

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

TERMOFİLİK *BACILLUS LICHENIFORMIS* BAKTERİSİNDEN
FİTAZ ENZİM ÜRETİMİ

Serap ŞABAHAT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Cem ÖZİÇ

Tmmuz / 2019
KARS



T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI



TERMOFİLİK *BACILLUS LICHENIFORMIS* BAKTERİSİNDEN
FİTAZ ENZİM ÜRETİMİ

Serap ŞABAHAT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN




Dr. Öğr. Üyesi Cem ÖZİÇ

Temmuz / 2019

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı öğrencisi Serap ŞABAHAT'ın Dr. Öğr. Üyesi Cem ÖZİÇ danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı “TERMOFİLİK *BACILLUS LICHENIFORMIS* BAKTERİSİNDEN FİTAZ ENZİM ÜRETİMİ” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek **oy birliği** ile kabul edilmiştir.

05/07/2019

	Adı ve soyadı	İmza
Başkan	: Dr. Öğr. Üyesi Cem ÖZİÇ	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Evren KOÇ	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Abdülmelik ARAS	

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../20... gün ve
.../..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Fikret AKDENİZ
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Serap ŞABAHAT

2019

ÖZET

TERMOFİLİK BACILLUS LICHENIFORMIS' DEN FITAZ ENZİM ÜRETİMİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Serap ŞABAHAT

Kafkas Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Cem ÖZİÇ

Bacillus Licheniformis' lerin yaşam alanlarından olan sıcak su kaynaklarından elde edilen fitazın termofilik olarak üretilmesi ve ticari kullanılabilirliği hedeflenmiştir. Öncelikle termofilik bakteriler ortamdan izole edilerek, çeşitli karakteristik özellikleri belirlenmiştir. 16s rDNA bölgeleri PCR ile DNA'lardan izole edilmiş ve sekansları yapılmıştır. Biyoinformatik analiz yöntemleri ile fitaz enzimini ifade eden gen bölgeleri belirlenmiştir. Affinite kromatografik tekniklerinde biri olan Nikel affinitesi ile rekombinant proteinler saflaştırılmıştır. *Bacillus Licheniformis* ait fitazın, *E.coli*'de klonlanması sağlanmış ve rekombinant olarak üretilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus Licheniformis*, Termofilik organizma, Fitaz

2019, 54 Sayfa

ABSTRACT

PRODUCTION OF FİTASE ENZYME FROM THERMOPHILIC BACILLUS
LYCHENIFORMIS BACTERIA
(M.Sc. Thesis)

Serap ŞABAHAT

Kafkas University

Graduate School of Applied and Natural Sciences

Department of Bioengineering

Supervisor: Assistant profesor Cem ÖZİÇ

Thermophilic production and commercial usability of the phytase obtained from the hot water springs of the habitats of *Bacillus Licheniformis* are aimed. First, thermophilic bacteria were isolated from the medium and various characteristics were determined. 16s rDNA regions were isolated from DNAs by PCR and sequenced. Gene regions expressing phytase enzyme were determined by bioinformatics analysis methods. Recombinant proteins were purified by Nickel affinity, one of affinity chromatography techniques. The phytase of *Bacillus Licheniformis* was cloned in *E. coli* and produced recombinantly.

Key Words: *Bacillus Licheniformis*, Thermophilic organism, Fitase

2019, 54 pages

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunulan bu çalışma Kafkas Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Biyomühendislik Anabilim Dalında Dr. Öğr. Üyesi Cem ÖZİÇ danışmanlığında hazırlanmıştır.

Bu tez çalışmasında bana her konuda yardımcı olan, yol gösteren, bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen ve benim için büyük emek sarf eden danışman Hocam Sayın Dr.Öğr.Üyesi Cem ÖZİÇ' e sonsuz teşekkürlerimi arz ederim. Ayrıca çalışmamın her aşamasında manevi desteğini esirgemeyen Sayın Hocam Dr.Öğr.Üyesi Evren KOÇ' a teşekkürlerimi sunarım. Hayatımın her aşamasında benden maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, varlıkları ile bana güç veren, her konuda yardımcı olup yol gösteren değerli Eşim ve Kızıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İmza

Serap ŞABAHAT

İÇİNDEKİLER

ÖZET	II
ABSTRACT	III
ÖNSÖZ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
1.1. Ekstrem Mikroorganizmalar	3
1.2. Termofilik Mikroorganizmalar ve Endüstride Kullanımı	4
1.2.1. Basillus ve Basillus licheniformis	6
1.3. Termostabil Enzimler ve Endüstride Kullanımı	10
1.3.1. Proteazlar.....	12
1.3.2. Amilazlar.....	12
1.3.3. Lipazlar	12
1.3.4. Fitaz.....	13
MATERYAL ve YÖNTEM	23
2.1. Materyal	23
2.1.1. Organizma	23
2.1.2. Cihazlar	23
2.1.3. Kimyasallar ve Çözeltiler.....	24
2.2. Yöntem.....	25
2.2.1. Organizmanın Kültüre Edilmesi	25
2.2.2. Bacillus licheniformis gDNA İzolasyonu	25
2.2.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	26
2.2.4. Rekombinant Enzimin Üretilmesi.....	26
3. BULGULAR	28
4. TARTIŞMA	31
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	34
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 kromozomunun halkasal yapısını gösterilmesi [25].....	8
Şekil 1.2. Fitik asitin fitaz enzimi katalizörlüğünde inorganik monofosfat, myo-inositol fosfat ve serbest myo-inositole hidrolizi [7].	13
Şekil 1.3. Fitik asidin 3-fitaz ve 6-fitaz ile hidrolize edilmesi [7].	14
Şekil 1.4. Fitik asidin moleküler yapısı ve fitik asit metal kompleksi [46].	17
Şekil 1.5. Fitazın mineraller ile kompleks oluşturması.	20
Şekil 1.6. Fitazın, fitata bağlı fosfat grupları hidrolizi.....	21
Şekil 2. 1: Örneklerin inkübe edilmesine ait etüv içi görüntü.	25
Şekil 3.1 PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü.....	28
Şekil 3.2 Fitaz geninin PCR sonucunun elektroforez jel görüntüsü.	29
Şekil 3.3. PGEMTeasy vektörün de restriksiyon enzimi ile kesilmiş Fitaz geninin jel görüntüsü. M: Lambda Marker	29
Şekil 3. 4: Ni-NTA ile saflaştırılan fitaz enzimi SDS jel görüntüsü.	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1.1. Ekstrem mikroorganizmaların geliştikleri ortam ve mikroorganizma türleri gösterilmiştir .	4
Tablo 1.2. <i>B. licheniformis</i> 'in <i>B. subtilis</i> , <i>B. halodurans</i> , <i>B. cereus</i> ve <i>B. anthracis</i> 'e kıyasla genel genomik özellikleri	8
Tablo 1.3. Endüstride yaygın olarak kullanılan ekstrem mikroorganizmalardan izole edilen enzimler ve uygulama alanları	11
Tablo 1.4. Farklı kaynaklardan elde edilen fitazın genel özellikleri	16
Tablo 2.1. PZR Reaksiyon Koşulları	26
Tablo 2.2. PZR sıcaklık ve Döngü Koşulları	26

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltma	Açıklama
%	: Yüzde
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
ATP	: Adenozin trifosfat
Ba^{2+}	: Baryum
bç.	: Baz çifti
BHİ	: Brain heart infusion
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BPPHy	: β -Propellar fitazı
Ca	:Kalsiyum
Cd^{2+}	: Kadmiyum
CP	: Sistidin fosfataz
Cu^{2+}	: Bakır
dev	: Devir
dH ₂ O	: Distile su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonikleik asit
DTT	: 1,4- Dithiothreitol
EB	: Etidyum bromür
EC	: Enzim kodu
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit km
gDNA	: Genomik DNA
gr	: Gram
H ₂ O	: Su
HAP	: Histidin asit fosfataz
His	: Histidin
IPTG	: İzopropil- beta- D- thiogalaktopiranosit
K	: Potasyum
kDa	: Kilodalton

L	: Litre
LB	: Luria bertani
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
Mn	: Mangan
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum klorür
NB	: Nutrient Agar
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat Derece
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PAP	: Purple asit fosfata
pH	: H ⁺ iyonu konsantrasyonu
PMSF	: Fenil metil sülfonil florür
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	: Revolutions Per Minute
rRNA	: Ribozomal RNA
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sn.	: Saniye
<i>sp.</i>	: Tür
TBST	: Tris Buffered Saline Tween
TEMED	: N,N,N',N'- Tetrametiletildiamin
tRNA	: Taşıyıcı RNA
UV	: Ultraviolet
V	: Volt
α	: Alfa
β	: Beta

GİRİŞ

Dünya genelinde endüstriyel alanındaki yatırımlar, gelişen teknoloji ve artan nüfus nedeniyle giderek artmaktadır. Dünyada ve ülkemizde son yüzyılda hızla artan sanayileşme sürecinde gıda, kimya, tekstil gibi sanayi dalları ön plana çıkmaktadır. Sanayinin gelişmesi ve ilerlemesinin yanı sıra beraberinde getirdiği oluşan zararlı yan ürünlerin ve atıkların uzaklaştırılması için yeni nesil çalışmalar yapılmaktadır [1]. Bu amaçla dezavantajların daha azaltılması için endüstriyel enzimler çalışmak birçok yönden dikkat çekmektedir.

Enzimler hücre içerisindeki bir seri biyokimyasal tepkimeyi katalizleyen karmaşık protein yapıdaki moleküllerdir. Günlük hayatımızda metabolik reaksiyonlarda önemli işlevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Dolayısıyla sanayide de birçok alanda kullanılmaktadır. Her enzim için bir optimum pH ve sıcaklık vardır. Bu optimum değerler dışında enzimin aktivitesi düşer veya tamamen aktivitesini kaybeder [1].

Enzimatik işlemlerin yapıldığı endüstrilerde, diğer yöntemlere göre zararlı yan ürün ve atık madde oluşturması daha düşüktür. Böylelikle çevre kirliliğine yol açmayarak daha uygun ve ekonomik şartlarda işlemler gerçekleşir. Endüstride kullanılan enzimlerin büyük çoğunluğu mikroorganizmalardan izole edilen enzimlerdir [2]. Çok azı bitkisel ve hayvansal kaynaklıdır. Enzim kaynağında mikroorganizmaların daha fazla kullanılmasının nedeni az yan ürün, ekonomik, yüksek aktivite ve stabil olmalarıdır [3]. Endüstride kullanılan enzimlerin büyük çoğunluğunu proteazlar (%59) oluştururken %28'lik kısmını karbonhidrazlar, %3'lük kısmını lipazlar ve kalan kısmını ise diğer enzimler oluşturur. Mikroorganizmaların yaşam alanları özel çevrelerle sınırlı değildir. Bu canlıların yüksek sıcaklık, yüksek tuz oranı, asidik ve alkali pH ve yüksek basınç gibi ekstrem koşullarda da yaşayabildikleri ortaya konulmuştur. Ekstrem organizmalar ekstrem koşullarda yaşamaya adapte olmuşlardır[4]. Ekstremofil canlılar yaşayabildikleri koşullara göre farklı şekilde isimlendirilirler. Endüstriyel açıdan büyük önemi olan ekstremozimler içinde en yaygın olarak kullanılanı termostabil enzimlerdir. Bu enzimler protein stabilitesi için modeldir ve yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterdiklerinden biyoteknolojik işlemlerde birçok avantaja sahiptirler [5].

Biyoteknoloji alanında birçok termofilik basillus üyeleri bulunmaktadır. Bacilluslar, aerob veya fakültatif anaerob bölünen ve endospor oluşturan *Bacillaceae* ailesi üyeleridir [6]. Bacillus suşları ürettikleri enzimleri hücre dışına salgılama yeteneğinde olduklarından endüstriyel enzim üretiminde en çok kullanılan bakteri konumundadırlar. Özellikle 50-70 °C aralığında aktivite gösteren *Bacillus clostridium*, *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus thermophilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* endüstriyel alanda önemli mikroorganizmalardır.

Fitaz; inorganik monofosfat, myo-inositol fosfat ve serbest myo-inositol ürünlerini, fitik asiti, hidrolize ederek elde eden enzimdir [7, 8]. Fitaz enzimi doğada birçok kaynaktan izole edilebilir. Fitaz enzimi izole edildiği kaynağa göre sınıflandırılır ve bu sınıflandırma bitkisel kaynaklı, hayvansal kaynaklı ve mikroorganizma kaynaklı fitaz şeklindedir. Fitaz enzimi, yem, gıda, kağıt, toprak zenginleştirme gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır [9].

Fitaz enzimi birçok kaynaktan izole edilir, ancak endüstride en yaygın olarak kullanılan mikroorganizma kaynaklı fitazdır. Fitaz enziminin birçok işlevleri bulunmaktadır. Ekstrasellüler fitaz enzimi, *Bacillus licheniformis* PFBL-03'ten % 10 verimle ve 39 kat saf biçimde elde edilmiştir [10]. *Bacillus licheniformis*'ten üretilen fitazın pH 6.0-8.0 ve 55 °C sıcaklıkta optimize olduğu belirlenmiştir [11]. Bununla birlikte ayrıca, fitaz enzim aktivitesine Cd^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} ve Ba^{2+} katyonlarının ve EDTA'nın etkisinin olduğu gösterilmiştir [11].

GENEL BİLGİLER

1.1. Ekstrem Mikroorganizmalar

Ekstremofiller, genellikle tek hücreli canlılardır ve ekstrem koşullarda yaşayabilen ve bu şartlarda optimum olarak gelişen ve çoğalan mikroorganizmalardır. Bu organizmalar, dünya yüzeyinin 3 km altında, yüksek ağır metal içeren bölgelerde, nükleer reaktörlerde, hidrotermal ventlerde, tuz kristallerinde, asitli kaynaklarda, buzullarda, yoğun basınçlı alanlarda ve aerobik olmayan koşullarda gelişebilen canlılardır. Ekstrem mikroorganizmaların yaşadığı zor şartlar, sıcaklık, basınç, radyasyon, oksijen durumu, pH, tuzluluk, kuruluk gibi fiziksel ve jeokimyasal şekilde sıralanabilir. Bu mikroorganizmalar, aşırı ekstrem alanlarda kolaylıkla yaşayabilmektedirler [12].

Yukarıda bahsedilen ekstrem şartlarda yaşayabilen ve moleküler olarak adapte olmuş bu mikroorganizmalar endüstriyel açıdan birçok farklı proseste kullanılabilirler. Yüksek sıcaklık ve basınç altında çeşitli reaksiyonları gerçekleştirdikleri için endüstride kullanılabilirlikleri belirlenmiştir. Bu koşullarda kullanılabilen fazla avantajlarının olmasına rağmen kimyasal işlemlerde (pH, sıcaklık ve iyon konsantrasyonu) kullanımları sınırlıdır. Ancak ekstrem mikroorganizmalardan izole edilen enzimler (ekstremozimler) zor koşullara dayanıklıdır. Dolayısıyla, ekstremozimler son zamanlarda biyoteknolojik uygulamalarda, diğer biyomühendislik alanlarında model enzim molekülleri olarak kullanılmaktadır [12, 13].

Ekstremofil mikroorganizmalar içinde buldukları ve yaşayabildikleri fiziksel ve kimyasal koşullara göre farklı adlarla isimlendirilirler. Bu isimlendirme şu şekildedir;

- Termofiller: Aşırı sıcak olan koşullarda yaşayan mikroorganizmalar (60-80 °C arasında)
- Hipertermofiller: 80°C' nin üzerinde yaşayabilen mikroorganizmalar (80-113 °C)
- Psikrofiller: 5 °C' nin altında yaşayabilen mikroorganizmalar
- Alkalifiller: Aşırı bazik ortamda yaşayabilen mikroorganizmalar (pH 9'den büyük)

- Asidofiller: Aşırı asidik ortamda yaşayabilen mikroorganizmalar (pH 4'den küçük)
- Halofiller: Aşırı tuzlu ortamda yaşayabilen mikroorganizmalar

Ekstrem mikroorganizmaların geliştikleri ortam ve bu alt ekstrem türlere örnek Tablo 1.1'de gösterilmiştir.

Tablo 1.1. Ekstrem mikroorganizmaların geliştikleri ortam ve mikroorganizma türleri gösterilmiştir [14].

Fenotip çeşidi	Aktivasyon Sıcaklığı (°C)	Örnek mikroorganizma
Termofilik	55-80	<i>Methanobacterium</i> , <i>Thermoplasma</i> , <i>Thermus</i> ve bazı <i>Bacillus</i> türleri
Hipertermofilik	80-113	<i>Aquifex</i> , <i>Archaeoglobus</i> , <i>Hydrogenobacter</i> , <i>Methanothermus</i> , <i>Pyrococcus</i> , <i>Pyrodictium</i> , <i>Pyrolobus</i> , <i>Sulfolobus</i> , <i>Thermococcus</i> , <i>Thermoproteus</i> , <i>Thermotoga</i>
Psikrofilik	-2-20	<i>Alteromonas</i> , <i>Psychrobacter</i>
Halofilik	2- 5 M NaCl	<i>Haloarcula</i> , <i>Halobacterium</i> , <i>Haloferax</i> , <i>Halorurum</i>
Asidofilik	pH<4	<i>Acidianus</i> , <i>desulfurolobus</i> , <i>Sulfolobus</i> , <i>Thiobacillus</i>
Alkafilik	pH>9	<i>Natronobacterium</i> , <i>Natronococcus</i> ve bazı <i>Bacillus</i> türleri

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda ekstremofil ve hipertermofil organizmaları, polisakkarit sindirilmesinde önemli rolleri olan selülaz, lipaz, esteraz, amilaz ve fitaz gibi parçalayıcı enzimlerin karakterizasyonu ile endüstriyel alanda önemli olanaklara yol açmışlardır.

1.2. Termofilik Mikroorganizmalar ve Endüstride Kullanımı

Termofilik mikroorganizmalar son yıllarda birçok araştırmacının dikkatini çeken ekstrem mikroorganizma grubundandır. Termofilik mikroorganizmaların enzimatik yapısı üzerinde birçok araştırmalar yapılmış ve bu organizmaların diğer

mikroorganizmalar ile karşılaştırılınca üreme hızlarının ve kararlılığının yüksek olması, son ürünün kolaylığı ve polimerlerden doğrudan fermente edilmesi gibi birçok avantaja sahiptir [15]. Termofilik mikroorganizmalar genellikle 55 °C'nin üzerinde aktivasyon gösteren organizmalardır. Ancak bazı araştırmacılar termofil grubunu kendi içinde alt gruplara ayırmışlardır [16]. 60-80 °C aralığında aktivasyon gösteren ve çoğalan termofiller için ekstremofil, 80 °C'nin üzerinde aktivasyon gösteren ve çoğalan termofiller için ise hipertermofil tanımlanması yapılmıştır. Bu termofilik grupların karakteristik özelliği 40 °C'nin altında aktivasyon gösterememeleridir [16, 17]. Ayrıca bu enzimler, deterjanlara, organik çözücülere ve proteazların etkilerine karşı dirençlidirler [17].

Bununla beraber, termofilik mikroorganizmaların yüksek sıcaklığa karşı dayanıklılık mekanizması şu şekilde açıklanmıştır. Termofilik mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklardaki ortamlarda yaşayıp çoğalabilmeleri için hücreyi dayanıklı hale getirmeleri gereklidir. Termofillerin hücre membranı doymuş yağ asitleri içerir ve bu yağ asitleri hücrede hidrofobik alan yaratarak kararlılık sağlar [18]. Termofilik canlılar, revers giraz enzimi içerir ve bu DNA'nın erime noktasını yükselterek yüksek sıcaklıklara dayaklı duruma getirir [12, 19]. Bu mikroorganizmalar diğer bilinen mikroorganizmalara kıyasla hücresel bileşenleri, enzim ve protein içerikleri daha termostabildir. Bu termostabiliteğin yanı sıra kimyasal maddelerde de oldukça dayanıklıdır ve endüstriyel uygulamalarda sıklıkla kullanılan türlerdir.

Termofilik mikroorganizmalar diğer organizmalara kıyasla metabolizma hızları, hızlı gelişme ve yüksek stabilite özellikleri ile üstünlük sağlamaktadırlar. Gelişme ve büyüme sıcaklıklarının yüksek olmasından dolayı substrat viskozitesi azalmaktadır. Dolayısıyla fermantasyonda karıştırma aktivasyonu ve katı-sıvı ayrımı hızlanmaktadır. Dahası, ısıtma işlemi soğutma işlemine göre daha kolay ve ucuz olduğundan ekstrem termofillerin üretimi diğer organizmalara göre daha ucuz ve kolay olacağı kaçınılmazdır [20, 21]. Ayrıca, yüksek sıcaklıkta büyüyen ve aktivasyon gösteren bu organizmaların çoğalması ve verimliliğinin artması yüksek sıcaklık gerektiğinden kontaminasyon riski düşük sıcaklıkta aktivasyon gösteren mikroorganizmalara göre çok daha azdır. Yüksek sıcaklık, ürünün geri alınması ve buharlaşabilen organik bileşiklerin kolay bir şekilde ortamdaki uzaklaştırmayı sağlayacaktır. Bununla beraber, yüksek sıcaklıkta besiyeri

içerisindeki oksijen miktarı azalacağından anaerobik ortam olması kolaylaşacaktır [21]. Ek olarak, ekstrem mikroorganizmaların patojenik özelliklere sahip olmamaları bu termofillerin diğer bir avantajıdır. Böylelikle bu ekstrem termofiller ile çalışmak kolay ve sağlık açısından daha az riskli olacaktır. Öte yandan, termofilik enzimler oda koşullarında etkinliklerini ve kararlılıklarını kaybetmediklerinden diğer enzimler ile olan çalışmalara göre soğuk odalara ihtiyaçları yoktur [21].

Endospor oluşturan ekstreterm termofillerin endüstride farklı enzimlerin üretilebildiği yıllardır bilinmektedir ve yaygın bir şekilde bu organizmalar kullanılmaktadır. Bu enzimlerden en çok kullanılan ve önemli olanı termostabil proteazlarıdır. Örneğin; *Bacillus thermoproteolyticus* suşundan elde edilen proteaz 70 °C'de ve 30 saatte etkinliğinin yalnızca küçük bir kısmını kaybettiği (%14) bildirilmiştir. Ama bu bakteriye hiçbir kültür ortamında rastlanılamamaktadır.

Endüstriyel alanda kullanılan bazı termofilik basillus üyeleri mevcuttur. Özellikle 50-70 °C aralığında aktivite gösteren *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus thermophilus*, *Bacillus clostridium* endüstriyel alanda önemli mikroorganizmalardır.

1.2.1. Bacillus ve Bacillus licheniformis

Bacillus suşları, çomak şeklinde, aerob koşullarda bölünebilme özelliğe sahip, Bacillaceae ailesinde endospor oluşturan bakterilerdir[6]. ürettikleri enzimleri hücre dışına salgılama yeteneklerinden ötürü Bacillus suşları endüstriyel enzim üretiminde en çok tercih edilen bakterilerdir. Endospor oluşturmaları ve non patojenlikleri Bacillusların tercih edilmesinin diğer nedenleridir. Her ortamdan ve kaynaktan izole dileyebilirler. Bu türlerin yaşam alanları toprak, bitki döküntüleri, buzullar, sıcak su kaynakları, deniz suyu, tatlı su ve çöllerdir [22].

Bacilluslarda elde edilen enzimler enzim piyasasının yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Tıbbi, eczacılık ve tarım alanlarında *Bacillus spp.*'den elde edilen metabolitlerden çeşitli antibiyotikler elde edilmektedir [23].

Bacillus licheniformis, *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus subtilis* gibi türler endüstride kullanılan en yaygın basillus türlerdir. Bunlar içinde *B. licheniformis* enzim üretiminde büyük ölçekli endüstriyel kullanıma sahiptir [24].

B. Licheniformis'in filogenisi aşağıdaki gibidir.

Domain: Bakteri

Şube: Firmicutes

Sınıf: Bacilli

Takım: Bacillales

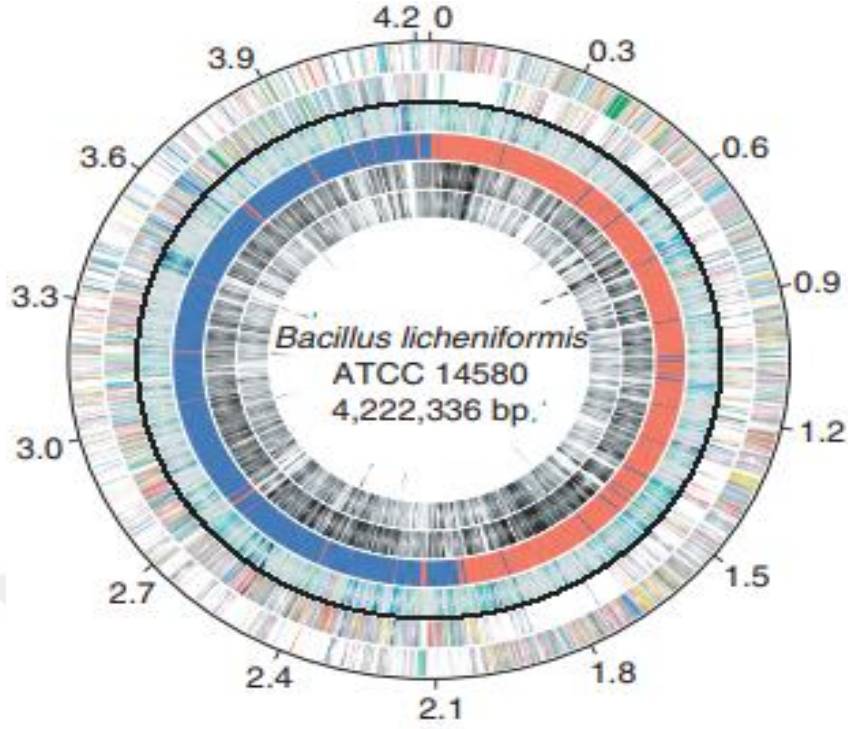
Familiya: Bacillaceae

Cins: Bacillus

Tür: *Bacillus licheniformis*

1.2.1.1. Bacillus licheniformis'in Genomik Yapısı

Bacillus licheniformis 4222336 nükleotid uzunluğunda halkasal kromzoma sahip bir basillus türüdür. Ayrıca *Bacillus licheniformis* 4208 protein kodlayan gen, 7 rRNA operonu ve 72 tRNA geni içermektedir. *Bacillus licheniformis*'in kromozomu *Bacillus subtilis* ve *Bacillus halodurans* kromozomlarına geniş ölçüde benzerlik içeren bölgelere sahiptir. Dahası, *B. licheniformis*' in kodlama sekansının yaklaşık %80'i *B. subtilis* ortologlarını içerdiğinden, *subtilis* grubunun bir parçası olarak düşünülür. Ancak, *B. subtilis*'e benzer olsa da, profajların, transpoze edilebilir elementlerin, hücre dışı enzimlerin ve sekonder metabolik yol operonlarının miktarı ve yerleri açısından farklılık gösterirler[25].



Şekil 1.1 *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 kromozomunun halkasal yapısını gösterilmesi [25].

Tablo 1.2. *B. licheniformis*'in *B. subtilis*, *B. halodurans*, *B. cereus* ve *B. anthracis*'e kıyasla genel genomik özellikleri [6].

Özellik	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. halodurans</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. anthracis</i>			
	Kromzom	Kromzom	Kromzom	Kromzom	pBc10987	Kromzom	pXO1	pXO2
Boyut, nt	4222748	4214810	4202353	5224283	208369	5227293	181677	94829
Gen sayısı	4286	4112	4066	5642	242	5508	217	113
% kodlanan bölge	87,9	87	85	85	80,9	84,3	77,1	76,2
% G+C	46,2	43,5	43,7	35,6	33,5	35,4	32,5	33,0
rRNA operonları	7	10	8	12	0	11	0	0
tRNA genleri	72	86	78	98	0	95	0	0

1.2.1.2. Bacillus licheniformis'in Hücrenin yapısı ve metabolizması

Bacillus licheniformis, çubuk şekilli, Gram pozitif bir bakteridir. Topraklarda sporlar oluşturmaya meyilli olan bu enzimler, enzimlerin, antibiyotiklerin ve küçük metabolitlerin üretimi gibi endüstriyel amaçlarla kullanılmasını daha çok isterler. Bu bakteriler, doğada besin maddelerinin döngüsü ile bağlantılı çeşitli hücre dışı enzimler üretirler. Optimum büyüme sıcaklığı 50°C'dir, ancak daha yüksek sıcaklıklarda bile hayatta kalabilirler. Fakat, enzim salgılaması için en uygun sıcaklık 37 °C'dir. Bu bakteri, spor formuna dönüşerek sert ortamlardan kurtulabilir; koşullar iyi olduğunda, vejetatif bir duruma tekrar döner. B. licheniformis, yüksek pH seviyelerinde hayatta kalabilen bir proteaz üretir. Bu proteaz çamaşır deterjanı içinde, düşük sıcaklıklarda kullanılabilme özelliği nedeniyle, büzülme ve renklerin solmasını engelleyen bir bileşendir [6].

1.2.1.3. Bacillus licheniformis'in Ekolojisi

Bacillus licheniformis toprakta spor yapar. Bakteri aç olduğu zaman endospor oluşumu başlar. Bu sporlar, ısı, soğuk, radyasyon ve diğer çevresel streslere oldukça toleranslıdır. İyi koşullar altında sporlar oluşur ve vejetatif hücreler üretir. *B. licheniformis*, doğadaki besin maddelerinin siklizasyonu ile bağlantılı çeşitli hücre dışı enzimler üretir. Doğada bitki ve bitki materyalleri ile çoğunlukla bağlantılı olan apathojenik bir toprak organizmasıdır. Bu bakteriyi topraktan izole etmek en yaygın yol olmasına rağmen, *B. licheniformis* 'in neredeyse her yerden izole edilebileceğine inanılmaktadır; çünkü toza dönüşen oldukça dirençli endosporlar üretmektedirler.

Öte yandan, *B. licheniformis*'in insanlarda gıda zehirlenmesine neden olduğu bilinmektedir; özellikle çiğ süt, sebze, işlenmiş bebek gıdaları ve pişmiş etler gibi besinlerde bulaşma oranlarının yüksek olduğu ürünlerdir.

1.2.1.4. Bacillus licheniformis'in Patolojisi

Bacillus licheniformis, yaygın olarak gıda bozulması ve zehirlenme ile ilişkilidir. Daha çok ekmek bozulmalarında karşımıza çıkar. Bu bakteri ile kontaminasyon olan ekmek yapışkan ve lifli bir duruma gelecektir ve sonrasında keskin bir kokuya sahip olacaktır.

Bozulmanın nedeni rope sporlarıdır, ne yazık ki bu sporlar fırınlama işlemi sırasında ölmezler. Bunun yanı sıra, Süt ürünlerinin, *B. licheniformis*'in toksin üreten izolatları ile kontamine olma riski yüksektir. Pişmiş etler, çiğ süt, sebze ve işlenmiş bebek gıdaları da bu risk altındadır[26].

B. licheniformis, gıda kaynaklı gastro-enterite, yani bağırsakta enfeksiyondan ötürü septisemi adı verilen hayati tehlike oluşturan bir duruma neden olabilir. Septisemi kan zehirlenmesi olup, kanda yüksek miktarda bakteri bulunan bir durumdur. Semptomlar, mide ağrıları, (akut) ishal ve muhtemel kusmayı içerir. Bunların başlangıç zamanı 2-14 saat ve son 36 saattir.

B. licheniformis, bağırsak ve gastrointestinal sistemle ilişkili olmasına rağmen vücudun diğer bölümlerinde sıkıntıya neden olabilir. Göz iltihabı olan oftalmosiye neden olabilir. Hatta hamilelerde düşüğe neden olabilir ve erkeklerde sperm hareketliliğini zayıflatabilir. *B. licheniformis* tarafından üretilen toksinler hücre zarlarına zarar verebilir, hücre ATP'yi tüketebilir ve akrozomun şişmesine neden olabilir; fakat mitokondride herhangi bir zararlı etkisinin olmadığı bulunmuştur[26].

1.3. Termostabil Enzimler ve Endüstride Kullanımı

Enzimler insan hayatında, gıda, giyim, hastalıkların teşhis ve tedavisinde olmak üzere çok yüksek yelpazede kullanım alanı mevcuttur [5]. Endüstrinin birçok farklı alanında kullanılan enzimler çoğunlukla mikroorganizmalarda elde edilen enzimlerdir. Bunun nedeni ise, mikroorganizmalardan izole edilen enzimler diğer kaynaklara göre daha az maliyetli, verimliliği yüksek ve daha kararlı bir yapıdadırlar [5]. Ekstremozimler içerisinde biyoteknolojik açıdan en önemli enzimler termostabil enzimlerdir ve stabilitede model olarak kullanılır [5]. Bunun yanı sıra, ekstremofilik enzimlerin endüstriyel alanda kullanılması yüksek sıcaklık gerektirdiğinden diğer bakteriler ve viral kaynaklı mikroorganizmaların kontaminasyonunu azaltır [27]. Ayrıca termostabil proteinler tuz konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve kuruluk gibi ortamlara karşı yüksek dayanıklılık gösterirler. Öte yandan bu mikroorganizmaların düşük sıcaklıklarda aktivasyon gösteren mezofilik organizmalara göre proteinlerinin daha fazla alfa heliks ve beta tabakası içerdiği görülmüştür [27]. Bununla beraber, bu organizmalardan

sentezlenen şaperonin proteinleri denatüre proteinlerin katlanmasına aracılık ederler ve natürel formlarını almalarına ve işlevlerini tekrar kazanmalarına yardımcı olurlar.

Termostabil proteinlerin sıcaklığa dayanıklılık stratejileri bulunmaktadır. Bu proteinler ve mezofilik proteinlerin benzer ikincil ve üçüncül yapıları mevcuttur. Dahası, bu termostabil proteinlerin çok sayıda yüklü ve hidrofobik aminoasitleri içermektedir [28]. Proteinlerin yapısal dayanıklılığı esneklik ve sertlik gibi iki zıt faktör arasındaki denge sonucudur. Termostabil enzimler mezofilik olanlara göre daha sert yapıdadırlar ve bu durum bozulmadan kalmasına yardımcı olur. Dolayısıyla katalitik olarak aktif yapıyı korumayı sağlarlar ve denatüre edici şartlarda da aktivedirler [28, 29].

Araştırmacıların son yıllarda yaptıkları çalışmalarda, biyoteknolojik alanda kullanılan enzimler ekstremofillerden izole edilmişlerdir. Endüstride kullanılan enzimlerin büyük çoğunluğunu proteazlar (%59) oluştururken %28'lik kısmını karbohidrazlar, %3'lük kısmını lipazlar ve kalan kısmını ise diğer enzimler oluşturur. Ekstrem termofillerden izole edilen enzimler Tablo 1.3'de gösterilmiştir. Bu enzimlerin besin, kimyasal endüstrisi ile çevre biyoteknolojisi alanlarında geniş kullanım alanları mevcuttur.

Tablo 1.3. Endüstride yaygın olarak kullanılan ekstrem mikroorganizmalardan izole edilen enzimler ve uygulama alanları

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

1.3.1. Proteazlar

Canlılar için büyük önemi olan hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen en önemli enzimler proteazlardır. Bu yıkıcı enzim bitki, hayvan ve çeşitli mikroorganizmalardan izole edilebilmektedir. Proteazlar polipeptid ve protein zincirlerini katalizleyen proteinazlardır. Bu enzim yüksek sıcaklık ve pH'da aktif ve stabil yapıdadır. Ayrıca, amid bağlarını hidrolizleyerek, proteinlerin parçalarını [30].

Proteazlar endüstride özellikle deterjan ve gıda endüstrisinde kullanılırlar. Özellikle farklı pH aralıklarında aktivite gösterebildiklerinden dolayı deterjan endüstrisi için oldukça önemlidir. Bunun yanı sıra, deri, gıda, tekstil, farmakoloji, bakım ve klinik çalışmalar gibi geniş yelpazeli birçok alanda kullanılmaktadır ve mikroorganizmalardan izole edilen enzimlerin büyük çoğunluğunu oluştururlar [30, 31].

1.3.2. Amilazlar

Amilaz olarak adlandırılan enzimler bilinen en eski ve önemli endüstriyel enzimlerdir. Bu enzimin görevi nişastayı hidrolize ederek dekstrin ve glikoza dönüştürmektir. Endüstri alanında kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ve büyük çoğunlukla mikroorganizmalardan izole edilmektedir [32, 33]. Mikrobiyal temelli amilaz enzimlerinin katalitik aktiviteleri diğerlerine nazaran daha yüksektir ve istenmeyen yan ürün oluşturmazlar. Amilazlar proteazlardan sonra endüstride ikinci yaygın olarak kullanılan enzimlerdir. Amilaz enzimleri ikiye ayrılır; endoamilazlar ve ekzoamilazlar [33]. Bunların içinde Endoamilazlar nişastayı rastgele parçalarırken, ekzoamilazlar nişastayı indirgen olmayan uç kısmından parçalarlar. Bunun yanı sıra, farklı pH aralıklarında aktivite gösterdiklerinden özellikle deterjan endüstrisinde yaygın olarak kullanılırlar. Deterjan endüstrisinin yanı sıra, tekstil, gıda ve kâğıt gibi farklı sanayi dallarında da yaygın olarak kullanılabilir [32, 33].

1.3.3. Lipazlar

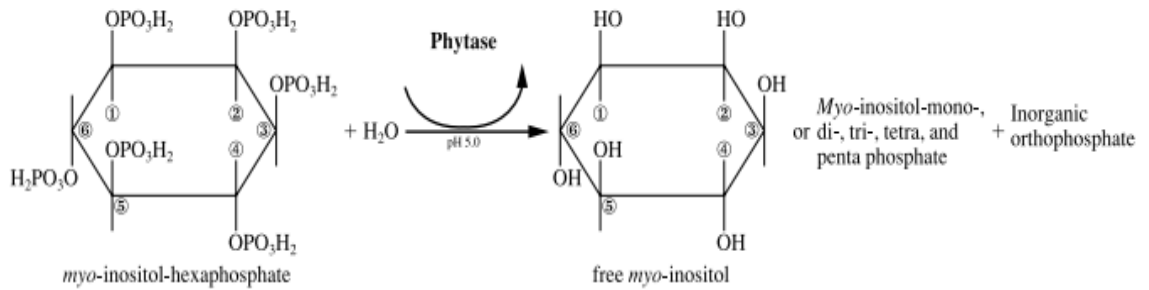
Lipaz enzimleri, trigliseritleri üç monomere dönüştürür (di ve mono-açilgliserid, serbest yağ asitleri ve gliserol). Lipazlar diğer enzimler gibi, hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalardan izole edilebilirler. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı

mikrobiyal kaynaklı lipazlardır. Mikroorganizmalardan elde edilen lipazların katalizlediği reaksiyonlar kimyasal reaksiyonlara kıyasla daha çevre dostudur. Dolayısıyla bu enzimlerin kullanılması daha da yaygın hale gelmektedir [34, 35].

Lipazlar, bakteri, maya ve küf gibi farklı mikroorganizmalardan elde edilebilir. Lipazlar hidrofilik ve hidrofobik ortamlarda etki gösterdiklerinden dolayı endüstri ve tıp alanında önemli yere sahiptirler. Ayrıca, süt endüstrisi, deterjan, kozmetik, besin ve kâğıt gibi farklı sanayi alanlarında kullanılmaktadır [34, 35].

1.3.4. Fitaz

Fitaz; inorganik monofosfat, myo-inositol fosfat ve serbest myo-inositol ürünlerini fitik asiti, hidrolize ederek elde eden enzimdir (Şekil 1.2). İki tip Fitat parçalayan enzimler vardır. Bunlar 3-fitaz ve 6-fitaz olarak isimlendirilir. 3-fitaz, Fitatın D3 pozisyonundaki ortofosfatı uzaklaştırır. 6-fitaz ise myo-inositol halkasındaki L-6 (D-4) pozisyonundaki defosforilasyonu sağlar. 3-fitaz sınıfında mikrobiyal fitazlar, 6-fitaz sınıfında bitkisel kökenli fitazlar bulunmaktadır [7].



Şekil 1.2. Fitik asitin fitaz enzimi katalizörlüğünde inorganik monofosfat, myo-inositol fosfat ve serbest myo-inositole hidrolizi [7].

3-Fitaz, C 3 pozisyonundaki hegzafosfat halkasındaki fosfor kalıntısını hidrolizlerken 6-Fitaz ise, aynı halkadaki C 6 pozisyonundan fosfatı hidrolizler [36].

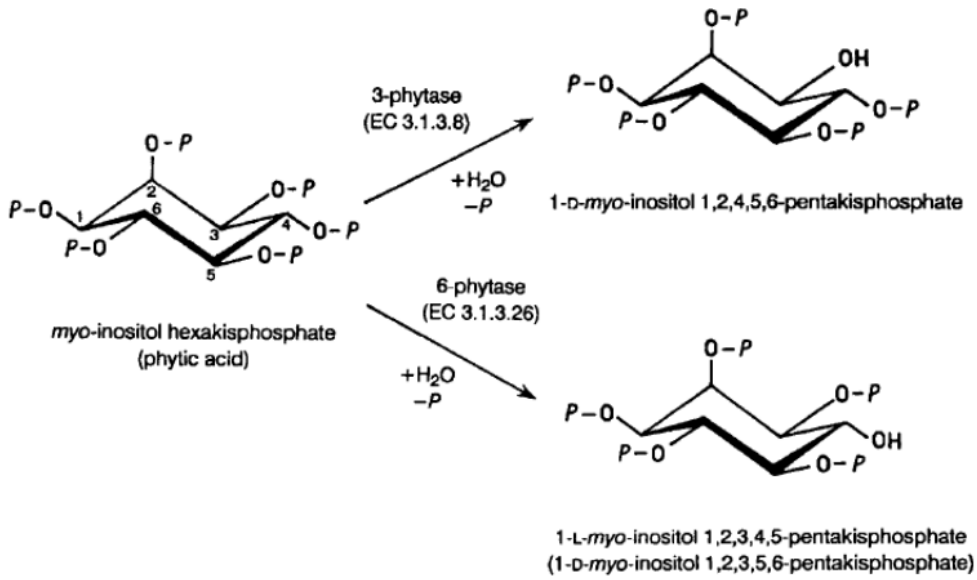
Günümüzde fitik asidi hidrolize edebilen dört farklı fosfataz enzimi belirlenmiştir:

Histidin asit fosfataz (HAP): Bu enzim türünün katalitik mekanizma ve özgül aktif bir bölgesi bulunmaktadır.

β- Propeller fitazı (BPPHy): Bu grup fosfatazlar diğerleri ile homoloji göstermektedirler. BPPHy'ler ilk olarak *Bacillus* türlerinden izole edilmiştir. BPPHy enzimi katalitik faaliyetleri ve termostabilitesi için kalsiyuma gereksinim duyduğu rapor edilmiştir. İki temel bileşen içermektedir: affinite bölgesi ve ayırma bölgesi[37].

Sistidin fosfataz (CP): CP enzimi ilk olarak *Selenomonas ruminantium*'da izole edilmiştir. CP monomerik yapıda, 50-55 °C'de aktivasyon gösteren ve 4,0-5,5 pH aralığında optimum olan enzimlerdir [38].

Purple asit fosfataz (PAP): PAP'lar 7 tane metal bağlayan amino asit residüsü bulduran metaloenzimlerdir. PAP'lar bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarda tespit edilmiştir. PAP'lar diğer fosfataz türlerine göre fitatı hidrolize etme kapasitesi çok düşüktür [38].



Şekil 1.3. Fitik asidin 3-fitaz ve 6-fitaz ile hidrolize edilmesi [7].

Fitaz enzimi doğada birçok kaynaktan izole edilebilir. Yukarıdaki sınıflandırmanın yanı sıra elde edildiği kaynağa göre de sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırma; bitkisel kaynaklı, hayvansal kaynaklı ve mikroorganizma kaynaklı fitaz ol[mak üzeredir. Tablo 1.4'te farklı kaynaklardan elde edilen fitaz enziminin özellikleri gösterilmiştir. Fitaz enzimi ilk olarak 1907 yılında buğday kepeğinde [39] ve ardından 1908 yılında buzağı kanında [40] olduğu gösterilmiştir. Sonrasında ise bitki, mantar, maya, bakteri ve insan

instestinal mukozasından elde edilmiştir. Ancak insan instestinal mukozasından elde edilen fitaz aktivitesi diğerlerine nazaran daha az etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir [7].

Fitaz enzimleri çoğunlukla 45-60 °C arasındaki sıcaklıkta aktivasyon göstermektedir. Bunun yanı sıra geniş bir optimum pH aralığı vardır. Bakterilerden elde edilen fitazlar 4,5-7,0 arasındaki pH'da aktivasyon göstermektedir. Bunun yanı sıra, mantarların optimum pH aralığı 4-6 arasında iken mayalarda ortalama 4,5 civarındadır. Bitki ve hayvansal kaynaklı fitazların optimum pH aralığı biraz daha geniştir (4-8,7) [41].

Bitkisel kaynaklı olarak doğada bakliyat, meyve ve sebzeler gibi birçok kaynaktan olduğu gösterilmiştir. Bunlardan en çok aktivite gösteren baklagil tohumlarından elde edilen fitazlardır. Bitkilerden elde edilen fitazların ortalama optimum pH'ı 4,5-6,0'dır. Ayrıca, optimum aktivasyon sıcaklığı 38-55°C aralığındadır. Bitkisel fitazlar genellikle 6-fitaz'dır. Bunun yanı sıra, bitkisel fitazların alkalın fosfataz ve ya purple asit fosfataz olabileceği de bildirilmiştir [42].

Tablo 1.4. Farklı kaynaklardan elde edilen fitazın genel özellikleri [7].

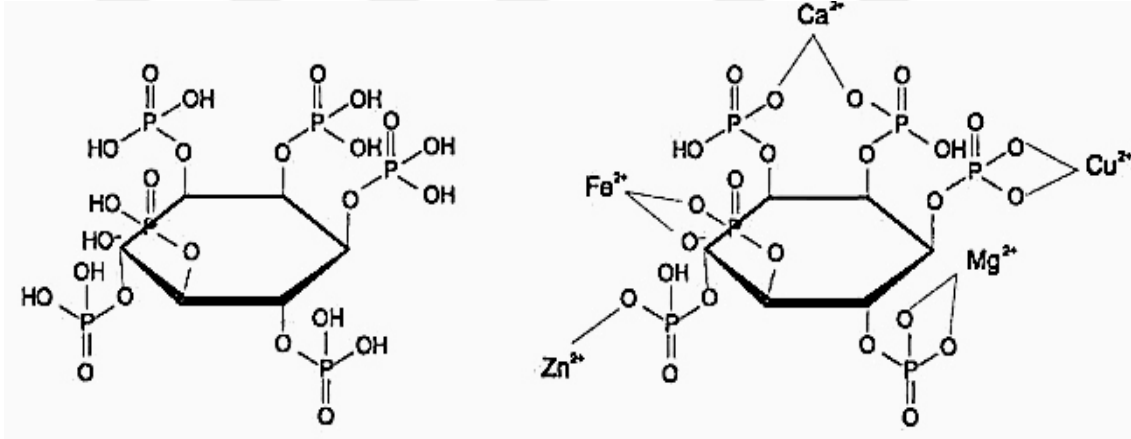
Sınıflandırma	Kaynak	Moleküler ağırlığı (kDa)	Optimum sıcaklık (°C)	Optimum pH
Bakteri	<i>B. subtilis</i>	36-38	60	6,0-6,5
	<i>E. coli</i>	42	55	4,5
	<i>Enterobacter</i>	-	50	7,0-7,5
	<i>K. aerogenes</i>	10-13,700	60-70	4,5; 5,2
	<i>Pseudomanos</i>	-	-	5,5
Mantar	<i>A.ficuum</i>	85-100	55-60	4-6
	<i>A. niger</i>	200	53	5,5
	<i>A. terreus</i>	214	70	4,5
	<i>A. oryzae</i>	120-140	50	5,5
	<i>R. oligosporus</i>	-	55	4,5
Maya	<i>S. castelli</i>	490	77	4,4
	Bakers' yeast	-	45	4,6
Bitki	Kanola tohumu	-	50	5,2
	<i>Cucurbita maxima</i>	66,5	48	4,8
	<i>Lilium longiflorum</i>	88	55	8,0
	Mısır	76	55	4,8
	Mung fasulyesi	160	57	7,5
	Soya Fasulyesi	60	55	4,5-4,8
	Spelt	68	45	6,0
	Buğday Kepeği	47	55	5,0-5,6; 7,0
Hayvan dokusu (instentinal mukoza)	İnsan	-	-	7,4
	Tavuk	-	-	8,2
	Buzağı	-	-	8,7
	Rat	70-90	-	7,0; 7,5-7,8

Hayvansal kaynaklı fitazlar bitkisel kaynaklı olanlara kıyasla karakterizasyonu tam olarak yapılamamıştır. Ancak hayvansal kaynaklı fitaz enzimleri tavuk, buzağı ve rat gibi çeşitli hayvanların instentinal mukozalarından elde edilmiştir [43]. Dahası, kalın bağırsakta izole edilen fitazın mikroorganizma kaynaklı olduğu gösterilmiştir [44].

Hayvansal ve bitkisel kökenli fitazların yanı sıra en yaygın olarak kullanılan mikrobiyal kaynaklı fitazlardır. Mantar, maya ve bakteri gibi birçok mikroorganizmalardan elde edilmiştir. Bu enzimlerin büyük çoğunluğu histidin asit fosfataz veya alkali fitaz ailesine aittir [45]. Günümüzde yaygın olarak kullanılan fitazların büyük çoğunluğu belli avantajlarından dolayı mikroorganizma kaynaklı fitazlardır.

1.3.4.1. Fitik asit

Fitik asit genellikle bitki tohumlarında izole edilmektedir. Yağlı tohumlarda ve tahıl tanelerinde fitik asit proteinle birlikte ve globoidlerin içinde çokça bulunan hücre içi inklüzyonlar halinde bulunmaktadır. Tohumların yanı sıra fitik asit sebze ve meyve köklerinde de görülmektedir. Ayrıca fitik asit, baklagil tohumlarında Mg-K-Ca-Na tuzları şeklinde bulunur. Bu tuzlu yapılarına fitat denilmektedir (Şekil 1.4). Tohumların toprak üstüne çıkıp büyümeye başladığı dönemlerde fitik asite fosfor deposu olarak görev verilmektedir [9].



Şekil 1.4. Fitik asidin moleküler yapısı ve fitik asit metal kompleksi [46].

1.3.4.2. Fitazın Endüstride Kullanım Alanları

Fitaz enzimi sıklıkla yem sanayide kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, gıda, toprak zenginleştirme, kağıt gibi birçok sanayide kullanılmaktadır.

Fitatın tohum çimlenmesinde önemli fosfor kaynağı olduğunu daha önce belirtilmişti. Bağlı fosfor tek mideli hayvanlar tarafından eser miktarda kullanılabilir. Dolayısıyla inorganik fosfor yenilemez ve maliyetli olduğundan birçok hayvan rasyonlarında fosfor kaynağı olarak eklenir. Hayvan yemlerine fitaz eklenmesi fosfatın yem malzemesi içine eklenmesini sağlar. Bunların yanı sıra, bitkisel kaynaklardaki kullanılmayan fitat fosforu zamanla birikerek çevre kirliliği yaratır. Dahası, topraktaki fazla fosforun deniz/göllere aktarıldığı ve böylelikle burada yaşayan canlıları olumsuz yönde etkilediği rapor edilmiştir. Dolayısıyla bu deniz/göl ürünleri ile beslenen insanlarda nörotoksik etki oluşturduğu bildirilmiştir [9].

Öte yandan, fitik asitin divalent iyonları şelatlayıcı özelliğinden dolayı besinlerdeki kalsiyum, çinko, demir, magnezyum gibi minerallerin alınımı zorlaştırır. Normal fizyolojik pH'da şelat durumundaki fitik asit-mineral kompleksi kararlı yapıda olduğundan düşük mineral emilimine neden olmaktadır. Dolayısıyla gıda sektöründen kullanılan fitaz enziminin amacı insanlardaki bu mineral emilimini arttırmak içindir [38]. Gıda sektöründe fitaz enzimi, ekmek yapımı, tahıl kepeklerinin parçalanması gibi alanlarda kullanılmaktadır. Meyve ve sebzelerden alınan besinlerin miktarı ve işleme derecelerine göre günlük fitat üretiminin en çok 4500 mg'a yükseltilmesi gerektiği görülmüştür. Bunun yanı sıra hayvan etlerinin tüketilmediği vejetaryen diyetlerinde fitat tüketimi 2000-2600 mg aralığında olmalıdır. Fitat tuzları asidik ve alkali pH'larda proteinlerle karmaşık oluşturmaktadırlar [47]. Bu durum protein yapısından konformasyonel değişimlere sebep olmaktadır. Dolayısıyla enzimatik aktivasyonda, proteinin çözünürlüğünde ve proteolitik sindirilmeye düşüş olur. Gıda sektöründe fitat, bitkisel ve mikroorganizmalarda bulunan fitazlarla tamamen hidrolize edilmezler. Besinlerdeki demir mineralinden yararının arttırmak için fitat seviyesinin indirilmesi gereklidir [48].

Fitaz enzimi myo-inisitol elde edilmesinde önemli bir enzimdir. Myo-inisitol ve türevleri bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarda önemli işlevleri olan moleküllerdir. İnositol fosfatlar ve fosfolipidler zar geçiş iletiminde ve kalsiyum iletiminde önemli rolleri vardır. Fitaz enziminin buradaki görevi ise, myo-inisitol fosfatı parçalayarak serbest myo-inositol türevlerine dönüştürmektir [49].

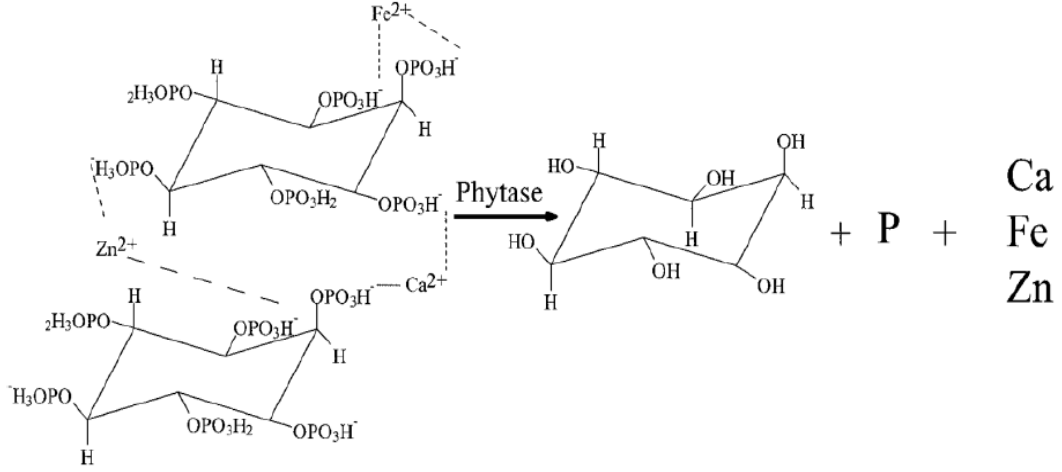
Yüksek canlılarda myo-inositol metabolizması ve işlevi araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiş ve hücre zarında myo-inositol içeren fosfolipid oluşumu ve yıkımı yaygın olarak incelenmiştir. Myo-inositolun bazı fosfat esterleri hücre içerisinde ikincil haberci görevinde olan fosfotidil inositol yolağında önemli fonksiyonları bulunmaktadır [7]. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, fitat sinyal ileti yolağında, hücre döngüsünün düzenlenmesinde, bazı onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyon seviyelerini etkileyerek anti-kanser etkinliği gösterebileceği bildirilmiştir [8]. Bunun yanı sıra, myo-inositol fosfatları astım gibi ciddi solunum hastalıklarını engellediği ileri sürülmektedir. Dahası, myo-inositol fosfatların ağrı kesici olarak kullanılması da önerilmiştir [50]. Dolayısıyla, myoinositol fosfatların kullanılmasına ilişkin ilgi artmıştır. Ancak myoinositol fosfatların kimyasal olarak sentezlenmesi ekstrem basınç ve sıcaklık gibi zor koşullarda gerçekleşmektedir. Böylelikle fitaz aracılığı ile myoinositol fosfatları ile türevlerinin elde edilmesi alternatif bir sentez yöntemidir. Bu nedenler araştırmacılar, *Saccharomyces cerevisiae* ve *E.coli* gibi bakteriler kullanılarak fitik asitin enzimatik olarak hidrolizinden myo-inositol fosfat türevleri hazırlamışlardır [9].

Çeşitli alanlardaki topraklarda toplam organik fosforun %50'sini fitik asit ve türevleri oluşturmaktadır [51, 52]. İşlem yapılan toprağa fitaz muamelesi yapıldığında fitik asitin parçalanma oranının arttığı ve böylelikle bitkilerin büyümenin indüklendiği gösterilmiştir [51].

Fitaz enzimi toprak zenginleştirme, myo-inositol parçalanması, yem ve gıda sektörlerinin yanı sıra kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinde oldukça önemlidir. Kâğıt endüstrisinde fitik asitin uzaklaştırılması oldukça önem arz etmektedir. Bu alanda termostabil fitazlar fitik asidi parçalamak amacıyla kullanılan biyolojik molekül olarak kullanılmaktadır. Fitik asidin enzimatik reaksiyonlarla parçalanması zararlı yan ürün üretmediğinden fitaz enziminin kullanılması çevre korunması için önemlidir [7].

Fitaz enziminin minerallerden oldukça fazla şekilde faydalanır. Fitik asit besinlerden alınan minerallere bağlanarak bitkisel kaynaklı, potasyum, kalsiyum, çinko ve demir gibi minerallerin sindirimini ve absorpsiyonunu azaltmaktadır [53]. Fitik asit tuzu olan fitatın konformasyonundan dolayı bazik ve nötr pH'larda ve sindirim kanalında negatif yüklüdür. Böylelikle fitat çinko, bakır, nikel, kolbalt, demir, manganez, kalsiyum gibi

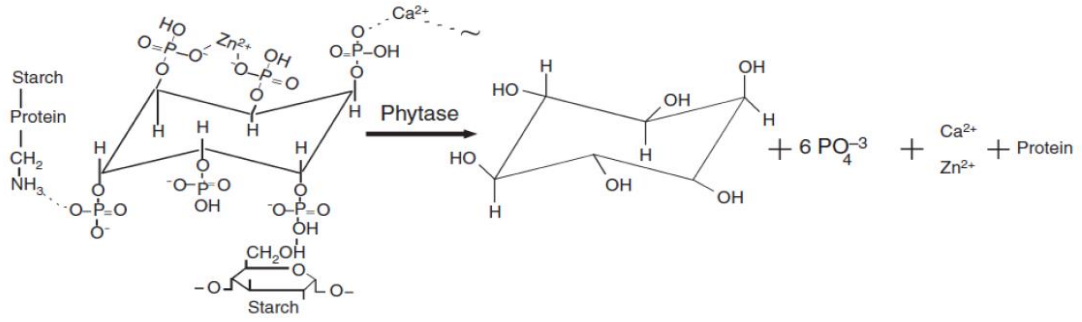
metal katyonlara bağlanarak stabil bileşikler oluştururlar. Elde edilen bu fitat-metal kompleksi mineralin kullanım verimliliğini azaltmaktadır [54] (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Fitatın mineraller ile kompleks oluşturması.

Fitaz enziminin, metabolik enerjiye ve protein sindirimine etkisi de önemli yer tutmaktadır. Fitatlar farklı pH aralığında (yüksek-düşük) proteinlerin bazik amino asit residuleri ile stabil kompleks oluşturdukları rapor edilmiştir. Dolayısıyla, proteinlerin aktivitesi ve proteazların sindirimdeki işlevleri olumsuz etkilenmektedir [49]. Protein-fitat komplekslerinin olduğu ilk olarak 1925 yılında pamuk tohumu özlerinde tespit edilmiştir [55]. Ancak bu kompleksin kümes hayvanlarının beslenmesinde olumsuz etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Fitatın farklı pH aralığına proteinler ile iki farklı kompleks oluşturabileceği ileri sürülmüştür. Asidik pH değerlerinde, ikiliprotein-fitat kompleksleri ve üçlü protein-mineral-fitat kompleksleri oluşturur (Şekil 1.6). Kısaca, fitatın hidrolizi ile açığa çıkan ürünler, hayvanlar tarafından kullanılabilir[56].

İnsanların aldıkları fitatlı besinler kan şekeri seviyesini azalttığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda lipid ve kalsiyum-fitat kompleksi olduğu ve lipidden elde edilen enerjinin kısıtlandığı görülmüştür [50, 57].



Şekil 1.6. Fitazın, fitata bağlı fosfat grupları hidrolizi.

1.3.4.3. Fitazın saflaştırılması

Enzimlerin saflığı kullanım alanına göre değişir. Analitik çalışmalar için kullanılacak enzimin saflık derecesinin yüksek olması gerekirken endüstride kullanılan enzimin saflığı düşük olabilir. Saflaştırma yönteminin seçimi enzimin hücre içerisindeki konumuna bağlı olarak değişir. Hücre içi enzimlerin izolasyonu genellikle biyolojik komplekslerden ayrılması ile olur. Enzimler çok karmaşık protein yapıdaki moleküllerdir. Enzimi izole etmek için öncelikle, hücrenin içeriği için parçalanması, temizleme, santrifüj, amonyum sülfat ile çöktürülmesi ve diyaliz aşamalarının yapılması gereklidir. Fakat, amino asit sekansı ve X-ışını kristalografik çalışmalarında enzim miktarının fazla olması bir dezavantaj olarak görülmektedir. Bu nedenle işlemler sırasıyla, jel filtrasyonu, iyon değiştirme veya afinite kolon kromatografisi gibi ileri tekniklere ihtiyaç duymaktadır.

Saflaştırma yöntemi ve stratejileri oluşturulurken önemli hususlardan birisi de enzim kaynağıdır. Enzimin, bakteri, bitki, hayvan, mantar gibi hangi kaynaktan izole edileceğine karar verilmelidir. Dahası kullanılan kaynağının hangi özgül bölgesinin kullanılmasına karar verilmesi gereklidir. Bu izole edilen enzimler ticari olarak kullanılacağından maliyeti ve elde edilme zamanı önemlidir. Özetle enzimin izole edilmesi için geniş bir fizibilite araştırması yapılmalı ve stratejiler belirlenmelidir.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda fitaz enzimi birçok farklı yöntem ile izole edilmiştir ve farklı yöntemlerle saflaştırılmıştır. 1982 yılında Powar ve arkadaşları [58] tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus subtilis* bakterisinden sentezlenen fitaz enzimi

çeşitli yöntemlerle %32 verim ve 39 kat saflaştırılmıştır. Santrifüjleme metodlarından faydalanarak fitaz enziminin moleküler ağırlığının 3.5 kDa olarak tespit edilmiştir. Bunun ardından 1987 ve 1988 yılında, Ullah ve arkadaşları [59,60,61], Fitaz enzimini iyon kromatografisi ve kromatografik yöntemle 22 kat % 58 verimle ve kromatografik yöntem ile 6.2 kat ve % 54 verimle ve saflaştırmıştır.

Bacillus subtilis'ten aseton çöktürmesi, katyon ve anyon değişim kromatografileri teknikleri kullanılarak fitaz enzimi saflaştırılmıştır[62]. Başka bir çalışmada, *Bacillus licheniformis* fitaz enzimi moleküler ağırlığı 36 kDa olarak belirlenmiş ve 39 kat, % 10 verimle, amonyum çöktürmesi, iyon kromatografisi ve jel kromatografisi teknikleri ile saflaştırılmıştır [10].

Fitazların etkinliği ve kararlılığı üzerine pH, sıcaklık, inhibitör, metal iyonları ve EDTA'nın (Etilendiamin tetraasetik asit) etkisi oldukça fazladır. Fitaz enziminin aktivasyonu optimum koşullarında belirlenen substrattan kalan inorganik fosfat miktarının ölçülmesi ile belirlenir. *Bacillus sp.* DS 11'den izole edilen fitaz enzimi için pH 7,0-8,0 ve 70 °C optimum koşullardır. Kim ve arkadaşlarının [63] yaptıkları çalışmada ortamda 5 mM CaCl₂ varlığında ve 90 °C'de 10 dk inkübe edilmesinin ardından enzim aktivasyonun yaklaşık %50'lik kısmının korunduğu gösterilmiştir. Ayrıca başka bir çalışmada, fitazın *Bacillus licheniformis*'te saflaştırılan halinin optimum koşulları pH 6.0-8.0 ve 55 °C olarak belirlenmiştir ve 1 mM PMSF ve 5 mM DTT varlığında optimum oda sıcaklığında inkübasyonu yapıldıktan sonra enzim inhibisyona uğramamış ve Cd²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Ba²⁺, EDTA'nın inhibisyonu sağladığı görülmüştür [11].

Fitaz enziminin aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi olduğu daha önceki bölümlerde de bahsedilmişti. Metal iyonları enzimin katalitik aktivitesini etkilemek için farklı yollarda etki ederler. Metaller substrata bağlanarak veya oksidasyon sayılarındaki dönüşümlü reaksiyonlara katılırlar [64].

MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Organizma

Materyal olarak kullanılan mikroorganizma Pasinler bölgesinden toplanan su ve çamur örnekleri kullanılmıştır. Organizmamız ise *Bacillus licheniformis MH101322* ' dir.

2.1.2. Cihazlar

Otoklav: Nüve OT 40 Otoklav

Hassas Terazı: Vibra AJ3200H Shinko

Etüv: Nüve FN500

Çalkamalı İnkübatör: LABWİT ZWYR-200D Orbital

Santrifüj: ScanSpeed mini

Pipetler: Eppendorf

PZR Cihazı : BİOER GenePro

Jel Görüntüleme: Dnr Bio-imaging Systems MiniLumi

Elektorforez: WEALTEC ELİTE 300 PLUS

pH Metre: AZ 8685

Sıcak Su Banyosu: Labo BMS 5200

Nanodrop Spektrometre: ACTG Gene UVS-99

Vortex: PV-1 Grant-bio Vortex Mixer

Isıtıcıli magnetik karıştırıcı: Are VELP Scientifica

Distile su Cihazı: Nüve ND 4L

Western Blot: WEALTEC

2.1.3. Kimyasallar ve Çözeltiler

Etidyum bromür: 5 ml'lik Ethidium bromide [EB], (Kod: 802511) 10 mg/ml stok çözeltisi hazırlanmıştır.

Fenol Kloroform İzoamilalkol: Sigma

Etanol: MERCK 100983 Ethanol absolute for analysis ACS, Reag. Ph Eur 2.5 L

Kalsiyum Klorür: 25:24:1, Saturated with 10mM Tris, pH 8.0, 1mM EDTA

Gliserol: EMSURE® ACS, Reag. Ph Eur. CAS 56-81-5, EC Number 200-289-5

10x TAE: Tris Acetate-EDTA buffer BioReagent, 50x suitable for electrophoresis

EDTA: FLUKA Kat no: 03620

Kloroform: SİGMA Anhydrous, ≥99%, contains 0.5-1.0% ethanol as stabilizer

X GAL: Thermo Fisher Catalog number: 15520018

İzopropanol: Sigma EC no: 200-661-7

TE: Sigma Tris EDTA pH:8.0

Ampisilin: Sigma A 6140 Solüsyon

Tris: Sigma EC No: 201-064-4

2.2. Yöntem

2.2.1. Organizmanın Kültüre Edilmesi

Bacillus licheniformis MH101322 bakteri kültürü 48 saat, 65C⁰’ de inkübe edilerek saf kültür elde edilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1: Örneklerin inkübe edilmesine ait etüv içi görüntü.

2.2.2. *Bacillus licheniformis* gDNA İzolasyonu

Bakterinin gDNAsını saflaştırmak için kullanılan protokol aşağıda belirtilmiştir.

- 1- Bakteri LB Broth besiyerinde 24 saat 65°C’de inkübe edilmiştir. Süre sonunda 15dk. 4000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Üst sıvı dökülmüş ve kalan kısım santrifüj edilmilmiştir. Peletin üzerine; 200µl dH₂O, 50µl 0,5M EDTA, 10µl %20 lik SDS, 10µl Proteinaz K (10mg/ml), 10µl 1M Tris-HCl (pH:8) ve 5µl 5M NaCl ilave edilmiştir. 65°C’deki örnekler yarım saatte bekletilmiştir.
- 2- Karışımın üzerine fenol: kloroform: izoailkol (25: 24: 1) eklenerek DA’ların ve diğer moleküllerin birbirinden ayrılması sağlanmıştır.
- 3- Santrifüj edilen örneklerin üst sıvısına, sırasıyla 3M NaOAc , 0,3 M NaOAc ve ethanol eklenmiştir.

- 4- Santrifüj edilen örneklerin üst sıvısı atılmış ve pellet 80µl dH₂O ile çözülmüştür. [72].

2.2.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

16s rRNA bölgelerinin elde edilmesi için gerçekleştirilen reaksiyon ve koşulları Tablo 2.1 ve Tablo 2.2’de belirtilmiştir

Tablo 2.1. PZR Reaksiyon Koşulları

Bileşenler	Bileşen Miktarları
Taq Polimeraz (5U// µL)	0,25 µl
10x Buffer PZR	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
Primer (25pmol/ µL)	2,5 µl
Primer (25pmol/ µL)	2,5 µl
DNA (Genomik)	1 µl
dNTP (25mM)	1,5 µl
Distile Su	12,75 µl

Tablo 2.2. PZR sıcaklık ve Döngü Koşulları

Sıcaklık	Süre
94 °C	5:00 dakika
94 °C	1:00 dakika
55 °C	1:00 dakika
72°C	1:00 dakika
72°C	5:00 dakika
4 °C	∞

2.2.4. Rekombinant Enzimin Üretilmesi

Bacillus licheniformis bakterisinden fitaz enzimi üretmek için fitaz enzimi elde edildikten sonra elde edilen gen insertünün ligasyonu, transformasyonu, plazmit izolasyonu, restriksiyon enzimleriyle insertü taşıyıp taşımadığı ve insertün dizi analizi aşamalarından geçmiştir. Daha sonra klonlanan gen ekspresyon vektörüne ve ekspresyon konakçısına aktarılmış ve protein üretilmiştir. Sonra SDS-page ile bant büyüklükleri gözlemlenmiş ve Western Blot analizi ile beklenen enzimin varlığı tespit

edilmiştir. Biz çalışmamızda PGEMTeasy' i klonlama vektörü olarak, *E.coli* DH5- α ırkını restriksiyon enzimi (Fermentas XbaI ve KpnI 10,000 u/ml) olarak plazmit izolasyon aşamasında kullandık. Ekspresyon aşamasında ise restriksiyon enzimi olarak Sall ve HindIII kullandık. pET 16b vektör olarak ve *E. coli* Rosetta' yı ise konakçı olarak kullandık.

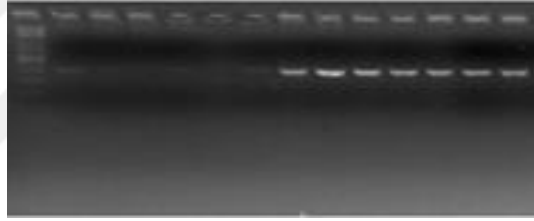


3. BULGULAR

Bakterilerin moleküler türünün belirlenmesi için 16S rRNA gen bölgesi saflaştırılmıştır. Bu bölgenin saflaştırılması ile beraber baz dizisi Dizi analizi ile hedeflenmiştir. Bu amaçla sırasıyla genomik DNA izolasyonu, ardından 16S rRNA geni; PCR, klonlama ve sekans analizi yapılarak türler tanımlanmıştır.

Genomik DNA' nın Eldesi

İzole edilen bakterilerden elde edilen gDNA'ların, yoğunluklarını belirlemek için spektrofotometre ile ölçümleri yapılmıştır. DNA'lar 16S rRNA genine özgü primerler ile çoğaltılmış ve elde edilen PCR sonuçları jel elektroforez ile resmedilmiştir. 16S rRNA geninin sahip olduğu baz boyutunun 1700 baz olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1).



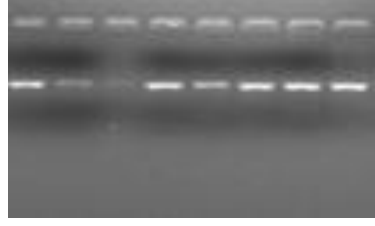
Şekil 3.1 PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü.

Dizi Analizi Sonucu

Polimeraz zincir reaksiyonu ile elde edilen 16S rRNA geni, klonlanmış ve sekans analizleri yapılarak ve *Bacillus licheniformis* türüne ait gen bölgesi olduğu ortaya çıkmıştır.

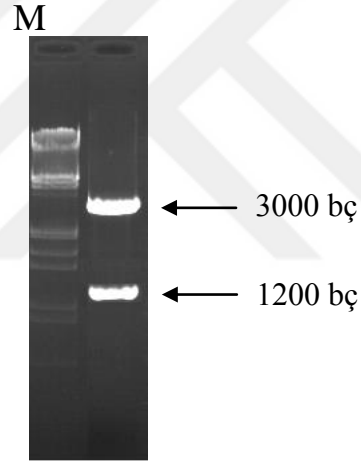
Bacillus licheniformis'ten Fitaz'ın Klonlanması

Bacillus licheniformis'ten Fitaz geninin elde edilmesi için öncelikle gDNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra PCR ile gen elde edilmiş, ligasyon ile gen vektöre aktarılmış, transformasyon ile E.coli'ye aktarılmış, E.coli'den plazmit izolasyonu yapılmış ve elde edilen bölgenin dizi analizi yapılarak klonlama gerçekleştirilmiştir. İlk olarak; Fitaz geni PCR ile elde edilmiş ve agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Fitaz geninin PCR sonucunun elektroforez jel görüntüsü.

Fitaz geninin vektöre aktarıldığının belirlenmesi için, XbaI ve KpnI enzimleri kullanılarak restriksiyon kesimi yapılmıştır. 1200 bç'lik Fitaz geni ve 3000 bç'lik PGEMTeasy vektörü agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 3.3). Hedeflenen Fitaz geninin agaroz jelde görüntülenmesinden sonra klonlamanın gerçekleştiği belirlenmiştir.



Şekil 3.3. PGEMTeasy vektörün de restriksiyon enzimi ile kesilmiş Fitaz geninin jel görüntüsü. M: Lambda Marker

***Bacillus licheniformis*'ten Fitaz'ın Rekombinant Üretilmesi**

pET16b vektörüne aktarılmış fitaz genine ait insert Ni-NTA boncukları ile saflaştırılmış ve western blot ile saflaştırıldığı teyit edilmiştir. Yaklaşık olarak 27 kDa olarak saflaştırılan protein SDS PAGE ile görüntülenmiştir. Şekil 3. 4'de görüldüğü üzere protein bantlaşması jelde görülmüştür (Şekil 3. 4). Ekspresyonun başarılı olduğu jel ile teyit edilmiştir.



Şekil 3. 4: Ni-NTA ile saflaştırılan fitaz enzimi SDS jel görüntüsü.



4. TARTIŞMA

Bu çalışmada doğal ortamı sıcak su kaynakları olan termofilik bakterilerin morfolojik ve moleküler yollarla belirlenmesi, üreme kontrolleri, *Bacillus licheniformis* türünün seçimi ve ve bu bakteriden gDNA izolasyonu ve bu bakteriden rekombinant enzim üretmek amacıyla Diyadin (Ağrı) kaplıcasından su ve çamur materyalleri alınmıştır.

Enzim çalışmalarında mikroorganizmaların tercih edilmesinin nedeni; yan ürün oluşturmalarının daha az olması, ekonomik olması, stabilitelerinin yüksek olması, aktivitelerinin yüksek olması, yüksek oranda ve saflıkta üretilebilme özelliklerinin olmasındandır.

Termofilik mikroorganizmalar ekstrem koşullarda yaşayan, bu şartlara uyum sağlamış ve bu şartlarda optimum olarak gelişip çoğalan mikroorganizmalardır. Fitaz, katalaz, laktaz, lipaz, sükröz, amilaz, proteaz gibi birçok enzim üretimi termofilik mikroorganizmalardan sağlanmaktadır. Termofilik mikroorganizmalar gıda, giyim, deterjan, hastalıkların teşhis ve tedavisi gibi geniş kullanım alanına sahiptir. Bizim çalışmamızda termofilik bakteri kullanıldığından dolayı ekstrem koşullarda yaşayabilen, kararlı, ekonomik, yüksek sıcaklıkta aktivite gösteren enzim olması bize avantaj sağlamaktadır.

Bizim çalışma alanımız fitaz enzimi olup, bunun biyoteknoloji ve ticari olarak kullanımı ve daha verimli fitaz enzimi üretimi sağlanmıştır. Termofilik çalışmalarda kullanılacak fitaz enzimi üretiminde en çok tercih edilen *Bacillus* türü, *B. licheniformis* tir [68].

Çalışmamızda ekstrem koşullarda üreyebilen Ağrı Diyadin' den izole ettiğimiz *Bacillus licheniformis* ' ten rekombinant enzim üretimi yapıldı. Seçilen materyallerin uygun besiyerlerine ekimleri yapılmış ve gram pozitif, zincirli, sporlu, beyaz renkli izolat gözlemlenmiştir.

Enzim elde edilirken hangi kaynaktan elde edileceğine ve kaynağın hangi özgül bölgesinin kullanılacağına karar verilmelidir. Günümüze kadar yapılan çalışmalar sonucunda fitaz enziminin birçok farklı yöntem ile izole edildiğini ve saflaştırıldığını göstermektedir. 1982 yılında Powar ve arkadaşları [58] tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus subtilis* ' ten sentezlenen fitaz enzimi etanol çöktürmesi ve aseton

çöktürmesinden sonra uygulanan iki farklı iyon değişim kromatografisi ile 39 kat ve %32 verimle saflaştırılmış ve ultrasantrifüj ile sedimantasyon metodları kullanılarak enzimin moleküler ağırlığını 3.5 kDa olarak belirlemiştir. Ullah ve arkadaşları [59] 1987 yılında *Aspergillus ficuum* NRRL 3135'dan ekstrasellüler olarak sentezlenen fitaz enzimini iki farklı iyon değişim kromatografi kromatofokusing işlemlerinden sonra %58 geri kazanımla 22 kat saflaştırıldığını görmüşlerdir. Fitazların etkinliği ve kararlılığını pH, sıcaklık, metal iyonları, EDTA, inhibitörler etkilemektedir. Kim ve arkadaşları 5 mM CaCl₂ varlığında yaptıkları çalışmada enzim aktivasyonunun 90 °C'de 10 dk inkübe edildikten sonra %50 lik kısmının korunduğu gösterilmiştir.

Bakteri genomlarında 5s rRNA, 16s rRNA, 23s rRNA bölgeleri özel bölgeler olarak bilinmektedir ki özellikle 16s rRNA bölgesi bakteriler arasındaki çeşitliliğin belirlenmesinde rol almaktadır [69].

Çalışmadan elde edilen gDNA'nın izolasyonları yapıp, primerlerin siparişi verilmiş ve primerlerin 16s rRNA dizi sekansı yapılmıştır. Sekans sonucunda elde edilen diziler Blast analizine tabi tutulmuş ve hangi türe yatkınlık gösterdikleri belirlenmiştir. Bizim elde ettiğimiz *Bacillus licheniformis* türü, 16s rRNA bölgesindeki dizilere göre belirlenmiştir.

Bacillus licheniformis bakterisinden fitaz enzimi üretmek için fitaz enzimi elde edildikten sonra elde edilen gen insertünün ligasyonu, transformasyonu, plazmit izolasyonu, restriksiyon enzimleriyle insertü taşıyıp taşımadığı ve insertün dizi analizi aşamalarından geçmiştir. Daha sonra klonlanan gen ekspresyon vektörüne ve ekspresyon konakçısına aktarılmış ve protein üretilmiştir. Sonra SDS-page ile bant büyüklükleri gözlemlenmiş ve Western Blot analizi ile beklenen enzimin varlığı tespit edilmiştir. Biz çalışmamızda PGEMTeasy' i klonlama vektörü olarak, *E.coli* DH5- α ırkını restriksiyon enzimi (Fermentas XbaI ve KpnI 10,000 u/ml) olarak plazmit izolasyon aşamasında kullandık. Ekspresyon aşamasında ise restriksiyon enzimi olarak SalI ve HindIII kullandık. pET 16b vektör olarak ve *E. coli* Rosetta' yı ise konakçı olarak kullandık. Saflaştırılan proteinin 27 kDa büyüklüğe sahip olduğu belirlenmiştir.

Zafar A. ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada; *Bacillus licheniformis* 9945A'nın fitaz genini klonlamış ve klonlama vektörü ile restriksiyon enzimi olarak, pET-22b'nin

(+) NdeI ve HindIII bölgelerinde lige edilmiştir. Sonra *E.coli* BL21(DE3) konakçısında üremeleri sağlamıştır. *E.coli* BL21 ekspresyon konakçısında protein üretimi yapılmış, saflaştırılan fitazın moleküler ağırlığı, 23 kDa olarak SDS-PAGE ile belirlenmiştir [73].

Biz *B.licheniformis*' ten izole ettiğimiz enzimin moleküler ağırlığını SDS-PAGE ile 71 kDa olarak belirledik

Bai ve arkadaşları alkalifik *Bacillus* türlerinde fitaz enzimi üretmek için yaptığı çalışmada, klonlama vektörü olan pUC18'in defosforile BamHI bölgesine klonlama aşamasında izole edilen fitaz genini lige etmişler ve *E.coli* DH5 α 'ya transformasyonunu yapmışlar. Ekspresyon aşamasında rekombinant plazmid izole edilmiş ve ilgili gen bölgesi pET28a-xyn11A vektörüne lige edilmiştir. Sonra *E.coli* BL21(DE3)' ye transforme edilmiş ve protein üretimi sağlanmıştır. Saflaştırılmış enzimin SDS-PAGE' deki moleküler ağırlığı 27-43 kDa arasında olduğu belirlenmiştir [75].

Yine başka bir çalışma olan Aygan A. yapmış olduğu çalışmada *Bacillus* türlerinin moleküler ağırlığını 108, 95, 80, 68 kDa olarak belirlemiştir [75].

Bu araştırmalar fitaz enziminin moleküler ağırlığının aynı türler ve farklı türler arasında farklılıklar gösterebileceğini bize göstermektedir.

Bu çalışma ile fitaz enziminin rekombinant üretimi yapılmış ve daha kolay, kararlı, kontrollü, maliyeti düşük ürün elde edilmiş ve ticari olarak kullanılabilen fitaz enzimi üretilmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma *Bacillus licheniformis* fitaz geni başarı şekilde klonlanmış ve ekprese edilmiştir. İncelenen literatürler mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin, biyoteknolojide kullanımının arttığını ve ciddi bir ekonomik etki gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle bu alanlarda kullanılan enzimlerin kararlılığı, geri dönüşülebilirliği, yüksek aktivite göstermeleri ve geniş alanlarda kullanılabilirlikler öne çıkmaktadır. Ülkemizin dışa bağımlı olduğu bu alanda üretilecek yerli enzimlerin önemi yadsınamaz boyuttadır. Bu çalışma ile birlikte ülkemizde termofilik organizmalardan elde edilmiş ve yüksek kararlılık gösteren fitaz enzimi, *Bacillus licheniformis* bakterisinden rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak elde edilmiştir. Ülkemizin yerli malı üretme politikası çerçevesinde önemli bir pazara sahip enzim endüstrisine katkı sağlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Eren Kiran, Ã., U. Ãđomlekcioglu, and N. Dostbil, *Some Microbial Enzymes and Usage Fields in Industry*. KSU Journal of Science and Engineering, 2006. **9**: p. 12-19.
2. Gümüsel, F., *Biyoteknoloji, genetik ve sağlık sektörü*. Kocaeli Sanayii için teknolojik uzgörü ortak projesi, 2002: p. 73-135.
3. Wiseman, A. and H. Dalton, *Enzymes versus enzyme-mimetic systems for biotechnological applications*. Trends in Biotechnology, 1987. **5**(9): p. 241-244.
4. Javorsky, P., et al., *Extracellular beta-galactosidase activity of a Fibrobacter succinogenes S85 mutant able to catabolize lactose*. Applied and environmental microbiology, 1990. **56**(12): p. 3657-3663.
5. Choi, Y.J., et al., *Purification and characterization of B-galactosidase from alkalophilic and thermophilic Bacillus sp. TA-11*. Biotechnology and applied biochemistry, 1995. **22**(2): p. 191-201.
6. Veith, B., et al., *The complete genome sequence of Bacillus licheniformis DSM13, an organism with great industrial potential*. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 2004. **7**(4): p. 204-211.
7. Liu, B.-L., et al., *The induction and characterization of phytase and beyond*. Enzyme and Microbial Technology, 1998. **22**(5): p. 415-424.
8. Selle, P.H., et al., *Phytate and phytase: consequences for protein utilisation*. Nutrition Research Reviews, 2000. **13**(2): p. 255-278.
9. Asan, M., *Microbial phytases, applications and biotechnology*. TARIM BILIMLERI DERGISI-JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES, 2007. **13**(2): p. 147-155.
10. Fasimoye, F.O., F.M. Olajuyigbe, and M.D. Sanni, *Purification and characterization of a thermostable extracellular phytase from Bacillus*

- licheniformis* PFBL-03. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2014. **44**(2): p. 193-205.
11. Wang, Y., et al., *Production and characterization of a thermostable beta-propeller phytase from Bacillus licheniformis*. African Journal of Microbiology Research, 2013. **7**(17): p. 1745-1751.
 12. Kumar, S. and R. Nussinov, *How do thermophilic proteins deal with heat?* Cellular and molecular life sciences, 2001. **58**(9): p. 1216-1233.
 13. Sterner, R.h. and W. Liebl, *Thermophilic adaptation of proteins*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2001. **36**(1): p. 39-106.
 14. Demirjian, D.C., F. Moris-Varas, and C.S. Cassidy, *Enzymes from extremophiles*. Curr Opin Chem Biol. 2001 Apr;5(2):144-51., 2001.
 15. Itoh, K., et al., *Properties of B-lactosidase of Lactobacillus kefiranofaciens K-1 isolated from kefir grains*. Letters in applied microbiology, 1992. **15**(5): p. 232-234.
 16. Gomes, J. and W. Steiner, *The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes*. Food technology and Biotechnology, 2004. **42**(4): p. 223-235.
 17. Sellek, G.A. and J.B. Chaudhuri, *Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles*. Enzyme and Microbial Technology, 1999. **25**(6): p. 471-482.
 18. Herbert, R.A. and R.J. Sharp, *Molecular biology and biotechnology of extremophiles*. 1992: Blackie and Son Ltd.
 19. Lopez-Garcia, P., *DNA supercoiling and temperature adaptation: a clue to early diversification of life?* Journal of molecular evolution, 1999. **49**(4): p. 439-452.
 20. Brock, T.D., *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. 2012: Springer Science & Business Media.

21. Stetter, K.O. and G.n. Gaag, *Reduction of molecular sulphur by methanogenic bacteria*. Nature, 1983. **305**(5932): p. 309-311.
22. Maugeri, T.L., et al., *A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from shallow, marine vents*. Systematic and applied microbiology, 2001. **24**(4): p. 572-587.
23. Yavuz, E., *Genotypic characterization of extracellular enzyme producing thermophilic bacteria in Balçova Geothermal Region*. 2003, İzmir Institute of Technology.
24. De Clerck, E. and P. De Vos, *Genotypic diversity among Bacillus licheniformis strains from various sources*. FEMS microbiology letters, 2004. **231**(1): p. 91-98.
25. Rey, M.W., et al., *Complete genome sequence of the industrial bacterium Bacillus licheniformis and comparisons with closely related Bacillus species*. Genome Biol. 2004;5(10):R77. Epub 2004 Sep 13., 2004.
26. Salkinoja-Salonen, M.S., et al., *Toxigenic strains of Bacillus licheniformis related to food poisoning*. Appl Environ Microbiol. 1999 Oct;65(10):4637-45., 1999.
27. Fujiwara, S., *Extremophiles: Developments of their special functions and potential resources*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002. **94**(6): p. 518-525.
28. Fitter, J., et al., *Activity and stability of a thermostable $\hat{I}\pm$ -amylase compared to its mesophilic homologue: mechanisms of thermal adaptation*. Biochemistry, 2001. **40**(35): p. 10723-10731.
29. van Beilen, J.B. and Z. Li, *Enzyme technology: an overview*. Current Opinion in biotechnology, 2002. **13**(4): p. 338-344.
30. Fogarty, W.M. and C.T. Kelly, *Microbial enzymes and biotechnology*. 2012: Springer Science & Business Media.

31. Aehle, W., *Enzymes in industry: products and applications*. 2006: John Wiley & Sons.
32. Reddy, N.S., A. Nimmagadda, and K.R.S.S. Rao, *An overview of the microbial α -amylase family*. African Journal of Biotechnology, 2003. **2**(12): p. 645-648.
33. Van Der Maarel, M.J.E.C., et al., *Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family*. Journal of biotechnology, 2002. **94**(2): p. 137-155.
34. Jaeger, K.-E., et al., *Bacterial lipases for biotechnological applications*. Journal of molecular catalysis B: enzymatic, 1997. **3**(1-4): p. 3-12.
35. Villeneuve, P., et al., *Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches*. Journal of molecular catalysis B: enzymatic, 2000. **9**(4): p. 113-148.
36. Selle, P.H. and V. Ravindran, *Microbial phytase in poultry nutrition*. Animal Feed Science and Technology, 2007. **135**(1): p. 1-41.
37. Mullaney, E.J., et al., *Phytases: attributes, catalytic mechanisms and applications*. Inositol phosphates: Linking agriculture and the environment, 2007: p. 97-110.
38. Lei, X.G., et al., *Phytase, a new life for an -old- enzyme*. Annu. Rev. Anim. Biosci., 2013. **1**(1): p. 283-309.
39. Suzuki, U., K. Yoshimura, and M. Takaishi, *Ueber ein Enzym "Phytase" das "Anhydro-oxy-methylen diphosphorsäure" Spaltet*. Bull. Coll. Agric. Tokyo Imp. Univ, 1907. **7**: p. 503-512.
40. McCollum, E.V. and E.B. Hart, *On the occurrence of a phytin-splitting enzyme in animal tissues*. Journal of Biological Chemistry, 1908. **4**(6): p. 497-500.
41. Dvorakova, J., *Phytase: sources, preparation and exploitation*. Folia microbiologica, 1998. **43**(4): p. 323-338.

42. Konietzny, U. and R. Greiner, *Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases)*. International journal of food science & technology, 2002. **37**(7): p. 791-812.
43. Ellestad, L.E., R. Angel, and J.H. Soares, *Intestinal phytase II: a comparison of activity and in vivo phytate hydrolysis in three teleost species with differing digestive strategies*. Fish Physiology and Biochemistry, 2002. **26**(3): p. 259-273.
44. Yanke, L.J., et al., *Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria*. Microbiology, 1998. **144**(6): p. 1565-1573.
45. Mukesh Kumar, D.J., et al., *Isolation, production & application of extracellular phytase by Serratia Marcescens*. Asian Journal of Experimental Biological Sciences, 2011. **2**(4): p. 663-666.
46. Greiner, R., K.D. Jany, and M.L. Alminger, *Identification and properties of myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases (phytases) from barley (Hordeum vulgare)*. Journal of Cereal Science, 2000. **31**(2): p. 127-139.
47. Cheryan, M. and J.J. Rackis, *Phytic acid interactions in food systems*. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 1980. **13**(4): p. 297-335.
48. Hurrell, R.F., et al., *Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects*. The American journal of clinical nutrition, 2003. **77**(5): p. 1213-1219.
49. Kumar, V., et al., *Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review*. Food Chemistry, 2010. **120**(4): p. 945-959.
50. Vohra, A. and T. Satyanarayana, *Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications*. Critical reviews in biotechnology, 2003. **23**(1): p. 29-60.
51. Rees, T.J., *The development of a novel antifungal silage inoculant*. 1997, Cranfield University.

52. Robinson, E.H., S. Jackson, and M.H. Li, *Supplemental phytase in catfish diets*. Aquaculture Magazine, 1996. **1**: p. 80-82.
53. Kornegay, E.T., et al., *Response of broilers to graded levels of microbial phytase added to maize- α -soyabean-meal-based diets containing three levels of non-phytate phosphorus*. British journal of Nutrition, 1996. **75**(6): p. 839-852.
54. Persson, H., et al., *Binding of Cu²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ to inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates*. Journal of agricultural and food chemistry, 1998. **46**(8): p. 3194-3200.
55. Jones, D.B. and F.A. Csonka, *Proteins of the cotton seed*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1925. **22**(4): p. 226-227.
56. Harland, B.F. and D. Oberleas, *Phytate in foods*, in *Energy. Nutrition of women*. 1987, Karger Publishers. p. 235-259.
57. Laboure, A.-M., J. Gagnon, and A.-M. Lescure, *Purification and characterization of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (Zea mays) seedlings during germination*. Biochemical Journal, 1993. **295**(2): p. 413-419.
58. Powar, V.K. and V. Jagannathan, *Purification and properties of phytate-specific phosphatase from Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 1982. **151**(3): p. 1102-1108.
59. Ullah, A.H.J. and D.M. Gibson, *Extracellular phytase (EC 3.1. 3.8) from Aspergillus ficuum NRRL 3135: purification and characterization*. Preparative biochemistry, 1987. **17**(1): p. 63-91.
60. Ullah, A.H.J., *Aspergillus ficuum phytase: partial primary structure, substrate selectivity, and kinetic characterization*. Preparative biochemistry, 1988. **18**(4): p. 459-471.

61. Ullah, A.H.J., *Production, rapid purification and catalytic characterization of extracellular phytase from Aspergillus ficuum*. Preparative biochemistry, 1988. **18**(4): p. 443-458.
62. Roy, S., A. Mehta, and R.R. Mishra, *Production and Characterization of Extracellular phytase: An Industrial Enzyme*. Vegetos-An International Journal of Plant Research, 2013. **26**(1): p. 83-87.
63. Kim, Y.-O., et al., *Purification and properties of a thermostable phytase from Bacillus sp. DS11*. Enzyme and Microbial Technology, 1998. **22**(1): p. 2-7.
64. Odibo, F.J.C. and R. Ulbrich-Hofmann, *Thermostable α -Amylase and Glucoamylase from Thermomyces lanuginosus F1*. Engineering in Life Sciences, 2001. **21**(2): p. 141-153.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Serap ŞABAHAT
Doğum Yeri ve Tarihi : KARAMAN/11.12.1988
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (e-posta) : serapss_70@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Karaman Sağlık Meslek Lisesi

Lisans : Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü -

.....

Yüksek Lisans : Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik
AD. 2016-Devam ediyor.

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Sağlık Bakanlığı;

Kars Devlet Hastanesi (2009-2016)

Ankara Elmadağ Devlet Hastanesi (2016-devam ediyor)

Yayımları (SCI ve diğer) :

Diğer konular