif merkez adı verilir. Bu merkezde en az bir aminoasit, enzim aktivitesinde özel bir rol oynar.

Enzim faaliyetinin azalmasına yol açan bileşiklere “**Enzim İnhibitörleri**”, bu olaya ise “**Enzim İnhibisyonu**” denir. Enzimler genel olarak 3 şekilde inhibisyona uğrar.

- Yarışmalı inhibisyon
- Yarışmasız inhibisyon
- Yarıyarışmalı inhibisyon

Yarışmalı inhibisyonda: kimyasal olarak enzimin kendi substratına çok benzeyen bir madde, enzimin aktif merkezine bağlanarak, kendi substratının bağlanmasına izin vermez. Yarışmasız inhibisyonda ise madde: aktif bölgeye değil, enzimin üzerine bağlanarak, enzimin substratla reaksiyon hızını azaltır. Eğer bir inhibitör, serbest enzime değil de, enzim substrat kompleksine bağlanarak bir inhibisyona neden oluyorsa, bu tip inhibisyona yarıyarışmalı inhibisyon denir (Özler 2009).

Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce onunla bir “**Enzim-Substrat Kompleksi**” oluşturur, daha sonra bu kompleks, ürün ve enzime dönüşür. Enzim kinetiğinin mekanizması aşağıdaki gibidir:

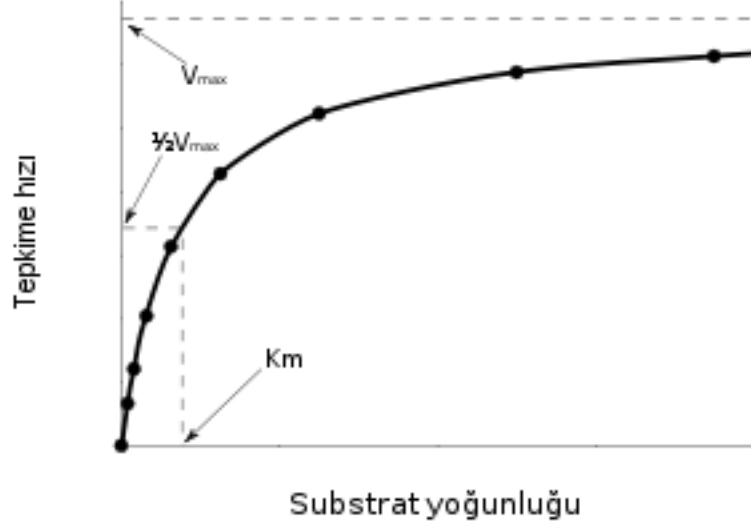


Burada ES kompleksi, E ve S’den k_1 hızı ile oluşur: ES’nin ayrışması ise k_2 hızındaki geri reaksiyonla tekrar substrat oluşumu şeklinde olabilir. Ancak asıl reaksiyon k_3 reaksiyon hızı ile ilerleyen ürün oluşumu reaksiyonudur. Reaksiyon kararlı duruma ulaşıncaya ES’nin oluşması ayrışmasına eşit olur, yani sıcaklık aynı kaldığı sürece derişim değişmez (Özler 2009).

Enzim reaksiyonları üzerinde ilk geniş kinetik çalışmalar 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır (Şekil 1.5). Michaelis-Menten kinetiğine göre başlangıç enzim derişimi sabit alınıp, reaksiyon hızının substrat derişimine bağıllığı incelenir. Enzim (E) ve substratı (S) arasında önce bir veya iki moleküllü reaksiyon gerçekleşir ve bir enzim-substrat reaksiyonu (ES) meydana gelir. Michaelis-Menten bağıntısı şu şekilde tanımlanır;

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Michaelis–Menten denklemleri})$$

Burada V_{max} : katalizin ulaşabileceği en yüksek hız değeridir. Enzim bölgeleri substratla tam doygunluğa geçince V_{max} 'a ulaşır.



Şekil 1.5. Michaelis–Menten grafiği (Schnell 2014).

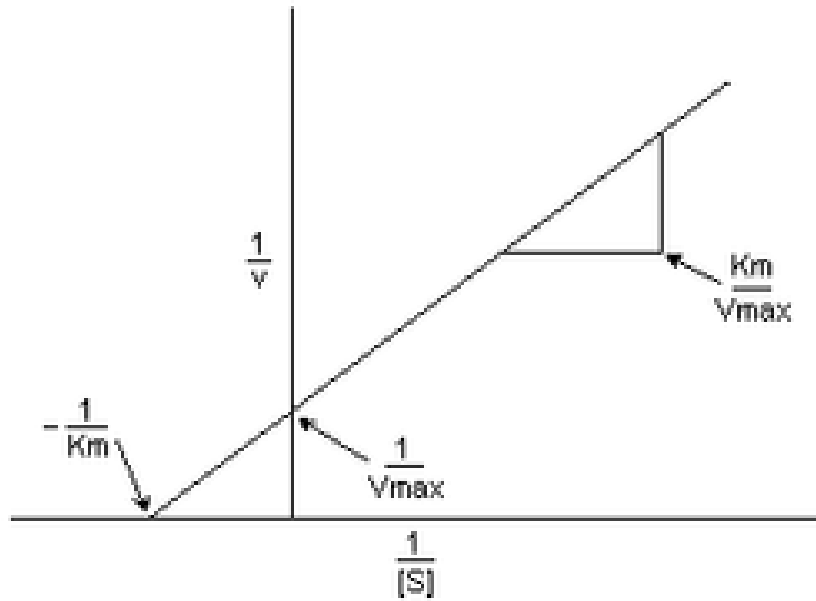
K_m (Michaelis Menten sabiti): En yüksek hız değerinin (V_{max}) yarısına ulaşmak için gerekli olan substrat miktarıdır. Birimi mol/L'dir. K_M bir enzime ve onun substratına özgüdür. K_M enzim substrat ilişkisinde bir ölçüdür. K_M 'si düşük olan bir enzim, substratına yüksek ilgi gösterir. K_M değerinin bilinmesi; enzimlerin saflaştırılması, dokularda enzim aktivitesinin saptanması, ilaç imalatında enzim inhibitörlerinin belirlenmesi açısından önemlidir (Schnell 2014).

Michaelis-Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat derişimi düşüktür ($[S] \ll K_m$) ve substrat derişimi arttıkça hız 1. dereceden enzim kinetiğine göre artmaktadır. İkinci bölgede ise substrat derişimi ve hız arasındaki reaksiyon, karışık derecede yürür. Üçüncü bölgede ise $[S] \gg K_m$ 'dir. Substrat derişimi artsa da, artık hızda bir değişme olmaz ve birinci dereceden bir enzim kinetiği gözlenir ($V=V_{max}$). Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edildiğinden, uygulamalarda kolaylık sağlamak amacı ile bunun bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek, değişik yollardan doğru

denkleminde dönüştürülebilir. Bunlardan en çok kullanılanı Lineweaver-Burk denklemdir;

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

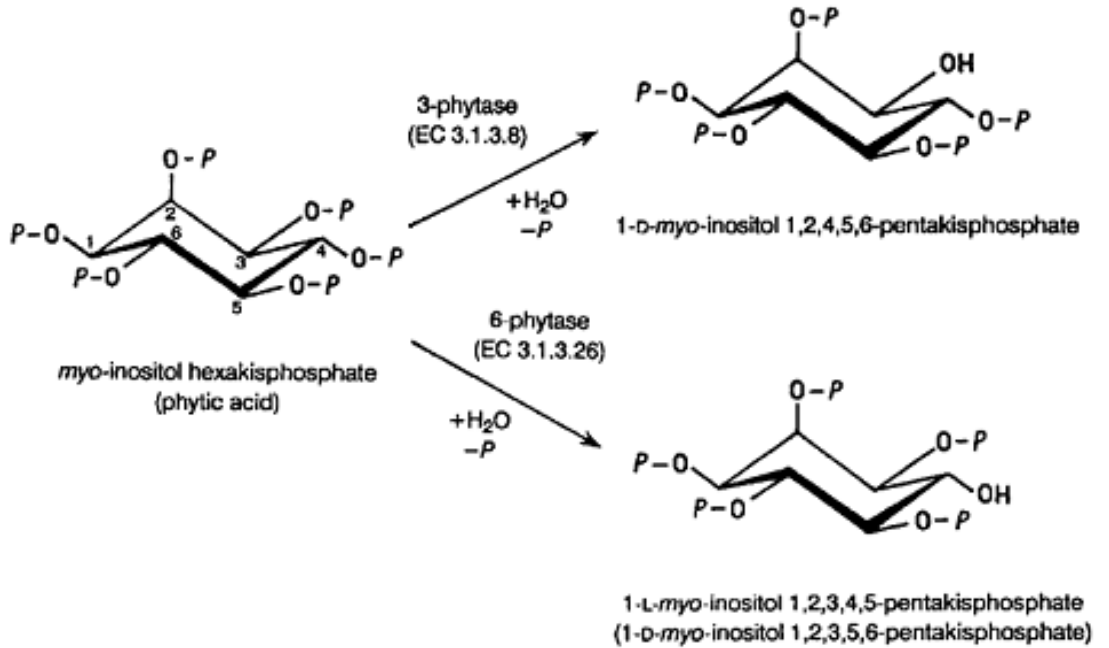
Bu denkleme göre ordinatta $1/V$, absiste $1/[S]$ değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise, K_m/V_{max} 'dır (Şekil 1.6). Düz eğrinin çizilmesi V_{max} ve K_m değerlerinin daha rahat hesaplanmasını sağlar (Menten and Michaelis 1913; Lineweaver and Burk 1934).



Şekil 1.6. Lineweaver-Burk grafiği (Özler 2009).

Bugüne kadar, ekstremofil ve hipertermofil mikroorganizmalardan polisakkarit parçalayan bir çok enzim (selülaz, amilaz, lipaz, esteraz, fitaz vd) karakterize edilmiş ve endüstriyel prosesler için yeni olanaklar sağlanmıştır (Bhat 2000).

Fitaz enzimi: Genelde histidin asit fosfataz ailesine ait olup, fosforil transfer reaksiyonunda, fosfohistidin ara ürünlerini kullanan fosfotazların alt sınıfıdır (Lei *et al.* 2007). IUPAC-IUB (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği ve Uluslararası Biyokimya Birliği) fitazın, fitat molekülünün hidrolizini başlatan bölgeye bağlı olarak iki sınıfa ayrılırlar. 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 1.7) (Selle and Ravindran 2007). Mikrobiyal fitazlar; çoğunlukla 3-fitaz sınıfında yer alırken, bitkisel kökenli fitazlar 6-fitaz sınıfında yer almaktadır. Bu duruma istisna olarak *Aspergillus niger*'den izole edilen fitaz, 3-fitaz aktivitesi gösterirken, *Peniophoralycii* ve *Escherichia coli* ise, 6-fitaz aktivitesi gösterir (Kumar *et al.* 2010).



Şekil 1.7. Fitik asidin 3-fitaz ve 6-fitaz ile hidrolizi (Dvorakova 1998).

Domuz, kümes hayvanları, kuş ve balık gibi monogastrik hayvanlar sindirim sistemlerindeki düşük fitaz seviyesinden dolayı, fitik asidi metabolize edemezler ve bu fitatları, dışkı ile birlikte çevreye atarlar (Han *et al.* 1997). Fakat fosfor hayvanların büyüme, üreme ve kemiklerinin kalsifikasyonu için gerekli minerallerden biridir. Toprakta ya da suda fitaz aktivitesine sahip mikroorganizmalar tarafından fitat,

enzimatik olarak hidrolizlenir. Serbest kalan fosfor, nehir ve göllere taşınarak suda çözünür ve oksijen eksikliğine neden olur. Sonuç olarak, hidrolizlenmeden gübre yoluyla atılan fitat ile yemlere ilave edilip absorbe edilmeyen inorganik fosforun toprağa karışması, sadece fosfor kirliliğine değil, aynı zamanda toprak veya sulak alanlarda ekolojik çevrenin bozulmasına yol açar. Bu nedenle, monogastrik hayvanların bağırsaklarında fitik asidin fosforlu myo-inositol türevlerine enzimatik hidrolizi gereklidir (Kumar *et al.* 2010).

Böylece doğada var olan fosfor kaynağının tekrar doğaya kontrollü bir şekilde kazandırılmasıyla fosforun kullanılabilir formlarının ilavesinin getirdiği ekonomik maliyet ortadan kaldırılmış olur. Özellikle canlı hayvanlar tarafından üretilen fosfor miktarı çevre için ciddi bir potansiyel tehlikedir. Bu olayı çözmek için, fitik asidin enzimatik yolla hidrolizine yönelik yapılan çalışmalar büyük önem taşımaktadır (Kerovuo 2000).

Fitazların optimum pH'ya göre sınıflandırılması: Fitazlar, optimum pH'ları esas alınarak histidin asit fosfataz (pH 5.0 civarı) ve alkali fitaz (pH 8.0 civarı) olmak üzere, iki sınıfa ayrılır (Baruah *et al.* 2007). *Bacillus* dışında bir çok bakteri, fungus ve bitki fitazları, geniş substrat özgüllüğü olan histidin asit fosfataz sınıfına dahil olması nedeniyle, gıda endüstrisinde alkali fitazdan daha çok araştırılmıştır. Alkali fitazlar, asidik fitazdan farklı olarak, fitata oldukça spesifiktir ve üç ya da daha az ester grupları içeren myo-inositol fosfatları katalizleyemezler (Kumar *et al.* 2010).

Fitazların katalitik merkeze göre sınıflandırılması: Enzimin katalitik etkisi ve özgüllüğü ile, moleküler yapısal bileşenleri arasında doğrudan bir bağlantı olduğu bilinmektedir. Bu yüzden, evrimsel süreçte fitazın temel spesifik yapısal bileşenleri ile diğer kısımları, çeşitli substratları katalizlemek için yapısal olarak değişmiştir. Bugün için fitik asidi hidrolizleyebilen dört fosfataz enzimi bilinmektedir: (1) Histidin Asit Fosfataz (HAP), (2) β -Propellar Fitaz (BPPHy), (3) Sistidin Fosfataz (CP) ve (4) Purple Asit Fosfataz (PAP). Bunların her birinin çeşitli ortamlarda fitik asidi substrat olarak

kullanan farklı katalitik mekanizmalar ve kendine özgü yapısal özellikleri vardır (Lei *et al.* 2007).

Fitaz enziminin kaynakları

Bitkisel fitazlar: Fitaz aktivitesi; hububatta, bakliyatta, yağlı tohumlarda, ayrıca avokado ve taze soğan yaprakları gibi sıklıkla tüketilen meyve ve sebzelerde tespit edildi. Bazı çalışmalarda; 5.000 unit/kg'dan daha fazla aktiviteye ulaşabilen yüksek seviyede fitaz aktivitesi gözlemlendi ve bitkisel fitaz kaynakları hayvan beslemesinde kullanıldı. Bitkilerden elde edilen fitazların optimum pH'sı genellikle 4.5-6.0 iken, sıcaklıkları ise 38-55°C'dır (Viveros *et al.* 2000).

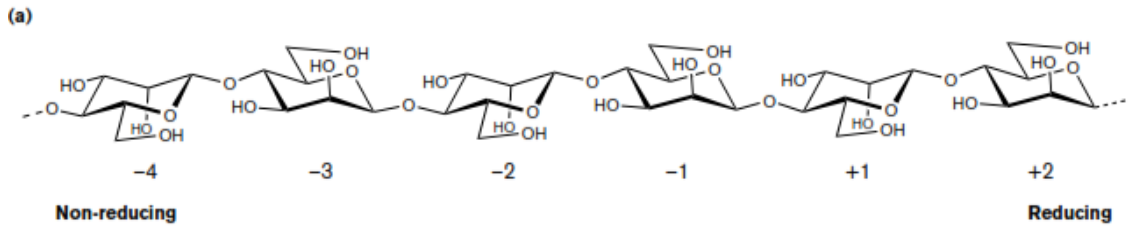
Hayvansal fitazlar: Fitaz aktivitesi; çeşitli hayvan türlerinin dokularında tespit edilmesine rağmen, hayvansal kaynaklı fitazların hiçbirinin moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmedi. Hayvansal fitazlar nötral ve alkali aralıklarda optimum pH göstermesine rağmen, kümes hayvanlarının bağırsak epitel hücrelerinde optimum pH 5.5-6.0'dır (Ellestad *et al.* 2002).

Mikrobiyal fitazlar: Fitazlar; bugüne kadar fungus, maya, bakteri ve protozoalardan saflaştırılmıştır. Bu enzimlerin çoğu, histidin asit fosfotaz ya da alkali fitazın alt familyasına aittir. Kinetikleri, stereospesifiklikleri ve biyokimyasal özelliklerinde önemli farklılıklar görülmektedir. Çeşitli mikrobiyal fitazlar, hayvan yemi ilavesi olarak ticarileştirilmiştir. Mikrobiyal fitazların optimum pH'sının düşük olması nedeniyle, fitatın en çok çözünür olduğu mide koşullarına uyumlu olmasından dolayı, yem uygulamalarına oldukça uygundur (Lei *et al.* 2007).

Bakteri fitazları (PhyC): Bakterilerden izole edilen fitazlar, glikolizasyona uğramayan histidin asit fosfataz yada β -propeller yapılı alkali fitazlardır. Bazı bakteriyal fitazların, özellikle de *Bacillus* cinsi içinde yer alan mikroorganizmalardan elde edilenlerin çoğunun optimum pH'larının 7.0-7.5 ve sıcaklıkları ise 50°C olduğu gözlemlendi (Lei *et al.* 2007).

Fitaz enziminin endüstride kullanım alanları: Son yıllarda, hayvan yemlerine ekzojen enzimlerin ilavesi, yemlerin besleyici değerini arttırdığı için uygulamada oldukça önem kazanmıştır. Domuz ve kümes hayvan atıklarında büyük miktarlarda fosfor içeriğinin bulunması, bitkisel kaynaklı yem maddelerinde fitata bağlı fosforun kullanılabilirliğinin zayıf olduğunu göstermektedir (Selle and Ravindran 2007).

Mannanaz; bakteri, bitki, mantar ve hayvanlardan saflaştırılmıştır. Esas olarak mikrobiyal mannanaz, hücre dışı bir enzim olup, geniş pH ve sıcaklıklarda çalışabilir. Bu nedenden dolayı enzim; kağıt hamuru, gıda, beslenme, petrol ve tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır. Mannanaz; hemiselülozun ana bileşenlerinden olup, **β -mannanaz**, **β -mannosidaz** ve **β -glukosidaz** olmak üzere 3 gruba ayrılır. Mannanaz, bir araya bağlanmış, manon moleküllerden oluşur (Schroder *et al.* 2009).



Şekil 1.8. β -mannanaz yapısı (Van Zyl *et al.* 2010).

Mannanın hidroliz mekanizması: Mannan degrade eden enzimler; β -mannanaz (1,4- β -D-mannan mannohidrolaz, E.C. 3.2.178), β -mannosidaz (1,4- β -D-mannopiranosid hidrolaz, E.C. 3.2.1.25) ve β -glukosidazdır (1,4- β -D-glukosid glikohidrolaz, E.C. 3.2.1.21). Mannan degradasyonuna yardımcı enzimler ise asetil mannan esteraz (E.C. 3.1.1.6) ve α -glukosidaz (1,6- α -D-galaktosid galaktohidrolaz, E.C. 3.2.1.22) dır (Dhawan and Kaur 2007; Moreira and Filho 2008).

β -mannanaz endoenzimdir ve mannan omurgasındaki β -1,4 bağlarını hidroliz eder (Shallom and Shoham 2003). Doğada endo-1,4- β -mannanaz, galaktomannan ana zincirini parçalayarak oligosakkaritleri ve mannoziyoza meydana getirir. Daha sonra ise 1,4- β -mannosidaz (E.C. 3.2.1.25) aktivitesi ile mannoz serbest kalır. β -mannosidaz ise

ekzo tip enzim olup, mannosidler arasındaki β -1,4 bağlarını parçalayarak mannan ya da mannooligosakkaritlerin indirgenmemiş uçlarından mannozun serbest kalmasını katalizler. β -glukosidaz ise, ekso tip enzim olup glukomannan ve galaktoglukomannandan, β -mannanaz aktivitesi sonucu salınan oligosakkaritlerin indirgenmemiş uçlarında 1,4- β -D-glukopiranoz hidrolizini yapar. α -galaktosidaz, galaktomannan ve galaktoglukomannanların α -1,6 bağlı D-galaktopiranosil yan zincirlerinin hidrolizini katalizler. Asetil mannan esterazlar, galaktoglukomannanlardan asetil gruplarının serbest kalmasını sağlar (Howard *et al.* 2003).

Mannanazın üretim koşulları ve özellikleri: Mikrobiyal mannanaz genellikle ekstrasellüler ve reaksiyonu yükselten bir enzimdir. Mannanazın üretimi en çok ortamın beslenme koşullarına ve aynı zamanda fiziksel koşullara, zaman, sıcaklık, pH, nitrojen, karbon kaynakları, mineral tuzlar ve oksijen oranına bağlıdır. Mikrobiyal mannanaz farklı sıcaklıklarda aktivite gösterebiliyor ve bu sıcaklık aralığı 37°C-70°C olarak belirlenmiştir. Genel olarak bakteriyel mannanaz, mantar mannanazı ile karşılaştırıldığında, bakteriyel mannanazlar sıcaklığa daha dayanıklıdır (Aziz vd 2008; Chauhan *et al.* 2012).

Mannanazlar, genellikle mikrobiyal kaynaklarda yaygındır. Mikrobiyal mannanazlar, çoğunlukla ekstraselüler olarak yüksek seviyedeki pH ve sıcaklığa dirençlidirler. Bu nedenle petrol, eczacılık, kağıt hamuru, tekstil ve gıda mühendisliği gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Mannanaz, mikrobiyal kaynaklarından genellikle Gr (+) olan ve çoğunlukla da *Bacillus* cinsine ait olan bakterilerden elde edilmiştir. Bazı Gr (-) bakterilerden (*Klebsilla oxytoca*) de elde edildiği bilinmektedir. Mantarlarda ise genellikle *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Trichoderma* cinslerinde mannanaz enziminin varlığı görülmüştür (Chauhan *et al.* 2012).

pH: Mannanaz üretimi bakteriler de bazik pH'larda olurken, funguslarda bu işlem asidik ortamlarda olur. Örneğin *Bacillus* cinslerinde enzim üretimi pH 9.5'de gerçekleşmektedir (Chauhan *et al.* 2012).

Mannanazın bazı kullanım alanları: Mannanaz yüksek sıcaklık ve pH'da aktivite göstermesinden dolayı, özellikle kağıt sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır (Pan *et al.* 2011). Yine son zamanlarda; mannanazdan deterjan, saç jelleri, şampuanlar ve diş macunları sağlık ve güzellik bakım ürünleri, kontakt lens temizleyicileri ve sert yüzey temizleme sektörlerinde faydalanılmaktadır (Bettioli *et al.* 2000). β -Mannan bir polisakkarit olarak; soya unu (SM), guar unu (GM), hindistan cevizi gibi malzemeler ve susam gibi yemeklerde bulunabilir. Tüm bu yemekler bazı ortak özelliklere sahiptir. (Örneğin: yüksek lif içeriği, düşük lezzet ve çeşitli temel aminoasit eksikleri gibi). Bağırsaklarda sınırlı olarak β -mannanaz eklenmesi hayvan diyetlerine çeşitli şekillerde yardımcı olur. Geniş bir pH aralığında aktif olan mannanaz, proteazlara (pepsin ve Tripsin) dayanıklı olduğundan yemelerde kullanımı oldukça faydalı olmaktadır (Meng *et al.* 2008; Yang *et al.* 2009).

Mannozun kullanımı farmasötik uygulamalarda ve tıp alanında her geçen gün artmaktadır. Özellikle şekillendirme ve hızlı çözünme özelliği sağladığından, ilaç tabletlerinin yapımında kullanılmaktadır. Yine idrar yolu enfeksiyonu için bir çare olarak da mannoz önerilmektedir. Bu nedenlerden dolayı mannanaz enzimi çok kullanılmaktadır (Van Zyl *et al.* 2010).

Enzim immobilizasyonu: Immobilize hücrelerin serbest haldeki hücrelere göre üründen kolayca ayrılabilmesi, tekrar tekrar kullanılabilmesi, yüksek hacimsel verimlilik değerleri elde edilebilmesi, proses kontrolün daha kolay olması ve kontaminasyona daha az duyarlı olmaları gibi bazı üstünlükleri vardır. Immobilize enzim; serbest enzime göre, daha yüksek aktiviteye sahip ve çevresel koşullara karşı daha dayanıklı olmasından dolayı son zamanlarda kullanımı sıklıkla tercih edilmektedir. Yüksek fiyata sahip olan enzimlerin değişik yöntemlerle immobilize edilmeleri ve defalarca kullanımı üzerine çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Göksungur ve Güven 2002).

Tutuklama yönteminde, enzim molekülü belirli bir mekanda durmaya zorlanmaktadır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matris içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde,

mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özelliği, enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. Tutuklama yöntemi; polimer matrikste tutuklama, mikrokapsülleme, lipozom tekniği olmak üzere üçe ayrılır (Yener 2007).

İmmobilize edilen enzimlerden beklenen; yüksek kararlılık, tekrar kullanılabilirlik, sürekli üretime olanak vermesi, reaksiyon kontrolüne olanak vermesi, yüksek saflık, yüksek ürün yüzdesi, ekonomik olması gibi özelliklerdir (Yener 2007). Enzim immobilizasyon yöntemleri fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki grupta toplanır. Kimyasal yöntemle immobilizasyon sağlam kovalent bağları içerirken, fiziksel immobilizasyonda daha zayıf bağlarla tutunma söz konusudur. Kimyasal yöntemle immobilizasyonda ilk adım; yüzeyin silanlama, fonksiyonel gruplarla kaplama, esnek fonksiyonel grupların ilavesi ile modifiye edilmesi yada aktif hale getirilmesidir. Ardından enzim yüzeye tutturulur. Bu işlemlerin yanısıra enzim yüzeye bir çapraz bağlayıcı ajan yardımı ile de immobilizes edilebilir. Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek malzemesinin yüzey özelliklerinin (hidrofilik, hidrofobik karakteri) yanısıra, gözeneklilik, gözenek boyutu gibi yığın özellikleri de, immobilize edilen enzim miktarını ve enzimin aktivitesini belirleyen faktörlerdir. Fiziksel immobilizasyonda enzim polimer matriksinin içine hapsedilebileceği gibi, enzim çözeltisi substrat ve reaksiyon ürünlerine karşı geçirgenliği olan bir membran içinde de tutuklanabilir (Altınkaya vd 2008).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yüksek sıcaklık değerlerinde yaşamın keşfiyle birlikte bu ortamlarda yaşayan mikrobiyal biotanın tespitine yönelik çalışmalar ciddi bir ivme kazanmıştır. Özellikle Yellow Stone Ulusal Parkından izole edilen *Thermus aquaticus*'dan Taq DNA polimerazın saflaştırılması ve karakterizasyonu moleküler biyoloji ve biyoteknolojik çalışmaların önünü önemli ölçüde açmıştır (Adıgüzel 2006). Nazina vd (2001) tarafından yapılan bir çalışmada; 7 filogenetik grup, *Bacillus* cinsinden ayrı olarak tekrar sınıflandırılmıştır (*Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Virgibacillus*, *Salibacillus* ve *Gracilibacillus*). Tespit edilen termofilik türler 16S rRNA'dan yola çıkılarak gruplandırılmış, *Bacillus* cinsi genetik olarak 1. ve 5. gruplara dahil edilmiştir. *Brevibacillus brevis* ve *Brevibacillus borstelensis* 1900'lü yıllarda keşfedilmiş ve son yıllarda genomik düzeyde çalışmalar bu bakteriler üzerinde yoğunlaşmıştır (Shida *et al.* 1996; Panda *et al.* 2014). Fitaz ve mannanaz enzimlerinin bakterilerde varlığına dair çok sayıda çalışma bulunmakta olup, bakteriyel kaynaklı bu enzimler, endüstriyel alanda geniş bir kullanım potansiyeline sahiptir (Horikoshi 1999). Demirjian vd (2001) tarafından yapılan bir çalışmada ise ekstremofil mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin, ekstrem koşullara daha dayanıklı oldukları belirlenmiştir. Bu nedenle son 20 yılda ekstremofil ve ekstreozimlere olan ilgi artmış ve enzimler, endüstriyel biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Yapılan çalışmalarda; *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Klebsiella* sp., *Bacillus subtilis* N-77, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. ASR1, *Klebsiella aerogenes*, *Obesumbacterium proteus*, *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp. DS11 ve *Bifidobacterium* genusunun bir çok türlerinde fitaz aktivitesi tespit edilmiştir (Kim *et al.* 1999; Zinin *et al.* 2004).

Fitik asitin kimyasal yapısı hakkındaki ilk çalışmalar 1855 yılında başlamıştır. Fitik asitin tanımlanması, 1856 yılında Hartig adlı araştırmacının çeşitli bitkisel tohumlardan,

bitkinin büyümesinde depo işlevi gördüğü düşünülen küçük vezikülleri izole etmesi ile gerçekleşmiştir. Araştırmacı bu veziküllerin nişasta içermediğini, ancak tohumun gelişmesinde önemli rolü olduğunu bildirmiştir. 1872 yılında Pfeffer, fitatı ilk kez bitki tohumlarından izole etmiş ve kalsiyum, magnezyum ve fosfor içeren ancak azot içermeyen organik bir kompleks olduğunu belirtmiştir.

Protein-fitat komplekslerinin varlığı ilk olarak, pamuk tohumunun ekstraktlarında saptanmıştır. Rojas and Scott (1969); bu komplekslerin kümes hayvanlarının beslenmesinde olumsuz etkilerinin olduğunu ileri sürmüştür. Anderson (1985) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise fitatın pH değerine bağlı olarak proteinler ile iki farklı kompleks oluşturduğu kabul edilmiştir. Asidik pH değerlerinde ikili protein-fitat kompleksleri ve nötrale yakın pH değerlerinde katyonik köprü vasıtasıyla üçlü protein-mineral-fitat kompleksleri oluşturur. Teorik olarak, fitatın hidrolizi ile açığa çıkan fitata bağlı protein ve fosfor hayvanlar tarafından kullanılabilir (Ekren 2013).

İlk olarak fitaz aktivitesinin buğday kepeğinde ve buzağuların kanında bulunduğu bildirilmiştir (Suzuki *et al.* 1907; Mccollum and Hart 1908). Daha sonra bitki, maya, bakteri ve funguslarda da fitazvarlığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada bu enzimin, insan ve hayvanların ince bağırsak mukozasında ve kalın barsaklarda bulunan mikroflora tarafından endojen olarak üretildiği tespit edilmiştir. Fitazlar bağırsak epitel hücre membranından izole edilmiş olsa da, tek mideli hayvanlarda besinsel fitat fosforunun kullanılabilirliğini arttırmak için düşük maliyetli ekzojen fitazın ilave edilmesi hayvansal fitazın araştırılmasını gölgede bırakmıştır. Kalın bağırsak veya rumende bulunan fitaz aktivitesi esasen mikrobiyal kökenlidir (Yanke *et al.* 1999; Ellestad *et al.* 2002).

Fitaz (myo-inositol hexakisfosfat fosfohidrolaz) myo-inositol hexakisfosfat'ın (fitik asit), inorganik mono fosfata ve düşük myo-inositol fosfatlara ve bazı durumlarda ise serbest myo-inositol'e hidrolizini katalizler. Başlıca iki tip fitaz bilinmektedir; 3-fitaz (E. C. 3. 1. 3. 8) ve 6-fitaz (E. C. 3. 1. 3.26). Bu sınıflandırma, enzim tarafından tutulan

ilk fosfat grubuna göre yapılmıştır. 3-fitaz mikroorganizmalar için ve 6-fitaz ise bitkiler için tipiktir (Powar and Jagannathan 1982).

Greiner *et al.* (1997), *Klebsiella terrigena*'dan sitoplazmik fitazı izole etmişler ve bu enzimin yaklaşık olarak 40 kDa moleküler ağırlığına sahip, monomerik bir protein olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin özellikle fitat için spesifik olduğunu, pH 5'de 55°C'de maksimum aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

O'Neill *et al.* (2000) çalışmalarında, farelerin besinlerine fitik asit ekleyerek, ince bağırsaklarındaki fitaz üretim aktivitesini incelemişlerdir. İnce bağırsakta üç ayrı segmenti (duodenum, jejunum ve ileum) ele almışlardır. Fitik asit ve buğday unu verilen farelerde kontrol grubuna göre daha fazla fitat hidrolize edildiği ve Ca absorpsiyonunun da daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

Casey and Walsh (2004) çalışmalarında, *Aspergillus niger* ATTC 9142 fitazını ultrafiltrasyon, iyon değiştirme kromatografisi, jel filtrasyonu gibi yöntemlerle saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış enzimin optimum pH değerinin 5 ve optimum sıcaklığının 65°C olduğunu tespit etmişlerdir. Substrat spesifite çalışmalarında enzimin fitatı tercih ettiğini ancak fitat içermeyen fosforillenmiş substratları da kullandığını göstermişlerdir. Enzimin 80°C'de diğer bazı ticari fitazlara göre daha yüksek termostabilite gösterdiğini ve dolayısıyla enzimin hayvan yeminde kullanılmasının uygun olacağını düşünmüşlerdir.

Casey and Walsh (2004) , *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959'dan izole ettikleri fitaz enziminin fizikokimyasal karakteristiklerine bakarak, enzimin endüstriyel açıdan kullanılabilme potansiyeli olduğunu görmüşlerdir. HPLC analizi ile enzimin, fitatın neredeyse tamamını parçaladığını tespit etmişlerdir. Düşük pH'da aktivitesini oldukça fazla oranda koruduğunu görmüşlerdir.

Mitchell and Edwards (1996), fitaz enzimi tarafından fitatın hidrolizi sonucu açığa çıkan serbest inorganik fosfatın, bitki orjinli hayvan yemlerinin değerini arttırmak amacıyla, hayvan yemi katkı maddesi olarak kullanabileceğini önermişlerdir.

Shin *et al.* (2001) tarafından yapılan bir çalışmada, ilk olarak fitaz enziminin varlığı *Bacillus* ve ilgili türlerde gösterilmiştir. Yapılan bütün çalışmalarda, bu enzimin hem katalitik faaliyetleri, hemde termostabilitesi için Ca^{2+} iyonuna ihtiyaç duyduğu ortaya konulmuştur. Bu gereksinimin ise Ca^{2+} iyonunun fitata bağlanarak elektrostatik etki oluşturmasına bağlamışlardır (Yanke *et al.* 1999).

İlk ticari fitaz enzimi olan *Natuphos*, ilk olarak *Aspergillus niger*'den izole edilmiştir. *Escherichia coli*, *Klebsiella terrigena*, *Bacillus subtilis* bakterilerinden ve funguslardan elde edilen fitazlar, genellikle monomerik enzimlerdir. Bakteri ve funguslardan elde edilen fitazların, (K_m), optimum pH 7 ve ısı stabilitesi gibi fizikokimyasal özelliklerinde farklılık gözlenmektedir (Shimizu 1992; Tambe *et al.* 1994; Han *et al.* 1997; Dvorakova 1998, Greiner 1998).

Yanke *et al.* (1999) tarafından yapılan çalışmada, sığır rumeninde fitaz üreten birçok anaerobik bakteri tanımlanmış ve *Mitsuokella multiacidus* ve *Selenomonas ruminantium* strainlerinin yüksek enzim aktivitesi gösterdiklerini belirlemişlerdir. Haki *et al.* (2003), *Pseudomonas syringae*'den izole ettikleri fitaz enziminin, spesifik aktivitesinin 649 U/mg protein, optimum pH'sının 5.5 ve optimum sıcaklığının ise 40°C olduğunu tespit etmişlerdir. Howard *et al.* (2003) tarafından yapılan başka bir çalışmanın sonucunda ise, *Citrobacter braaki* fitazının; optimum pH ve sıcaklığının sırasıyla 4.0 ve 50°C olduğunu ve fitik asite karşı diğer fosforlanmış substratlara göre daha yüksek bir spesifite sergilediğini belirlenmiştir.

Dhawan and Kaur (2007) ile Moreira and Filho (2008) tarafından yapılan çalışmalarda mikrobiyal mannanazın yapısı incelenmiştir. Bu enzimin yaygın olarak gram pozitif bakteriler tarafından üretildiği, gram negatif bakterilerden de *Klebsiella oxytoca*'da bulunduğu gösterilmiştir (Ma *et al.* 2004; Singh *et al.* 2010; Pan *et al.* 2011). *Bacillus*

cinsine ait organizmalarda, Van Zyl *et al.* (2010) ise gram negatif bir organizma olan *E. coli*'de β -mannanaz enziminin yüksek oranda bulunduğunu ifade etmişlerdir.

Mannanaz enziminin varlığı bakterilerin yanısıra bazı mantar türlerinde de belirlenmiştir (Cai *et al.* 2005; Meng *et al.* 2008). Kemme *et al.* (1999) tarafından yapılan bir çalışmada; *Aspergillus niger* fitazının domuzlardaki besin parçalama performansı, idrar kompozisyonu üzerine olan etkisi incelenmiştir. Mikrobiyal fitazın, hayvan performansını oldukça iyi bir şekilde etkilediğini gözlemlemişlerdir. Formik asit ve fitazın yemdeki fosfatın parçalanmasını 0,20 g/kg oranında arttırdığını belirlemişlerdir. Mikrobiyal fitazın, idrardaki Ca ve P içeriğini etkilediğini ancak pH, osmolarite ve Mg üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını görmüşlerdir.

Duruksu *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışmada; ilaç, kimya, tekstil ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaya başlayan ve ilerleyen yıllarda daha değerli bir duruma gelecek olan mannanaz enziminin, saf kimyasallar ve doğal kaynaklar kullanılarak üretimi ve yeni teknolojiler kullanılarak saflaştırılması, patent altına alınmasına yönelik araştırmacıların ciddi girişimleri bulunduğu ifade edilmiş. Bu amaçla mannanaz enzimini doğal olarak üreten bir patojen olan ve ürettiği enzimin toksik etkisinden dolayı gıda endüstrisinde kullanılmayan *Aspergillus fumigatus* (IMI 385708)'dan, mannanaz geninin proteinini kodlayan bölge izole edilmiş. İzole edilen gen, toksin üretmediği için GRAS (*Generally Recognized As Safe*) listesinde yer alan *Aspergillus sojae*'ye transfer edilerek yüksek seviyede mannanaz üreten rekombinant *Aspergillus sojae* (ATCC 11906) elde edilmiş ve enzim üretim şartlarının optimize edilmesi için, küçük ölçekli flask denemeleri gerçekleştirilmiştir.

Norita *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada, en yaygın mannanaz grubunun *A. penicillium*'da, Chauhan *et al.* (2012) ise *Trichoderma reesei*'de bulunduğunu belirtilmiştir. İlk olarak enzim immobilizasyonu, 19. yüzyılın başlarında damlatmalı filtre yöntemiyle, odun yongası üzerine adsorbe edilen asetik asit bakterileri kullanılarak sirke üretmek amacıyla gerçekleştirilmiştir (Göksungur ve Güven 2002). Ahmed (2008) yaptığı bir çalışmada, ucuz ve toksik olmayan sodyum alginat üzerine *Bacillus*

macerans hücrelerini immobilize etmiş ve bu hücreleri çevre koşullarına karşı dayanıklı hale getirmiştir.

Fitaz enziminin immobilizasyonu ile ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (Liu *et al.* 1999). İlk olarak bu enzim *A.niger*'den elde edilmiş ve immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir (Ulah 1988). Ayrıca immobilize *E.coli* olarak fitazın da yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Immobilize fitaz enzimi üzerine pH'nın etkisine karşı önemli derecede dirençli olduğu belirlenmiştir (Ekren 2013).

Liu *et al.* (1999) yaptıkları bir çalışmada, immobilize edilmiş *A.niger* fitazının optimum pH ve sıcaklık değerlerini incelemiştir. Optimum pH'nın 5, sıcaklığın ise 50°C, pH'nın optimum değerinin serbest ve immobilize edilmiş enzimlerde hemen hemen aynı olduğunu, sıcaklığın ise serbest ve immobilize edilmiş enzim için farklılık gösterdiğini bulmuşlardır.

Konietzny and Greiner (1996) yaptıkları çalışmada, aynı substrat kullanılarak immobilize ve serbest fitaz enzimi için K_m değerlerini saptamışlar. Sonuçta immobilize edilmiş fitaz enziminde, K_M değerinin diğerine göre daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Mckelvie *et al.* (1995) yaptıkları bir çalışmada ise doğal suların bünyesindeki fitatın giderilmesi yönünde kendi geliştirdikleri enjeksiyon sisteminde, immobilize enzimler kullanmışlar, sonuçta immobilize fitazın en yüksek etkinlik ve dayanıklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Materyal, Cihaz ve Kimyasal Maddeler

3.1.1. Materyal

Çalışmada mannanaz aktivitesini ölçmek için sodyum sitrat, locust beangum, dinitrosalisilik asit, fitaz aktivitesini belirlemek için ise sodyum asetat, sodyum fitat, trikloroasetik asit ve renklendirme çözeltisi kullanıldı. Ayrıca çalışma materyali olarak; Amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), magnezyum sülfat (MgSO_4), kalsiyum klorür (CaCl_2), Demirsülfat (FeSO_4), Sodyum klorür (NaCl), Keçiboynuzu, mısır, *Brevibacillus brevis* (P14) ve *Brevibacillus borstelensis* (P35)'den faydalanıldı.

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Araştırma esnasında kullanılan çözeltiler, hazırlanma prosedürleri ve kullanıldıkları yerler aşağıda belirtilmiştir:

Tripticase Soy Agar (TSA): 40 g tripticase soy agar karışımı (Oxoid), 1 L saf su içerisinde çözüldükten sonra, 121°C 15 dakika süreyle otoklavlandı. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra, steril petrilere döküldü.

Tripticase Soy Broth (TSB): 30 g tripticase soy agar alınıp (Oxoid), 1 L saf su içerisinde çözüldükten sonra, 121°C 15 dakika süreyle otoklavlandı.

Plate Count Agar (PCA): 17,5 g PCA besiyeri alınıp (Oxoid), 1 L destile su içerisinde çözüldükten sonra, 121°C, 15 dakika süreyle otoklavlanarak kullanıldı.

10 mM sitrat Tamponu; 0,588 g Sodyum Sitrat tartılıp, 80 mL saf suda çözüldü, pH'sı 6,0'ya 0.1 M HCl ile ayarlandı ve son hacim distile su 100 mL'ye tamamlandı.

Mannanaz aktivite tayini için gerekli olan substratın hazırlanması amacıyla; 0,05 g locust bean gum tartıldı ve son hacmi 100 mL olacak şekilde sodyum sitrat tamponu içerisinde çözüldü.

DNSA çözeltisi; 500 mL saf su içerisinde 10 g DNSA ve 4 g NaOH, çözüldükten sonra son hacim 1L'ye tamamlandı.

10 mM Sodyum Asetat Tamponu; 0,823 g sodyum Asetat alınıp, 80 mL saf suda çözüldü, pH sı 0,1 M HCl ile 5,5'e ayarlandıktan sonra, son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Fitaz aktivite tayini için gerekli olan substratın hazırlanması amacıyla; 0,05 g sodyum fitat tartıldı, 80 mL sodyum asetat tamponu içerisinde çözüldükten sonra, son hacmi 100 mL tamamlandı.

%10 luk TCA: 10 g TCA alınıp, saf suda çözüldükten sonra son hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Fitaz ve mannanaz enzimlerinin besiyerilerinin hazırlanması: 10 g keçiyoynuzu bulunan 3 farklı reaksiyon ortamlarına sırasıyla 10, 15 ve 20 g mısır ilave edildi. Ayrıca her reaksiyon kabına 2 g ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 1,5 g (KH_2PO_4), 1 g (Mg SO_4), 0,3 g (CaCl_2), 0,03 g (FeSO_4) eklenip, 800 mL distile su içerisinde çözüldü ve pH 7,0'a ayarlandıktan sonra son hacim 1 L'ye tamamlandı.

Aynı prosedür 20 g ve 30 g keçiyoynuzu kullanarak gerçekleştirildi.

Serbest ve immobilize bakteri sayısının tespiti: *Brevibacillus brevis* (P14) ve *Brevibacillus borstelensis* (P35) izolatları ayrı ayrı Trypticase Soy Agar (TSA) besiyerine inoküle edildi ve 55°C’de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda petrilere ayrı ayrı saf koloniler seçilip, Trypticase Soy Broth (TSB) besiyerine ekildi ve çalkalamalı inkübatörde 24 saat süreyle bekletildi. Daha sonra bu ön kültürlerin 1 mL’indeki bakteri sayısı, spektrofotometrik yöntem (OD 600 nm) ile belirlendi (Arda, 2006). Serbest bakteri sayısının tespiti için; 1000 μ l ön kültürden alındı ve üzerine 2 mL distile su ilave edilerek toplam hacmi 3 mL’ye tamamlandı.

İmmobilize edilmiş bakteri sayısının belirlenmesi için; Bakteri öncelikle magnetit florosil nanopartikülü üzerine immobilize edildi. Bu amaçla; 0,1 g magnetit florosil nanopartikülü tartıldı ve üzerine 1000 μ l ön kültür, 2000 μ l distile su ilave edildi. Sonra içinde nanaopartikül ve bakteri bulunan ependorf tüpü alınarak 55°C’ye ayarlı çalkalayıcıda, 40 dakika süre ile inkübe edildi ve böylece bakterilerin magnetit florosil nanopartiküllerine bağlanması sağlandı. Aynı işlemler diğer bakteri içinde tekrarlandı. Bağlanmış olan bakteri miktarını belirlemek amacıyla; içerisinde nanopartikül bulunan ependorfların üst fazı alınarak atıldı, alt fazı ise su ile birkaç kez pipetajlama ile yıkandı ve 1000 μ l steril saf su ile yeniden homojenize edildi. Bu ependorf tüplerinden 1000 μ l alınıp dilüsyonla sayma tekniği (Arda 2006) kullanılarak ml deki serbest ve immobilize bakteri sayısı belirlendi.

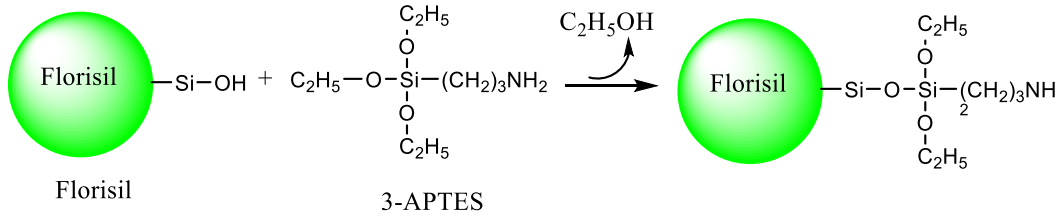
Mannanaz enziminin aktivite ölçümü: Mannanaz enziminin aktivitesini ölçmek için DNSA metodu kullanıldı. Reaksiyon ortamından 1 mL numuneden alındı ve 5000 x g’de santrifüj edildi. Numuneden 50 μ L alınıp 800 μ L locust beangum bulunan substrat ortamına ilave edildi ve 10 dakika 50°C’ye ayarlı subanyosunda bekletildi. Ardından DNSA eklenip 5 dakika süre ile 90°C’ deki su banyosunda bekletikten sonra absorbans değişimi 540 nm’de spektrofotometrik olarak belirlendi. 3 gün boyunca 6 saat aralıklarla mannanaz aktivitesi ölçüldü. Kör deney saf su kullanılarak yapıldı.

Fitaz enzim aktivitesinin tayini: Reaksiyon ortamından alınan numunede fitaz aktivite ölçümü yapıldı. Bu amaçla; 500 μ L sodyum fitatın bulunan reaksiyon ortamının 50 μ L

numune konulup, 10 dakika 50°C'deki su banyosunda inkübe edildi. Ardından 1 mL %10'lu TCA eklenip, 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ortama renklendirme çözeltilisi eklendikten sonra, absorbans değişimi saf su kullanılarak hazırlanan köre karşı 700 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

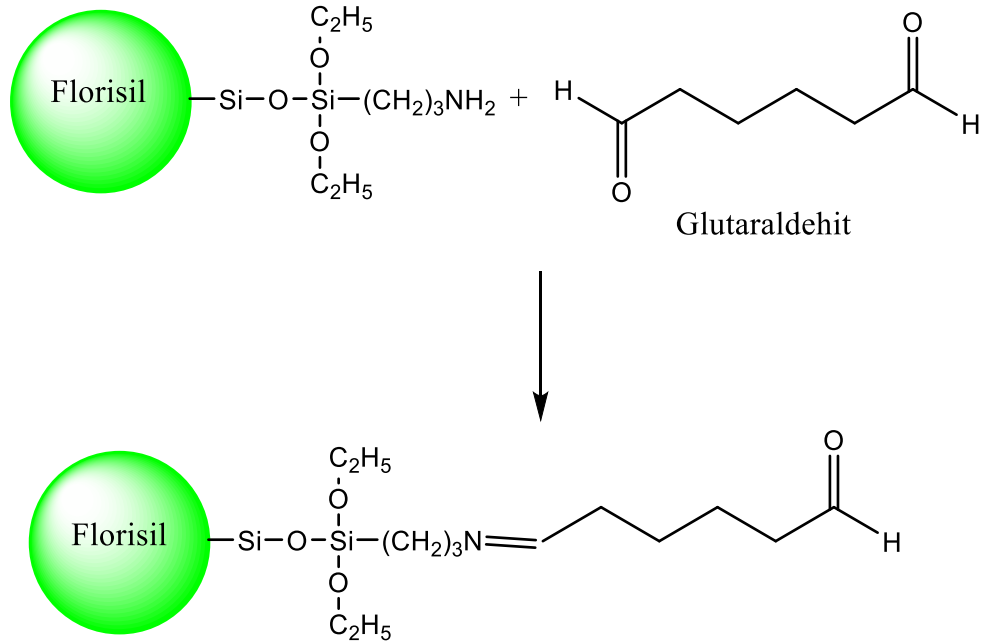
Florisilin Akrilamin Türevinin Glutaraldehit ile Aktifleştirilmesi ve Schiff Bazının İndirgenmesi

10 g florosil önce 50 mL %5'lik HNO₃ ile yıkandı, ardından destile su ile yıkanarak nötralize edildi ve 120°C'de kurutuldu. Kurutulmuş desteğin 1 gramı, %4'lük (v/v) 3-APTES'in aseton içerisinde hazırlanmış çözeltilisine eklenerek 45°C'de 25 saat boyunca inkübe edildi (Şekil 1.9). Daha sonra aktifleştirilen destek materyali saf su ile yıkanarak etüvde 105°C'de 1 gece boyunca kurutuldu.



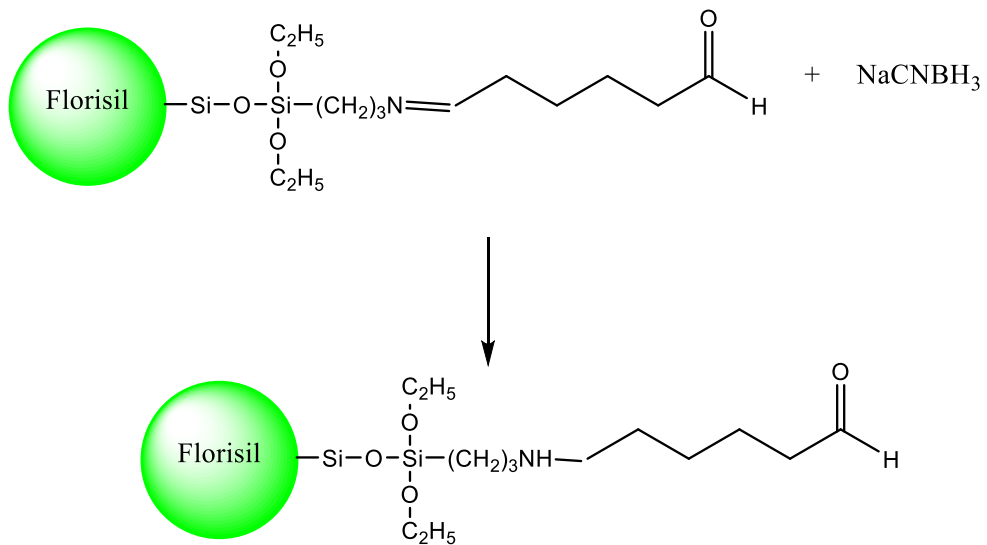
Şekil 1.9. Florisil destek materyalinin 3-APTES ile active edilmesi.

1 g akrilamin türevi alınarak 50 mM pH 7.0 fosfat tampon içerisinde %2,5 (w/v) olacak şekilde hazırlanmış olan glutaraldehit çözeltilisinden 25 mL eklenerek, 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı (Şekil 1.10). Destek saf su ile yıkanarak glutaraldehit giderildi. Süzüntüde glutaraldehit olup olmadığı Boratynski and Zal (1990), serbest amino grubu miktar tayini ise Alptekin vd (2009) tarafından önerilen yöntemle yapıldı.



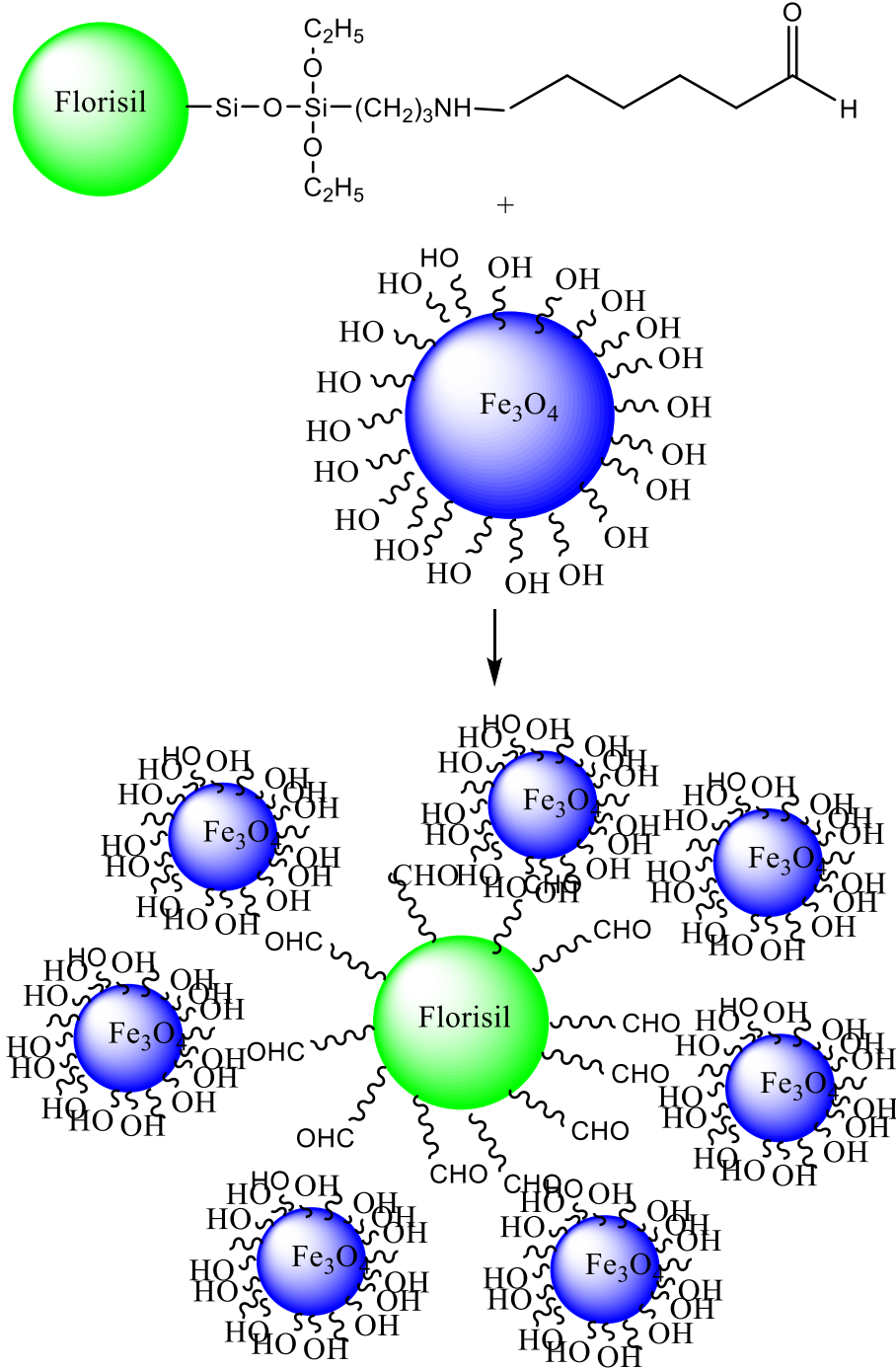
Şekil 1.10. Aktifleştirilmiş florisil desteğinin glutaraldehit ile reaksiyonu

Kurutulan destek materyalinde bulunan Schiff bazı alınarak 50 mM pH 7.0 fosfat tampon ortamında 0,25 M NaCNBH₃ çözeltisinin 10 mL'si eklenerek oda sıcaklığında 12 saat karıştırılarak indirgenmiştir. Elde edilen destek materyali saf su ile yıkayıp kurutulmuştur.



Şekil 1.11. Aktifleştirilmiş florisil desteğinin glutaraldehit ile reaksiyonu sonucu oluşan Schiff bazının indirgenmesi

Nanomagnetit florosisil nanopartiküllerin hazırlanması: 1 g aktifleştirilmiş florosisil destek materyali 100 mL 1M asetik asit çözeltisi içerisinde çözüldü. 3 g Fe_3O_4 nanomateryali ile 1 gece boyunca karıştırıldı. Bu işlemin ardından aktifleştirilmiş florosisil bileşiklerinin yüzeyi homojen bir şekilde nano Fe_3O_4 ile kaplanmış oldu.



Şekil 1.12. Aktifleştirilmiş florosisil desteğinin nano Fe_3O_4 ile muamele edilmesi

P(14) ve P(35) bakterilerinden elde edilen mannanaz ve fitaz enzimlerinin aynı ortamda üretim değerlerinin, istatistiksel (SPSS 19.0) analizi sonucunda $P < 0.05$ düzeyinde önemli olduğu bulundu. Bu deęerlendirmeler izelge 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5’de gösterildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Serbest ve immobilize bakteri sayısının tespiti

OD₆₀₀'de yapılan bu ölçümler sonucunda; *Brevibacillus brevis* (P14) ve *Brevibacillus borstelensis* (P35) bakterilerine ait OD değerlerinin sırasıyla 0.24 ve 0.30 olduğu belirlendi. Bakterilerin logaritmik faza gelme aşamasındaki OD'leri 0.6 civarında olduğundan (Bilgehan, 2002) P14 izolatu için, 1 mL bakteri kültürü + 3 mL TSB, P35 straini için ise; 1 mL bakteri kültürü +4 mL TSB karışımı hazırlandı. Daha sonra her iki bakteriye ait bu karışımından 1000'er μ L alınarak 4 tüplük bir deneme kuruldu. Her bir tüp için ayrı ayrı bir seri dilüsyon çalışması gerçekleştirildi. Yapılan bu çalışma sonucunda; serbest bakteri sayısı ve immobilize edildikten sonra üst fazdan alınan örnekteki hücre sayısı mukayese edildiğinde, yaklaşık olarak %50-60 oranında bakterinin magnetit florisit nanopartikül yüzeyine bağlanmış olduğu gözlemlendi (Çizelge 4.1). Bu çizelgede 30-300 arasında koloni bulunan petrilere ait sayım sonuçları bulunmaktadır.

Çizelge 4.1. Serbest ve immobilize *B. brevis* (P14) ve *B. borstelensis* (P35)'e ait dilüsyon oranları ve bakteri sayıları

Dilüsyon Oranları	<i>B. brevis</i> (P14)		<i>B. borstelensis</i> (P35)	
	Immobilize Hücre sayısı	Serbest Hücre sayısı	Immobilize Hücre sayısı	Serbest Hücre sayısı
10 ⁻³	195	299	183	300
10 ⁻⁴	117	180	114	175
10 ⁻⁵	78	120	76	116
10 ⁻⁶	49	75	47	80
10 ⁻⁷	30	46	30	45

10, 20, 30 ve 40 g keçiyoynuzu (KB) bulunan reaksiyon ortamına *B. brevis* (P14) mikroorganizması ile birlikte 10, 15 ve 20 g mısır (MSR) ile oluşturulmuş olan besiyeri ortamından alınan örneklerde fitaz ve mannanaz enzimlerinin ortak üretiminin zamana bağlı olarak aktivite değerleri takip edildi. Bu amaçla 66 saat boyunca yapılan fitaz aktivitesi ölçümlerinin sonuçları Çizelge 4.2’de verildi.

Elde edilen bulgulara göre; serbest *B. brevis* (P14) bakterisinin inoküle edildiği KB ortamlarına (10, 20, 30 ve 40 g) ilave edilen mısır miktarı arttıkça fitaz enzim üretiminin arttığı görüldü. En yüksek aktivite ise; 10 g KB + 20 g MSR ve 20 g KB + 20 g MSR bulunan ortamlarda 30. saat’te **1.85±0.02 EU/mL** ile maksimum fitaz aktivite, gözlemlendi. 30 g KB + 20 g MSR bulunan besiyeri ortamında 36. saat’te fitaz enzim aktivitesi **3.69±0.02 EU/mL** ile maksimum seviyeye ulaştığı belirlendi. Son besiyeri ortamı olan 40 g KB ve 15 g MSR bulunan ortamda fitaz enzim üretiminin 18. saat’te **3.72 EU/mL** ile maksimuma ulaştığı bulundu.

B. brevis (P14) bakterisi magnetit florosil nanopartikül ile kovalent olarak immobilize edilip aynı ortamda fitaz ürettirildiğinde ise; 10 g keçiyoynuzu ve 20 g mısır bulunan ortamda 30. saat’te en yüksek oranda (**2.94±0.01 EU/mL**) aktivite gösterdiği belirlendi. 20 g KB ve 20 g MSR bulunan ortamda 30. saat’te fitaz enzim aktivitesinin **2.92±0.01 EU/mL**’de en yüksek oranda aktivite gösterdiği belirlendi. 30 g KB ve 20 g MSR bulunan besiyeri ortamında 60. saat’te **3.43±0.02 EU/mL** fitaz enzim aktivitesi ile maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Son besiyeri ortamı olan 40 g keçiyoynuzu ve 20 g mısır bulunan ortamda fitaz enzim üretiminin 60. saat’te maksimuma ulaştığı ve **3.77±0.03 EU/mL** fitaz aktivite gösterdiği belirlendi. Tüm besiyeri ortamlarında *B. brevis* (P14) bakterisinin magnetit florosil nanopartikül ile kovalent olarak immobilize edilip fitaz üretildiğinde, enzim aktivitesinin serbest üretime göre yaklaşık %60 oranında arttığı görülmüştür.

Çizelge 4.2. Fitaz enziminin (P14) bakterisi tarafından üretiminde zamana bağlı değişimi

<i>B. brevis</i> (P14)						
Zaman (saat)	Serbest Fitaz Enzim Aktivitesi (EU/mL)			Immobilize Fitaz Enzim Aktivitesi (EU/mL)		
	10 g KB	10 g KB	10 g KB	10 g KB	10 g KB	10 g KB
	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR
6	1.68±0.01	1.52±0.02	1.78±0.01	2.82±0.01	2.78±0.03	2.82±0.02
12	1.71±0.02	1.47±0.01	1.78±0.03	2.36 ±0.02	2.71±0.01	2.47±0.03
18	1.70±0.03	1.59±0.03	1.70±0.02	2.84±0.01	2.36±0.02	2.28±0.03
30	1.71±0.03	1.78±0.02	1.85±0.02	2.81±0.03	2.85±0.03	2.94±0.01
36	1.72±0.03	1.72±0.03	1.55±0.02	2.74±0.01	2.68±0.03	2.67±0.02
42	1.58±0.05	1.78±0.03	1.55±0.03	2.75±0.02	2.73±0.01	2.64±0.02
54	1.72±0.04	1.80±0.02	1.54±0.03	2.65±0.02	2.79±0.03	2.79±0.01
60	1.70±0.01	1.77±0.02	1.54±0.03	2.67±0.02	2.73±0.02	2.58±0.02
66	1.56±0.02	1.67±0.02	1.54±0.04	2.55±0.02	2.52±0.01	2.13±0.02
	20 g KB	20 g KB	20 g KB	20 g KB	20 g KB	20 g KB
	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR
6	1.71±0.03	1.69±0.03	1.79±0.01	2.78±0.02	2.76±0.02	2.89±0.02
12	1.65±0.02	1.68±0.02	1.77±0.04	2.74±0.02	2.66±0.03	2.17±0.03
18	1.65±0.02	1.69±0.04	1.81±0.03	2.26±0.03	2.56±0.04	2.10±0.02
30	1.71±0.02	1.77±0.02	1.85±0.02	2.78±0.03	2.89±0.03	2.92±0.01
36	1.68±0.01	1.72 ±0.02	1.79±0.02	2.65±0.02	2.73±0.04	2.69±0.02
42	1.69±0.02	1.71 ±0.04	1.77±0.02	2.08±0.03	2.70±0.04	2.52±0.02
54	1.71±0.02	1.70 ±0.03	1.78±0.03	2.30±0.01	2.79±0.03	2.79±0.03
60	1.69±0.02	1.69±0.01	1.69±0.02	2.64±0.04	2.78±0.04	2.80±0.03
66	1.70±0.02	1.68±0.02	1.71±0.02	2.60±0.04	2.69±0.03	2.64±0.03
	30 g KB	30 g KB	30 g KB	30 g KB	30 g KB	30 g KB
	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR
6	3.13±0.02	3.50±0.02	3.60±0.03	2.61±0.02	2.02±0.03	3.31±0.02
12	3.49±0.03	3.53±0.02	3.48±0.01	2.74±0.02	2.54±0.03	2.66±0.02
18	3.30±0.02	3.57±0.02	3.46±0.02	2.79±0.03	2.80±0.03	2.72±0.02
30	3.45±0.02	3.51±0.03	3.57±0.01	2.65±0.02	2.70±0.02	2.59±0.04
36	3.51±0.02	3.55±0.02	3.69±0.02	2.73±0.02	2.68±0.03	2.26±0.02
42	3.41±0.02	3.44±0.02	3.58±0.02	2.79±0.02	3.18±0.02	3.03±0.02
54	3.36±0.02	3.37±0.03	3.47±0.02	3.09±0.05	3.28±0.02	3.24±0.02
60	3.44±0.03	3.54±0.02	3.30±0.02	3.38±0.02	3.39±0.03	3.43±0.02
66	3.29±0.02	3.46±0.03	3.45±0.02	2.54±0.05	3.15±0.03	3.17±0.03
	40 g KB	40 g KB	40 g KB	40 g KB	40 g KB	40 g KB
	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR
6	3.34±0.02	3.50±0.03	3.27±0.04	2.51±0.02	2.22±0.03	2.62±0.04
12	3.51±0.02	3.55±0.05	3.47±0.07	2.87±0.02	3.81±0.03	2.67±0.05
18	3.44±0.03	3.72±0.04	3.51±0.05	2.45±0.05	2.69±0.03	2.83±0.04
30	3.54±0.05	3.60±0.02	3.54±0.03	2.82±0.03	2.88±0.04	2.98±0.04
36	3.57±0.02	3.47±0.02	3.40±0.04	2.60±0.02	2.06±0.02	2.70±0.03
42	3.52±0.02	3.65±0.03	3.51±0.04	3.39±0.05	3.30±0.02	3.17±0.02
54	3.46±0.02	3.68±0.04	3.52±0.04	3.05±0.02	3.37±0.03	3.35±0.02
60	3.48±0.04	3.28±0.04	3.10±0.02	3.54±0.05	3.62±0.03	3.77±0.03
66	3.41±0.05	3.56±0.05	3.30±0.04	3.37±0.03	3.40±0.04	3.32±0.04

10, 20, 30 ve 40 g keçiyoynuzu bulunan reaksiyon ortamına *B. borstelensis* (P35) bakterisi ile birlikte: 10 g, 15 g, 20 g mısır konularak, fitaz ve mannanaz enzimlerinin ortak üretimi yapıldı ve reaksiyon 66 saat boyunca takip edildi. Bu amaçla 66 saat boyunca yapılan fitaz aktivitesi ölçüm sonuçları Çizelge 4.3’de verildi.

Elde edilen bulgulara göre; 10 g KB bulunan ortama ilave edilen MSR miktarı miktarı arttıkça, fitaz enzim üretiminin de arttığı görüldü. En yüksek fitaz enzim aktivitesi ise 30 g KB ve 15 g MSR bulunan ortamda 30. saatte **3.87±0.03 EU/mL** olarak gözlemlendi.

B. borstelensis (P35) bakterisi magnetit florosil nanopartiküller üzerine kovalent olarak immobilize edilip aynı ortamda fitaz ürettirildiğinde ise 30 g keçiyoynuzu ve 20 g mısır bulunan ortamda **4.09±0.04 EU/mL** ile %20’lik bir artışla en yüksek fitaz aktivitesi görüldü. Takip edilen 66 saatlik süreçte, fitaz enzim üretiminin dengeye ulaştığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.3. Fitaz enziminin *B. borstelensis* (P35) tarafından üretiminin zamana bağlı değişimi

<i>B. borstelensis</i> (P35)						
Zaman (saat)	Serbest Fitaz Enzim Aktivitesi (EU/mL)			Immobilize Fitaz Enzim Aktivitesi (EU/mL)		
	10 g KB	10 g KB	10 g KB	10 g KB	10 g KB	10 g KB
	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR
6	1.78±0.02	1.79±0.04	0.90±0.07	2.88±0.03	2.79±0.03	3.07±0.04
12	1.97±0.04	1.68±0.01	0.91±0.04	2.58±0.02	2.70±0.04	2.69±0.03
18	2.21±0.02	1.99±0.02	0.94±0.04	2.17±0.02	2.67±0.03	2.50±0.03
30	1.99±0.05	2.11±0.02	0.95±0.08	2.73±0.03	2.26±0.03	1.51±0.01
36	1.90±0.03	2.06±0.02	1.10±0.03	2.50±0.05	2.60±0.01	2.52±0.02
42	2.19±0.02	2.21±0.03	1.00±0.32	1.82±0.03	1.66±0.03	1.62±0.02
54	2.19±0.04	2.27±0.03	2.46±0.04	3.01±0.04	3.49±0.05	3.50±0.03
60	1.96±0.02	1.92±0.02	0.79±0.06	2.80±0.02	2.89±0.04	2.72±0.04
66	1.79±0.02	1.62±0.05	0.72±0.05	1.42±0.05	1.20±0.03	1.05±0.02
	20 g KB	20 g KB	20 g KB	20 g KB	20 g KB	20 g KB
	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR
6	1.88±0.03	2.61±0.04	1.89±0.01	2.76±0.04	2.66±0.02	2.48±0.03
12	2.06±0.02	2.67±0.03	1.98±0.03	2.70±0.02	2.76±0.02	2.82±0.02
18	2.04±0.03	2.71±0.04	2.12±0.02	2.57±0.03	2.70±0.03	2.69±0.04
30	2.03±0.01	2.38±0.03	2.03±0.02	2.45±0.02	2.45±0.03	2.74±0.03
36	2.24±0.03	2.75±0.02	1.89±0.03	2.50±0.03	2.53±0.10	2.69±0.04
42	2.05±0.03	2.87±0.03	2.20±0.02	1.60±0.03	1.67±0.03	1.57±0.03
54	2.25±0.04	2.49±0.03	2.12±0.03	2.67±0.03	2.80±0.02	2.87±0.03
60	1.85±0.04	2.58±0.03	1.94±0.04	2.73±0.02	2.72±0.05	2.68±0.03
66	1.70±0.02	2.33±0.04	1.89±0.03	1.25±0.02	1.42±0.04	1.26±0.04
	30 g KB	30 g KB	30 g KB	30 g KB	30 g KB	30 g KB
	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR
6	3.55±0.02	3.56±0.03	3.53±0.03	3.09±0.01	3.22±0.03	2.98±0.05
12	3.40±0.01	3.37±0.03	3.38±0.02	3.16±0.02	3.21±0.02	3.18±0.02
18	3.54±0.03	3.41±0.02	3.30±0.02	3.01±0.04	3.15±0.03	3.20±0.02
30	3.25±0.03	3.87±0.03	3.22±0.01	3.52±0.04	3.54±0.02	4.09±0.04
36	3.44±0.03	3.43±0.01	3.53±0.03	2.98±0.05	3.25±0.02	3.37±0.04
42	3.50±0.01	3.18±0.04	3.43±0.04	3.30±0.02	3.20±0.03	3.28±0.02
54	3.30±0.02	3.47±0.03	3.53±0.01	3.38±0.03	3.44±0.03	3.62±0.02
60	3.17±0.02	3.34±0.02	3.46±0.01	3.19±0.04	3.21±0.02	3.20±0.05
66	3.27±0.03	3.41±0.03	3.50±0.03	3.22±0.04	3.07±0.02	3.26±0.03
	40 g KB	40 g KB	40 g KB	40 g KB	40 g KB	40 g KB
	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR
6	3.49±0.02	3.51±0.02	3.55±0.03	2.58±0.08	3.34±0.05	3.28±0.05
12	3.31±0.02	3.56±0.03	3.48±0.03	3.35±0.07	3.23±0.01	3.16±0.03
18	3.38±0.03	3.49±0.04	3.53±0.04	3.15±0.04	3.28±0.03	3.32±0.02
30	3.63±0.02	3.56±0.03	3.51±0.04	3.27±0.02	3.25±0.04	3.28±0.04
36	3.54±0.03	3.53±0.03	3.52±0.03	3.31±0.02	3.30±0.03	3.30±0.03
42	3.62±0.03	3.43±0.04	3.57±0.05	3.33±0.04	3.11±0.03	3.16±0.05
54	3.56±0.03	3.69±0.03	3.83±0.01	3.40±0.03	3.32±0.04	3.21±0.02
60	3.43±0.02	3.46±0.03	3.29±0.04	3.35±0.02	3.40±0.02	3.43±0.01
66	3.65±0.01	3.50±0.02	3.52±0.02	3.31±0.03	3.24±0.02	3.16±0.06

Farklı miktarda KB (10, 20, 30 ve 40 g) ve MSR (10,15 ve 20 g) bulunan besiyeri ortamına *B.brevis* (P14) izolatı inoküle edilerek, fitaz ve mannanaz enzimlerinin ortak üretiminin zamana bağlı olarak aktivite değerleri takip edildi. Bu amaçla 66 saat boyunca yapılan mannanaz aktivitesi ölçümlerinin sonuçları Çizelge 4.4'de verildi.

Elde edilen bulgulara göre; serbest *B. brevis* (P14) bakterisinin inoküle edildiği 10, 20, 30 ve 40 g KB bulunan ortamlarına ilave edilen MSR miktarı arttıkça mannanaz enzim aktivitesinin de fitaz enzimine benzer bir şekilde arttığı görüldü. Mannanaz aktivitesi ise; 10 g KB ve 20 g MSR bulunan ortamda 54. saatte **3.83±0.03 EU/mL** olarak belirlendi. 20 g KB ve 20 g MSR bulunan ortamda 54. saat'te mannanaz enzim aktivitesi **6.93±0.09 EU/mL** maksimuma ulaştığı belirlendi. 54. saat'te 30 g KB ve 20 g MSR bulunan besiyeri ortamında mannanaz enzim aktivitesinin **1.29±0.02 EU/mL**, 40 g KB + 15 g MSR bulunan ortamda ise 66. saat'te **1.86±0.03 EU/mL** ile maksimuma ulaştığı görüldü.

B. brevis (P14) bakterisi, magnetit florosil nanopartikül ile kovalent olarak immobilize edildikten sonra, mannanaz enzim aktivitesi takip edildi. 10 g KB + 20 g MSR bulunan ortamda 60. saat'te **3.43±0.02 EU/mL** ile en yüksek aktivite gösterdiği belirlendi. 20 g KB ve 20 g MSR bulunan ortamda 66. saat'te mannanaz **7.77±0.03 EU/mL** ile maksimuma ulaştığı görülmüştür. 30 g keçiyoynuzu ve 20 g mısır bulunan besiyeri ortamında 66. saat'te **1.35±0.04 EU/mL** ile mannanaz enzim üretiminin en yüksek seviyeye ulaştığı görüldü. Son besiyeri ortamı olan 40 g KB ve 20 g MSR bulunan ortamda immobilize *B. brevis* (P14) bakterisinin mannanaz enzim üretiminin 54. saat'te maksimuma ulaştığı ve **1.56±0.04 EU/mL** mannanaz enzim aktivitesi gösterdiği belirlendi. Tüm besiyeri ortamlarında *B. brevis* (P14) bakterisinin magnetit florosil nanopartikül ile kovalent olarak immobilize edilip mannanaz enzimi üretildiğinde enzim aktivitesinin serbest üretime göre yaklaşık %22 oranında arttığı görülmüştür.

Çizelge 4.4. Mannanaz enziminin *B. brevis* (P14) tarafından üretiminin zamana bağlı değişimi

<i>B. brevis</i> (P14)						
Zaman (saat)	Serbest Mannanaz Enzim Aktivitesi (EU/mL)			Immobilize Mannanaz Enzim Aktivitesi (EU/mL)		
	10 g KB	10 g KB	10 g KB	10 g KB	10 g KB	10 g KB
	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR
6	3.49±0.02	3.51±0.02	3.55±0.04	2.58±0.03	3.34±0.03	3.28±0.04
12	3.31±0.03	3.56±0.03	3.48±0.01	3.35±0.03	3.23±0.04	3.16±0.03
18	3.38±0.04	3.49±0.03	3.53±0.10	3.15±0.05	3.28±0.04	3.32±0.01
30	3.63±0.02	3.56±0.03	3.51±0.02	3.27±0.04	3.25±0.03	3.28±0.02
36	3.54±0.03	3.53±0.02	3.52±0.03	3.31±0.04	3.30±0.04	3.30±0.04
42	3.62±0.03	3.43±0.04	3.57±0.02	3.33±0.01	3.11±0.02	3.16±0.03
54	3.56±0.04	3.69±0.06	3.83±0.03	3.40±0.01	3.32±0.03	3.21±0.02
60	3.43±0.05	3.46±0.04	3.29±0.02	3.35±0.04	3.40±0.01	3.43±0.02
66	3.65±0.04	3.50±0.03	3.52±0.04	3.31±0.05	3.24±0.04	3.16±0.07
	20 g KB	20 g KB	20 g KB	20 g KB	20 g KB	20 g KB
	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR
6	2.25±0.04	2.17±0.02	2.30±0.03	4.11±1.04	4.96±0.01	4.58±0.04
12	2.66±0.04	3.32±0.03	3.22±0.04	4.58±0.04	4.51±0.03	4.49±0.07
18	4.02±0.05	4.09±0.04	4.13±0.03	4.55±0.04	5.81±0.02	4.96±0.03
30	4.01±0.05	4.07±0.05	4.49±0.08	4.02±0.03	4.66±0.04	3.70±0.03
36	2.89±0.02	4.81±0.06	4.56±0.04	4.96±0.02	6.28±0.03	6.17±0.02
42	5.37±0.03	5.79±0.04	4.91±0.04	3.68±0.02	5.58±0.12	5.72±0.04
54	4.33±0.01	6.45±0.06	6.93±0.09	5.70±0.04	6.80±0.04	7.70±0.04
60	5.72±0.07	6.90±0.04	1.52±0.05	4.86±0.03	6.84±0.02	6.96±0.04
66	6.15±0.05	6.63±0.01	2.56±0.06	4.27±0.01	6.60±0.03	7.77±0.03
	30 g KB	30 g KB	30 g KB	30 g KB	30 g KB	30 g KB
	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR
6	0.40±0.02	0.34±0.04	0.28±0.05	0.37±0.03	0.38±0.04	0.24±0.04
12	0.49±0.03	0.55±0.06	0.54±0.05	0.25±0.03	0.25±0.03	0.25±0.06
18	0.50±0.02	0.64±0.04	0.64±0.03	0.27±0.03	0.30±0.03	0.30±0.03
30	0.77±0.03	0.85±0.01	0.98±0.07	0.33±0.04	0.38±0.04	0.45±0.03
36	0.89±0.04	0.91±0.04	1.11±0.04	0.39±0.04	0.44±0.03	0.49±0.05
42	1.00±0.04	0.94±0.02	1.12±0.02	0.53±0.03	0.61±0.03	0.68±0.06
54	1.02±0.04	1.18±0.04	1.29±0.02	0.82±0.03	0.97±0.03	1.04±0.04
60	0.66±0.03	0.83±0.05	0.92±0.07	1.20±0.05	1.05±0.34	1.30±0.03
66	0.92±0.06	0.95±0.05	1.01±0.32	1.22±0.05	1.21±0.03	1.35±0.04
	40 g KB	40 g KB	40 g KB	40 g KB	40 g KB	40 g KB
	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR
6	0.40±0.02	0.40±0.02	0.35±0.02	0.32±0.04	0.47±0.03	0.28±0.04
12	0.70±0.03	0.75±0.03	0.76±0.04	0.40±0.02	0.31±0.04	0.30±0.02
18	0.78±0.03	0.84±0.03	0.85±0.04	0.40±0.05	0.36±0.01	0.37±0.04
30	1.17±0.03	1.21±0.04	1.27±0.04	0.79±0.06	0.50±0.02	0.49±0.03
36	1.21±0.05	1.32±0.03	1.35±0.04	0.80±0.03	0.53±0.02	0.53±0.04
42	1.24±0.03	1.37±0.04	1.50±0.03	1.22±0.04	1.03±0.03	0.92±0.04
54	1.05±0.03	1.05±0.03	1.06±0.03	1.51±0.05	1.53±0.04	1.56±0.04
60	1.60±0.03	1.68±0.03	1.51±0.03	1.32±0.04	0.68±0.04	0.73±0.04
66	1.71±0.03	1.86±0.03	1.55±0.04	1.51±0.02	0.71±0.03	0.78±0.05

10, 20, 30 ve 40 g keçiyoynuzu (KB) bulunan besleyici ortamlara, *B. borstelensis* (P35) mikroorganizması ile birlikte 10 g, 15 g, 20 g mısır (MSR) ilave edilerek oluşturulan reaksiyon ortamından alınan örneklerde, fitaz ve mannanaz enzimlerinin ortak üretiminin zamana bağlı olarak aktivite değerleri takip edildi. Bu amaçla 66 saat boyunca yapılan mannanaz aktivite ölçüm sonuçları Çizelge 4.5’de verildi.

Elde edilen bulgulara göre; serbest *B. borstelensis* (P35) bakterisinin inoküle edildiği 10, 20, 30 ve 40 g KB bulunan ortamlara ilave edilen mısır miktarı artıkça, mannanaz enzim aktivitesinde ciddi oranda arttığı görüldü. Her bir besiyeri ortamı incelendiğinde en yüksek aktiviteyi, birinci besiyeri ortamında: 10 g KB ve 15 g MSR bulunan ortamlarda 42. saat’te **4.04±0.05 EU/mL** ile maksimum mannanaz aktivitesi görüldü. İkinci besiyeri ortamında: 20 g KB ve 20 g MSR bulunan ortamda ise 66. saat’te **5.39±0.02 EU/mL** ile maksimum mannanaz aktivitesi gözlemlendi. Üçüncü besiyeri ortamında ise; 42. saat’te 30 g keçiyoynuzu ve 20 g mısır bulunan besiyeri ortamında, **0.98±0.03 EU/mL** ile ve dördüncü besiyeri ortamında da 40 g KB ile 20 g MSR bulunan ortamda mannanaz enziminin üretiminin 66. saat’te **1.61±0.01 EU/mL** ile maksimum enzim aktivitesine ulaştığı belirlendi.

B. borstelensis (P35) bakterisi magnetit florosil nanopartikül ile kovalent olarak immobilize edildikten sonra mannanaz enzimi ürettirildiğinde ise; 10 g KB + 15 g MSR bulunan ortamda, 66. saat’te en yüksek oranda **7.31±0.01 EU/mL** mannanaz enzim aktivitesi gösterdiği belirlendi. 20 g keçiyoynuzu ve 20 g mısır bulunan ortamda 66. Saat’de mannanaz enzim aktivitesinin **7.41±0.03 EU/mL** ile maksimuma ulaştığı görüldü. 30 g KB ve 20 g MSR bulunan besiyeri ortamında da 66. saat’te **1.10±0.06 EU/mL** ile mannanaz enzim üretiminin tüm ortamlar içerisindeki en yüksek aktiviteye ulaştığı gözlemlendi. Son besiyeri ortamı olan 40 g KB + 20 g MSR bulunan ortamda immobilize *B. borstelensis* (P35) bakterisinin mannanaz enzim üretiminin 66. saat’te maksimuma ulaştığı ve **1.53±0.03 EU/mL** mannanaz enzim aktivitesi gösterdiği belirlendi. Tüm besiyeri ortamlarında *B. borstelensis* (P35) bakterisinin magnetit florosil nanopartikül ile kovalent olarak immobilize edilip mannanaz enzimi ürettirildiğinde enzim aktivitesinin serbest üretime göre yaklaşık %27 oranında arttığı tespit edildi.

Çizelge 4.5. Mannanaz enziminin *B. borstelensis* (P35) bakterisi tarafından üretiminin zamana bağlı değişimi

<i>B. borstelensis</i> (P35)						
Zaman (saat)	Serbest Mannanaz Enzim Aktivitesi (EU/mL)			Immobilize Mannanaz Enzim Aktivitesi (EU/mL)		
	10 g KB	10 g KB	10 g KB	10 g KB	10 g KB	10 g KB
	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR
6	1.81±0.02	1.41±0.05	1.69±0.02	3.68±0.01	3.29±0.02	3.37±0.02
12	2.11±0.05	2.04±0.03	2.30±0.03	3.72±0.04	3.62±0.02	3.43±0.01
18	2.19±0.03	2.10±0.02	2.39±0.02	3.21±0.03	3.92±0.02	3.88±0.02
30	1.84±0.04	2.23±0.04	2.17±0.01	3.57±0.02	3.51±0.04	4.60±0.02
36	2.16±0.03	2.27±0.04	2.47±0.03	3.92±0.02	4.13±0.04	4.43±0.03
42	3.65±0.04	4.04±0.05	3.22±0.02	3.62±0.03	4.41±0.02	4.62±0.04
54	1.88±0.03	1.74±0.03	1.91±0.03	3.70±0.04	4.90±0.02	5.17±0.04
60	1.68±0.04	1.33±0.03	3.25±0.03	3.80±0.03	5.15±0.03	5.51±0.03
66	2.15±0.03	1.80±0.01	3.31±0.01	4.00±0.04	7.31±0.01	5.62±0.02
	20 g KB	20 g KB	20 g KB	20 g KB	20 g KB	20 g KB
	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR
6	2.95±0.03	3.12±0.06	2.78±0.01	3.51±0.03	4.47±0.03	4.66±0.03
12	3.32±0.37	3.55±0.03	3.20±0.03	4.41±0.03	5.37±0.02	4.88±0.03
18	3.33±0.52	3.01±0.04	3.44±0.03	4.86±0.02	5.58±0.04	5.49±0.03
30	3.29±0.06	2.33±0.04	3.15±0.03	3.98±0.06	4.47±0.03	5.00±0.05
36	2.98±0.05	2.07±0.07	3.03±0.04	3.88±0.05	5.78±0.02	6.53±0.02
42	3.78±0.04	2.88±0.03	4.80±0.05	4.08±0.05	6.68±0.05	6.35±0.02
54	3.20±0.03	2.08±0.04	3.69±0.07	5.02±0.06	6.92±0.04	6.04±0.02
60	4.43±0.03	3.29±0.03	4.99±0.04	5.60±0.03	7.02±0.06	6.11±0.05
66	3.74±0.04	4.46±0.03	5.39±0.02	6.43±0.04	6.79±0.03	7.41±0.03
	30 g KB	30 g KB	30 g KB	30 g KB	30 g KB	30 g KB
	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR
6	0.30±0.02	0.60±0.03	0.60±0.02	0.31±0.04	0.29±0.04	0.29±0.05
12	0.45±0.03	0.47±0.03	0.44±0.03	0.37±0.04	0.36±0.05	0.35±0.02
18	0.56±0.04	0.58±0.03	0.53±0.02	0.34±0.03	0.34±0.03	0.40±0.01
30	0.70±0.04	0.69±0.04	0.82±0.04	0.33±0.03	0.42±0.02	0.47±0.04
36	0.80±0.03	0.68±0.03	0.90±0.02	0.49±0.04	0.52±0.03	0.58±0.02
42	0.75±0.02	0.76±0.03	0.98±0.03	0.65±0.03	0.71±0.04	0.82±0.03
54	0.82±0.04	0.90±0.04	0.85±0.04	0.75±0.02	0.83±0.03	0.92±0.03
60	0.95±0.02	0.95±0.03	0.90±0.02	0.76±0.02	0.81±0.03	0.91±0.03
66	0.79±0.03	0.85±0.03	0.82±0.03	0.81±0.02	0.88±0.04	1.10±0.06
	40 g KB	40 g KB	40 g KB	40 g KB	40 g KB	40 g KB
	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR	10 g MSR	15 g MSR	20 g MSR
6	0.44±0.03	0.44±0.03	0.68±0.05	0.31±0.03	0.28±0.05	0.24±0.03
12	0.51±0.02	0.51±0.04	0.50±0.02	0.44±0.01	0.43±0.04	0.31±0.02
18	0.61±0.01	0.62±0.04	0.67±0.02	0.50±0.06	0.46±0.03	0.48±0.02
30	0.92±0.03	1.02±0.02	1.25±0.06	0.57±0.04	0.52±0.03	0.62±0.03
36	0.98±0.04	1.11±0.03	1.26±0.06	0.78±0.05	0.69±0.02	0.75±0.02
42	0.97±0.02	1.13±0.04	1.29±0.04	0.87±0.03	0.83±0.03	1.08±0.01
54	1.15±0.05	1.30±0.02	1.27±0.04	0.85±0.02	0.82±0.06	1.09±0.05
60	1.22±0.04	1.24±0.04	1.59±0.04	1.09±0.02	1.08±0.05	1.12±0.06
66	1.23±0.04	1.25±0.06	1.61±0.01	1.25±0.03	1.26±0.03	1.53±0.03

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Fitaz (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase), fitik asiti (myo-inositol hekzafosfat), myo-inositol fosfat, inorganik monofosfat ve serbest myo-inositol'e hidrolize eden enzimdir (Saribuga vd 2014a; Saribuga vd 2014b; Nadaroglu ve Önem 2014).

Mannanaz ise; endo- β -D-mannanazı (EC 3.2.1.78, mannan endo 1,4- β -D-mannosidase) mannan, galaktomannan, glukomannan ve galaktoglukomannan içerisinde bulunan 1,4 n beta-D-mannosidik bağları hidroliz eder. Hemiselüloz tabiatta en fazla bulunan heteropolimerlerden biridir. Heteropolimerlerin en önemlileri 1,4- β -D-ksilan ve hetero 1,4,- β -D-mannan'dır (Adiguzel vd 2014; Nadaroglu vd 2014).

Bu çalışmada, florisil destek materyal olarak kullanıldı. 3-APTES ile aktif edilerek yüzeyinde $-NH_2$ grupları oluşturuldu. Ardından matriksin yüzeyindeki amin grupları glutaraldehit ile modifiye edilerek Schiff bazı oluşturuldu. Oluşan Schiff bazı kararlı olmadığı için sodyum siyanoborhidrür kullanılarak seçimli olarak indirgenmesi gerçekleştirildi. Ardından modifiye florisil destek materyalini magnetik hale dönüştürmek ve yüzey alanını genişletebilmek amacıyla; alınan florisilin ağırlığının 3 katı kadar miktarda nano Fe_3O_4 bileşiği ile muamele edilerek magnetit nano florisil elde edildi.

Literatürde, *Brevibacillus brevis* (P14) ve *Brevibacillus borstelensis* (P35) mikroorganizmalarının magnetit nano florisile immobilizasyonu ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Aktifleştirilmiş magnetit florisile, glutaraldehit ara kolu üzerinden *B. brevis* (P14) ve *B. borstelensis* (P35) mikroorganizmalarının en uygun bağlanma pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla; pH 7.0 ve 55.0°C olduğu görüldü. Bu değerler aynı zamanda mikroorganizmaların üretilme pH ve sıcaklık değerleridir. Ayrıca; mikroorganizmaların magnetit florisil nanopartikül destek materyaline yaklaşık %65 oranında bağlandığı yayma ekim yöntemi kullanılarak belirlendi.

Hem serbest hem de magnetit florosil nanopartikülleri üzerine immobilize edilmiş *B. brevis* (P14) ve *B. borstelensis* (P35) izolatlarının inoküle edildiği, karbon kaynağı olarak değişik oranlarda KB (10, 20, 30 ve 40 g) ve MSR (10 g, 15 g ve 20 g) ihtiva eden reaksiyon ortamlarından alınan örneklerde, fitaz ve mannanaz enzimlerinin ortak üretiminin zamana bağlı değişimi takip edildi. Bu amaçla 3 gün 6'şar saat aralıklarla yapılan fitaz ve mannanaz aktivite ölçüm sonuçları Çizelge 4.2 – 4.5'de verildi. Bu veriler incelendiğinde, genel olarak enzim aktivitesinin zamanla bakteri sayısına paralel olarak literatürde belirtildiği (Riaz *et al.* 2003; Mishra *et al.* 2014) gibi artış gösterdiği gözlemlendi.

Elde edilen sonuçlara göre; serbest *B. brevis* (P14) bakterisinin fitaz enziminin üretimi maksimum olarak 30 g KB + 20 g MSR bulunan ortamda, **3.69±0.02 EU/mL** ve magnetit florosil nanopartikül yüzeyine immobilize olmuş formu ise **3.43±0.02 EU/mL** ile maksimum oranda fitaz enzimini ürettiği belirlendi. Mannanaz enziminin ise hem serbest (**6.93±0.09 EU/mL**) hemde immobilize (**7.77±0.03 EU/mL**) edilmiş bakteri için aynı ortamda (20 g KB + 20 g MSR) maksimum enzim üretimine ulaştığı gözlemlendi. *B. borstelensis* (P35) bakterisinin KB ve MSR'ı karbon kaynağı olarak kullanımı sonucunda, fitaz ve mannanaz enzim üretimi ise şöyle değişmiştir: Fitaz enzimi serbest bakteri ortamında (30 g KB + 15 g MRS) **3.87±0.03 EU/mL** ve bağlı bakteri ortamında (30 g KB+ 20 g MSR) **4.09±0.04 EU/mL** değerleri ile maksimuma ulaşmıştır. Mannanaz enzimi ise; serbest ve bağlı bakteri için aynı oranda karbon kaynağı içeren ortamda (20 g KB + 20 g MSR) sırasıyla, **5.39±0.02 EU/ mL** ve **7.41±0.03 EU/mL** aktivite değerleri ile maksimuma ulaştığı belirlendi. Nurullah (2011) yaptığı bir çalışmada, *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 izolatının inoküle edildiği kültür ortamına ilave edilen farklı karbon kaynaklarının, doğallığı ve miktarının enzim aktivitesi üzerine olumlu etkisinin olduğunu gözlemledi. Demirkan *et al.* (2014), farklı karbon kaynaklarının bakteriyel fitaz üretimi üzerine etkisini tespit etmek amacıyla yaptığı araştırma sonucunda; modifiye besiyerinde, standart besiyerine göre bakteriyel üremenin daha hızlı olduğu ve buna paralel olarak da enzim aktivitesinde %62'lik bir artışın olduğunu tespit etti. Mishra *et al.* (2014), mikrobiyal kültür ortamında kullanılan

mısır nişastası gibi doğal karbon kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine pozitif etkisinin olduğunu gösterdi. Tüm bu bulgular bizim sonuçlarımızı desteklemektedir.

Sonuçlar göz önüne alındığında, elde edilen yüksek fitaz enzim aktivitesinden dolayı, her iki bakterinin de önce mananı daha sonra fitatı karbon kaynağı olarak kullandığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca her iki bakterinin mannanaz enzim aktivitelerinin, fitaz enzim aktivitelerine göre daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Her iki bakterinin kovalent olarak destek materyaline %65 oranında bağlanmasının; izolatları stabil hale getirildiği ve enzim üretiminde artışa sebep olduğu düşünülmektedir. Çünkü daha az sayıda bakterinin daha fazla miktarda hem mannanaz hemde fitaz enzim üretmesi stabil ve sterik engel ortadan kalkmış olan bir ortamda kolaylıkla sağlanacaktır. Bu sebepten dolayı besiyeri ortamındaki karbon kaynakları daha ergonomik olarak kullanılıp daha fazla enzim üretimi sağlanmıştır. Özellikle hücrenin kendisinin kullanılarak fitaz ve mannanaz üretilmesi, enzim aktivitesinin farklı çevre koşullarından etkilenecek aktivite kaybetme riskinin de ortadan kaldırması açısından önemlidir (Yan *et al.* 2008; Cho *et al.* 2011). Hem fitaz hem de mannanaz enzimlerinin farklı destek materyallerine immobilize edilerek gerçekleştirilen bazı çalışmalarda bizim elde ettiğimiz verimden daha düşük değer elde ettikleri belirtilmiştir (Çelem ve Önal 2009; Kumar and Mukesh 2014). Bu sebepten dolayı yaptığımız bu çalışma alanında gelecekte planlanacak olan diğer çalışmalara yön verecektir.

Elde edilen verilerin ışığında; magnetit florisit nano partiküllere immobilize edilen *B. brevis* (P14) ve *B. borstelensis* (P35) bakterilerinin bir preparat şeklinde dizayn edilebileceği ve bu bakteri immobilize sistemlerin; yem katkısı, gıda sanayi, toprak iyileştirme, ilaç sanayi ve bir çok alanda güvenle kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Anderson, A., 1985. Interactions between proteins and constituents that affect protein quality. In: Digestibility and amino acid availability in cereals and oilseeds. In Minnesota: American Association of Cereal Chemists, pp. 31–45.
- Adıgüzel, A., 2006. Bazı termal tesislerden alınan su örneklerinden izole edilen termofilik bakterilerin moleküler karakter zasyonu. Atatürk.
- Adıgüzel, A., Nadaroglu, H., ve Adıgüzel, G., 2014. Purification and Characterisation of Mannanase from *Bacillus pumilus* (M27) and Its Application In Some Fruit Juices, Journal of Food Science and Technology.
- Ahmed, S.A., 2008. Invertase production by *Bacillus macerans* immobilized on calcium alginate beads. J Appl Sci Res, 4(12), pp.1777–1781.
- Alptekin, Ö., Tükel, S.S., Yıldırım, D., ve Alagöz, D., 2009. Characterization and properties of catalase immobilized onto controlled pore glass and its application in batch and plug flow type reactors. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 58:124-131.
- Altinkaya, S.A., yemenicioğlu, A., ve yürekli, Y., 2008. Enzim İmmobilize Edilmiş Membranların Hazırlanması ve Karakterizasyonu: Membran Performanslarının Belirlenmesi, İzmir.
- Aziz, S.A., Ong, L.G.A., Hassan, M.A., ve Karim., M.I.A., 2008. Production parameters optimization of mannase production from *Aspergillus niger* FTCC 5003 using palm kernel cake as carbon source. Asi J Biochem, 3(5), pp.297–307.
- Baker, G.C., Gaffar, S., Cowan, D.A., and Suharto, A.R., 2001. Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. FEMS microbiology letters, 200(1), pp.103–9.
- Baruah, K., Sahu, N.P., Pal, A.K., Debnath, D., Yengkokpam, S., and 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(2), pp.238–249.
- Başbülbul, G., ve Biyik, H.H., 2010. Termofilik Bakteri İzolatlarının Antibakteriyal Aktivite Spektrumları ve 16S rRNA Dizi Analizi ile Tanılanmaları. , 1(1), pp.1–7.
- Bettioli, J.L.P., Boutique, J.P., and Gualco, L.M.P., 2000. Nonaqueous liquid detergent compositions comprising a borate releasing compound and a mannanase.
- Bhat, M., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnology advances, 18(5), pp.355–83.
- Bilgehan, H., 2002, Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilim , Barış Yayınları, Fakülterler Kitab evi, İzmir, 622s.
- Boratynski, J., Zal, T., 1990 Colorimetric micromethods for glutaraldehyde determination by means of phenol and sulfuric acid or phenol and perchloric acid. Analytical Biochemistry az a source for novel enzymes. Current Opinion in Microbiology, 6 (3), pp.213_218.
- Burg, B., 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. Current Opinion in Microbiology, 6(3), pp.213–218.

- Cai, X.P., Zhang, J., Yuan, H.-Y., Fang, Z., Li, and Y.-Y., 2005. Secretory expression of heterologous protein in *Kluyveromyces cicerisporus*. Applied microbiology and biotechnology, 67(3), pp.364–9.
- Casey, A., and Walsh, G., 2004. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. Journal of biotechnology, 110(3), pp.313–322.
- Çelem, E.B., ve Önal, S., 2009. Immobilization of phytase on epoxy-activated Sepabead EC-EP for the hydrolysis of soymilk phytate. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 61(3-4), pp.150–156.
- Chao, W., and Hsu, A., 2004. Response of the soil bacterial community to the addition of toluene and toluene-degrading bacteria. Soil Biology and Biochemistry, 36(3), pp.479–487.
- Chauhan, P.S., Puri, N., Sharma, P., and Gupta, N., 2012. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. Applied microbiology and biotechnology, 93(5), pp.1817–30.
- Cho, E.A., Kim, E.J., and Pan, J.G., Adsorption immobilization of Escherichia coli phytase on probiotic *Bacillus polyfermenticus* spores. Enzyme Microb Technol. 2011 Jun 10;49 (1):66-71.
- Cho, H.-N., Hofrichter, M., and Ziegenhagen, D., 2011. Nutritional status according to sensitized food allergens in children with atopic dermatitis. Allergy, asthma and immunology research, 3(1), pp.53–7.
- Demirjian, D., Moris-Varas, F., and Cassidy, C., 2001. Enzymes from extremophiles. Current opinion in chemical., pp.144–151.
- Demirkan, E., Baygın, E., ve Usta, A., 2014. Topraktan fitat hidrolize eden *bacillus* sp. lerin taranması ve fitaz üretimi üzerine bazı besinsel ve fiziksel faktörlerin optimizasyonu.
- Develioğlu, H., ve Taner, L., 1998. Myeloperoksidaz'ın özellikleri ve periodontal hastaliktaki önemi. , pp.24–27.
- Dhawan, S., and Kaur, J., 2007. Microbial mannanases: an overview of production and applications. Critical reviews in biotechnology, 27(4), pp.197–216.
- Duruksu, G., 2009. Cloning , Expression and Characterization of Endo-b-1, 4-Mannanase from *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus sojae* and *Pichia pastoris*., pp.271–276.
- Dvorakova, J., 1998. Phytase: Sources, preparation and exploitation. Folia Microbiologica, 43(4), pp.323–338.
- Demirkan, E., Baygın, E., ve Usta, A., 2014. Screening of phytate hydrolysis *Bacillus* sp. Isolated from soil and optimization of the certain nutritional and physical parameters on the production of phytase.Turk Biyokimya dergisi Turkish Journal of Biochemistry_ Turk J Biochem 2014; 39(2); 206_214.
- Eichler, J., 2001. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. Biotechnology Advances, 19(4), pp.261–278.
- Ekren, G., 2013. Fitaz üreten fungusun enzimin üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu.
- Ellestad, L., and Angel, R.J.R.J.S., 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, (Ravindran 1996), pp.259–273.

- Çelem, E., ve Önal, S., 2009. Immobilization of Avocado Phytase on Epoxy Activated Sepabead EC-EP and its Application in Soymilk Phytate Hydrolysis Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology , 2009, 37: 195-202.
- Fritze, D., 2004. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*, 94(11), pp.1245–8.
- Fujiwara, S., 2002. Extremophiles: developments of their special functions and potential resources. *Journal of bioscience and bioengineering*, 94(6), pp.518–25.
- Gessesse, A., 1998. Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline *Xylanases* From an Alkaliphilic *Bacillus*. sp. *Applied and Environmental Microbiology*, pp.3533–3535.
- Göksungur, Y., ve Güven, U., 2002. Kalsiyum Aljinatta Hücre İmmobilizasyonu ve Biyoteknolojideki Uygulamaları. *Gıda teknolojisi Derneği*, 27(6), pp.511–518.
- Goto, K., Omura, T., Hara, Y., and Sadaie, Y., (2004). Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *J Gen Appl Microbiol* 46, 1–8.
- Greiner, R., Haller, E., Konietzny, U., and Jany, K.-D. (1997). Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Archet.* 1997. Purification and Characterization of a Phytase from *Klebsiella terrigena*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 341(2), pp.201–206.
- Greiner, R., 1998. Purification and properties of a phytase from rye. *Journal of Food* 49(0), pp.143–161.
- Güven, R.G., 2011. Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açıdan Önemli Bazı Enzimleri. , (3), pp.1–10.
- Nadaroglu, H., Adiguzel, A., ve Adiguzel, G., 2014. Purification and characterization of mannanase from *Lactobacillus plantarum* (M24) and its application in some fruit juices, *International Journal of Food Science and Technology*.
- Haki, G., and Rakshit, S., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89(1), pp.17–34.
- Han, Y.M. Oh, B. C., Shin, S., Kim, H. J., Oh, T. K., Kim, Y. O., and Oh, B.H., 1997. Supplemental phytases of microbial and cereal sources improve dietary phytate phosphorus utilization by pigs from weaning through finishing . The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide W. , 75, pp.1017–1025.
- Horikoshi, K., 1999. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), pp.735–750.
- Howard, R.L. Abotsi, E., L, J.V.R.E., and Howard, S., 2003. Lignocellulose biotechnology : issues of bioconversion and enzyme production. , 2(December), pp.602–619.
- Jakob, K., and Kristjansson., 1992. *Thermophilic Bacteria*, London: CRC Press.
- Keiichi, G., Rieko, F., Yuko, k., Mika, A., and Akira, Y., 2004. Reclassification of *Brevibacillus brevis* strain NCIMB 13288 and DSM 6472 as *Aneurinibacillus danicus* sp. nov. and *Brevibacillus limnophilus* sp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 419_427.
- Kemme, P.A.A.W., Jomgloed, Z., Mroz, A.C., and Beynenet., 1999. Digestibility of nutrients in growing–finishing pigs is affected by *Aspergillus niger* phytase,

- phytate and lactic acid levels: 1. Apparent ileal digestibility of amino acids. *Livestock Production Science*, 58(2), pp.107–117.
- Kerovuo, J., 2000. A Novel Phytase from *Bacillus*. Characterization and Production of the Enzyme. Helsinki.
- Kim, D., Godber, J.S., and Kim, H., 1999. Culture conditions for a new phytase-producing fungus. , pp.1077–1081.
- Konietzny, U., and Greiner, R., 1996. Construction of a bioreactor to produce special breakdown products of phytate. *Journal of biotechnology*, 48(1), pp.153–159.
- Kristjansson, M.M., and Asgeirsson, B., 2002. Enzymes, Properties of Extremophilic Technology, and Their Importance in Food Science and J.R. Whitaker, ed., Newyork.
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., and Becker, K., 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*, 120(4), pp.945–959.
- Kumar, S.P. and Mukesh, K., Cost-Effective Endo-Mannanase From *Bcillus* sp. CFR1601 and Its Application In Generation Of Oligosaccharides From Guar Gum and As Detergenr Additive Preparative *Biochemistry and Biotechnology*, 44(4),pp.392-417, 2014.
- Lehninger, A.L., 2005. Lehninger principles of biochemistry.
- Lei, X.G., Porres, J.M., Mullaney, E.J. and Brinch-Pedersen, H., 2007. Phytase: source, structure and application. In: *Industrial Enzymes (Section E)*. , pp.505–529.
- Lineweaver, H., and Burk, D., 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), pp.658–666.
- Liu, B.-L., Jong, C.-H., and Tzeng, Y.-M., 1999. Effect of immobilization on pH and thermal stability of *Aspergillus ficuum* phytase. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(6), pp.517–521.
- Ma, Y., Xue, Y., Dou, Y., Xu, Z., Tao, W., and Zhou, P., 2004. Characterization and gene cloning of a novel β -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. *Extremophiles*, 8(6), pp.447–454.
- Madigan, M.T., Martinco, J.M. and Parker, J., 2000. Procaryotic diversity the Archaea. Brock Biology of Microorganisms P. F. Corey, ed.
- Maruta, M.T., Tanouchi, A., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T., and Shigeoka, S.T., 2010. Arabidopsis chloroplastic ascorbate peroxidase iso enzymes play a dual role in photoprotection and gene regulation under photooxidative stress. *Plant and cell physiology*, 51(2), pp.190–200.
- Mccollum, E.V., and Hart, E.B., 1908. On the occurrence of a phytin-splitting enzyme in animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 4(6), pp.497–500.
- Mckelvie, I.D., Hart, B.T., Cardwell, T.J., and Cattrall, R.W., 1995. Use of immobilized 3-phytase and flow injection for the determination of phosphorus species in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 316(3), pp.277–289.
- Meng, K. Luo, H., Wu, N., and Fan, Y., 2008. Gene Cloning , Expression , and Characterization of a Novel β -Mannanase from CGMCC 1416. , 18, pp.160–166.
- Menten, L. and Michaelis, M.I., 1913. Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem Z*, 49, pp.333–369.
- Mishra, M., Huang, J., and Balasubramanian, M.K., 2014. The yeast actin cytoskeleton. *fems microbiology reviews*, 38(2), pp.213–27.

- Mitchell, R.D., and Edwards, H.M., 1996. Additive effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and phytase on phytate phosphorus utilization and related parameters in broiler chickens. *Poultry science*, 75(1), pp.111–9.
- Moreira, L.R.S., and Filho, E.X.F., 2008. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(2), pp.165–78.
- Nadaroglu, H., Adıgüzel, A., ve Adıgüzel, G., 2014. Purification and characterization of mannanase from *Lactobacillus plantarum* (M24) and its application in some fruit juices, *International Journal of Food Science and Technology*.
- Nadaroglu, H., ve Önem, H., 2014. Preparation and properties of purified phytase from oakbug milkcap (*Lactarius quietus*) immobilised on coated chitosan with iron nano particles and investigation of its usability in food industry, *Journal of Food and Nutrition Research*.
- Nazina, T.N. Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., and Ivanov, M.V., 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzonensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus th.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), pp.433–446.
- Norita, S., Rosfarizan, M., and Ariff, A.B., 2010. Evaluation of the activities of concentrated crude mannan-degrading enzymes produced by *Aspergillus niger*. *Mal J Microbiol*, 6(2), pp.171–180.
- Nurullah, A., *Romanian Biotechnol. Lett.*, 2011, 16(6), 6833-6840
- O'Neill, C., Lopez, A., Esteves, SRR, Hawkes, FR., Hawkes, DL., and Wilcox, SJ., 2000. Azo-Dye Degradation in An Anaerobic-Aerobic Treatment System Operating on Simulated Textile Effluents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53 ,249-
- Özler, A., 2009. malatya kayisisindan (*prunus armeniaca* l.) pektinesteraz enziminin saflastirilmasi ve karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi.
- Pan, X., Zhou, J., Tian, A., Le, K., Yuan, H., Xue, Y., and Lu, H., 2011. High level expression of a truncated β -mannanase from *alkaliphilic Bacillus* sp. N16-5 in *Kluyveromyces cicerisporus*. *Biotechnology letters*, 33(3), pp.565–70.
- Panda, A.K., Bisht, S.S., DeMondal, S., Senthil Kumar, N., Gurusubramanian, G., and Panigrahi., 2014. *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(4), pp.623–39.
- Powar, V.K., and Jagannathan, V., 1982. Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 151(3), pp.1102–8.
- Riaz, S., Ahmed, S., and Jamil, A., (2009) Molecular cloning of fungal xylanase: an overview. *ApplMicrobiol Biotechnol* 84:19–35.
- Rojas, S.W., and Scott, M.L., 1969. Factors Affecting the Nutritive Value of Cottonseed Meal As a Protein Source in Chick Diets. *Poultry Science* , 48 (3), pp.819–835.
- Sarıbuga, E., Dikbas, N., Nadaroglu, H., ve Senol, M., 2014a. Partial Purification, Characterization of Phytase Enzyme from *Lactobacillus acidophilus* Bacteria and Determination of Its Some Kinetic Properties *Journal of Pure and Applied Microbiology* 8, 91-96.
- Sarıbuga, E., Nadaroglu, H., Dikbas, N., ve Senol, M., Cetin, B., 2014b. Partial Purification, Characterization of Phytase Enzyme from *Lactobacillus plantarum*

- bacteria and Determination of Its Some Kinetic Properties African Journal of Biotechnology 13 (23) 2373-2378.
- Schnell, S., 2014. Validity of the Michaelis–Menten equation–steady state or reactant stationary assumption: that is the question. FEBS Journal, 281(2), pp.464–72.
- Schroder, R., Atkinson, R.G., and Redgwell, R.J., 2009. Re-interpreting the role of endo- β -mannanases as mannan endotransglycosylase hydrolases in the plant cell wall. Annals of botany, 104(2), pp.197–204.
- Selle, P.H., and Ravindran, V., 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. Animal Feed Science and Technology, 135(1-2), pp.1–41.
- Shallom, D., and Shoham, Y., 2003. Microbial hemicellulases. Current Opinion in Microbiology, 6(3), pp.219–228.
- Sharma, M.C., 2013. Pharmacophore and QSAR modeling of some structurally diverse azaaurones derivatives as anti-malarial activity. Medicinal Chemistry Research, 23(1), pp.181–198.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Udaka, S., Nakamura, K.L., and Komagata, K., 1995. Proposal of *Bacillus reuszeri* sp. nov., *Bacillus formosus* sp. nov., nom. rev. and *Bacillus borstelensis* sp. nov., nom. rev. Int J Syst Bacteriol 45(1): 93–100
- Shida, O., Omagata, K., Takagi, H., and Kadowaki, K., 1996. Proposal for Two New Genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 46(4), pp.939–946.
- Shimizu, M., 1992. purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. , 58(8), pp.1266–1269.
- Shin, S. Ha, N., Oh, B., and Oh, T., 2001. Enzyme mechanism and catalytic property of β -propeller phytase. Structure, 9(9), pp.851–8.
- Singh, G., Bhalla, A., and Hoondal, G.S., 2010. solid state fermentation and characterization of partially purified thermostable mannanase from *Bacillus* sp. MG-33. BioResources, 5(3), pp.1689–1701.
- Suzuki, U., Yoshimura, K., and Takaishi, M., 1907. Uber ein Enzym “Phytase” das Anhydro-oxy-methylendiphosphosaure spaltet. , pp.503–505.
- Tambe, S.M. Kaklij, G. S., Kelkar, S. M., and 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(1), pp.23–27.
- Turgut, K., 2009. Sakaraya bölgesinde yetişen deve dikenini (*Silybum marianum*) bitkisinden peroksidaz enziminin karakterizasyonu. Sakarya Üniversitesi.
- Ullah, A.H.J., 1988. *Aspergillus ficuum* phytase: partial primary structure, substrate selectivity, and kinetic characterization. Preparative biochemistry, 18(4), pp.459–471.
- Viveros, Centeno, C., Brenes, A., Canales, R., and Lozano, A., 2000. Phytase and acid phosphatase activities in plant feedstuffs. Journal of agricultural and food chemistry, 48(9), pp.4009–13.
- Yan, Q., Wu, A., Jiang, Z., Tang, L., and Bo, S., 2009. Enhanced production of a thermostable mannanase by immobilized cells of *Bacillus subtilis* on various membranes. World J Microbial Biotechnol. 25:1057-1063.

- Yan, X., Song, H.-T., Ma, and L.-X., 2008. Generating High-Current Monoenergetic Proton Beams by a Circularly Polarized Laser Pulse in the Phase-Stable Acceleration Regime. *Physical Review Letters*, 100(13), p.135003.
- Yang, X.-S. Jiang, Z.-B., Song, H.-T., Jiang, S.-J., Madzak, C., Ma, and L.-X., 2009. Cell-surface display of the active mannanase in *Yarrowia lipolytica* with a novel surface-display system. *Biotechnology and applied biochemistry*, 54(3), pp.171–6.
- Yanke, L., Selinger, L., and Cheng, K., 1999. Phytase activity of *Selenomonas ruminantium*: a preliminary characterization. *Letters in applied* 29(1), pp.20–25.
- Yener, F., 2007. pektinaz enziminin farkli iki destek üzerine immobilizasyonu ve karakterizasyonu. çukurova üniversitesi.
- Zinin, N. V., Serkina, A. V., Gelfand, M. S., Shevelev, A. B., and Sineoky, S.P., 2004. Gene cloning, expression and characterization of novel phytase from *Obesumbacterium proteus*. *FEMS microbiology letters*, 236(2), pp.283–90.
- Van Zyl, W.H., Rose, S. H., Trollope, K., and Görgens, J. F., 2010. Fungal β -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. *Process Biochemistry*, 45(8), pp.1203–1213.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında İran'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İran'da tamamladı. 2006 yılında Islamic Azad Bonab Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda lisans öğrenimine başladı ve 2010 yılında bitirdi. 2012 yılında, Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.