

**MİKROBİYAL FİTAZ ÜRETİMİNE VE AKTİVİTESİNE ETKİLİ
PARAMETRELERİN BELİRLENMESİ**

**DETERMINATION OF PARAMETERS AFFECTING THE
PRODUCTION AND ACTIVITY OF MICROBIAL PHYTASE**

KÜBRA ERKAN

Prof. Dr. NİLÜFER AKSÖZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2014

KÜBRA ERKAN'ın hazırladığı “**Mikrobiyal Fitaz Üretimine Ve Aktivitesine Etkili Parametrelerin Belirlenmesi** ” adlı çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

(Prof. Dr.,)

Danışman

(Prof. Dr., Nilüfer AKSÖZ)

Üye

(Prof. Dr.,)

Üye

(Prof. Dr.,)

Üye

(Doç. Dr.,)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Sevgili aileme,

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

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

beyan ederim.

27 /01 /2014

KÜBRA ERKAN

ÖZET

MİKROBİYAL FİTAZ ÜRETİMİNE VE AKTİVİTESİNE ETKİLİ PARAMETRELERİN BELİRLENMESİ

KÜBRA ERKAN

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. NİLÜFER AKSÖZ

OCAK 2014, 53 sayfa

Bu çalışmada doğal kaynaklardan izole edilen yeni bir mikrobiyal kaynaktan fitaz üretimi amaçlanmıştır. Mikroorganizma izolasyonu için ahır ve kümes çevrelerinden alınan 12 farklı toprak örneği kullanılmıştır. İzolatlar arasında K12 kodlu izolatın en yüksek fitaz üreticisi olduğu saptanmıştır. 16S rRNA dizi analizi sonucunda K12 izolatının *Bacillus subtilis* türüne ait olduğu ortaya çıkmıştır. Yüksek enzim üretimini sağlamak amacıyla K12 izolatının çeşitli üretim parametreleri optimize edilmiştir. Üretim ortamında en uygun karbon kaynağının glukoz ve en uygun azot kaynağının ise amonyum nitrat (NH_4NO_3) olduğu tespit edilmiştir. Glukoz, amonyum nitrat ve sodyum fitat varlığında 150 rpm çalkalama hızında, 72 saat 30°C 'de inkübasyonun fitaz üretimi için en uygun koşul olduğu belirtilmiştir. Optimize edilen üretim koşullarında elde edilen fitaz enzimi pH 6.5'da 60°C 'de 1:9 enzim substrat oranında en yüksek aktiviteye sahiptir. MgCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 ve CoCl_2 çözeltileri ve EDTA fitaz aktivitesinde kayba neden olurken CaCl_2 çözeltilisinin aktiviteyi artırıcı yönde etkisi olduğu tespit edilmiştir. Etanol ile kısmi olarak saflaştırılan enzimin SDS-PAGE jel elektroforezi sonucunda yaklaşık olarak 25 ve 17 kDa'luk iki farklı bant elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Fitaz, *Bacillus sp.*, 16S rRNA

ABSTRACT

DETERMINATION OF PARAMETERS AFFECTING THE PRODUCTION AND ACTIVITY OF MICROBIAL PHYTASE

KÜBRA ERKAN

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. NİLÜFER AKSÖZ

JANUARY 2014, 53 pages

In this study, the production of phytase is aimed from a new microbial source that was isolated from natural sources. 12 different soil samples that were taken from barn and coop surroundings are used for the isolation of microorganism. K12 coded isolate among whole isolates is determined to be the highest producer of phytase. As a result of 16S rRNA sequencing analysis, K12 isolate was found *Bacillus subtilis*. The various production parameters of K12 isolate were optimized in order to ensure high enzyme production. In production medium, glucose was founded as the most suitable carbon source and ammonium nitrate (NH_4NO_3) was found to be the most suitable nitrogen source. In the presence of glucose, ammonium nitrate and sodium phytate and at the agitation speed of 150 rpm, 72 hours incubation at 30°C is said to be the most suitable conditions for the production of phytase. Phytase enzyme that was obtained from optimized production conditions, at pH 6.5 at 60°C and enzyme substrate ratio of 1:9 has the highest activity. MgCl_2 , CuCl_2 , CoCl_2 , ZnCl_2 solutions and EDTA causing a loss of phytase activity whereas CaCl_2 solution has been found to be effective as an activity enhancer.

As a result of SDS-PAGE gel electrophoresis of enzyme that was partially purified with ethanol, approximately 25 and 17 kDa weight two different bands were obtained.

Keywords: Phytase, *Bacillus sp.*, 16S rRNA

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında engin bilgisi ve deneyimiyle yanımda olan, katkı ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ'e,

Çalışmalarım boyunca bilgisi, sabrı ve desteğiyle her zaman yanımda olan manevi ablam Arş. Gör. Demet ERDÖNMEZ'e,

Hayatımı yaşanılır kılan, her adımımın yanında olan, maddi manevi desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen canım annem Fatma ERKAN ve canım babam Bilal ERKAN'a,

Desteğini ve sevgisini her zaman yanımda hissettiğim , diğer yarım, ömrümün gülen yüzü kardeşim Tuğba ERKAN'a,

Varlığı ve sevgisi ile hayatımı güzelleştiren, güzel yüreğini her daim yanımda hissettiğim sevgili M. Fatih TÜRKMEN'e,

Manevi ailem Erkay ÖZGÖR, Fatoş ÖZGÖR ve minik meleğim Melis ÖZGÖR'e,

Arkadaşlıkları , dostlukları ve kardeşlikleri ile hayatımı renklendiren Ayşenur GENCER, Sebahat TEKCAN DÜĞENCİ, Özgecan ERDEM, Gizem YAŞAL, M. Hasan AKYIL, Hatice ERCAN, Tarık TÜRKMEN'e,

Bilgi ve desteğini çalışmalarım boyunca esirgemeyen sevgili Egemen FOTO ve Arş. Gör. Fatma ZİLİFDAR'a,

Biyoteknoloji Anabilimdalı hocalarına ve öğrencilerine,

En içten teşekkürlerimi Sunarım

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Enzimler ve özellikleri	3
2.1.1. Enzimler	3
2.1.2. Enzimlerin isimlendirilmesi	5
2.2. Fitik asit	7
2.2.1. Tarihçesi	7
2.2.2. Doğal dağılımı	7
2.2.3. Fizyolojik fonksiyonları	8
2.3. Fitaz.....	9
2.3.1. Fitaz enziminin ticari uygulama alanları	13
2.3.1.1. Yem sanayi.....	13

2.3.1.2. Gıda endüstrisi	15
2.3.1.3. Myo-inositol fosfat eldesi	15
2.3.1.4. Toprak zenginleştirme	15
2.4. <i>Bacillus sp.</i> 'nin genel özellikleri	16
2.4.1. <i>Bacillus sp.</i> 'nin endüstriyel önemi.....	17
3. MATERYAL VE METOD	18
3.1. Çalışmalarda kullanılan mikroorganizmalar.....	18
3.2. Mikroorganizma izolasyonu ve identifikasyonu	18
3.2.1. Bakteri üreme eğrisinin turbidometrik yöntemle belirlenmesi	18
3.3. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler	19
3.3.1. Sodyum-fitatlı besiyeri	19
3.3.2. Sodyum fitat çözeltisi.....	19
3.3.3. Enzim aktivitesi ölçümü için gerekli çözeltiler	19
3.3.3.1. Reaksiyonu durdurucu çözelti	19
3.3.3.2. Renklendirme çözeltisi	20
3.3.3.3. KH_2PO_4 çözeltisi.....	20
3.4. Enzim üretimine etkili fizyolojik koşulların saptanması	21
3.4.1.Çalkalamalı ve Statik İnkübasyon Şartlarının Fitaz Sentezine Etkisinin Saptanması	21
3.4.2. Çalkalama hızının fitaz sentezine etkisinin saptanması.....	21
3.4.3. İnkübasyon süresinin fitaz sentezine etkisinin saptanması	21
3.4.4. Fitaz sentezi için uygun sıcaklığın saptanması.....	21

3.4.5. Fitaz sentezi için uygun pH değerinin saptanması	21
3.4.6. Farklı karbon kaynaklarının fitaz sentezi üzerine etkisinin saptanması	22
3.4.7. Farklı azot kaynaklarının fitaz sentezi üzerine etkisinin saptanması	22
3.5. Enzim aktivitesinin belirlenmesi	22
3.5.1. Katı besiyerinde fitaz varlığının araştırılması	22
3.5.2. Sıvı besiyerinde fitaz üretiminin saptanması	22
3.6. Enzim aktivitesine etkili inkübasyon koşulları	24
3.6.1. Fitaz için uygun pH değerinin saptanması	24
3.6.2. Fitaz için uygun sıcaklık değerinin saptanması	24
3.6.3. Fitaz aktivitesi üzerine enzim-substrat oranının etkisi	24
3.6.4. İnhibitör ve divalent katyonların enzim aktivitesi üzerine etkisi	25
3.7. Fitaz enziminin kısmi olarak saflaştırılması	25
3.8. SDS PAGE yöntemi ile enzimin moleküler ağırlığının saptanması	25
3.8.1. SDS PAGE yöntemi için gerekli solüsyonlar	26
3.8.2. Ayırma jelinin hazırlanması	27
3.8.3. Yükleme jelinin hazırlanması	27
3.8.4. Örneğin ve standartın hazırlanması	28
3.8.5. Enzim örneklerinin SDS PAGE jeline yüklenmesi ve yürütülmesi	28
3.8.6. SDS PAGE jelinin boyanması ve görüntülenmesi	29
4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA	30
4.1. Mikroorganizma izolasyonu	30

4.2. Uygun mikroorganizma seçimi ve identifikasyonu	30
4.3. Bakteri üreme eğrisinin türbidometrik yöntemle belirlenmesi	36
4.4. Kalibrasyon grafiğinin belirlenmesi	36
4.5. Enzim üretimine etkili olan uygun fizyolojik oşulların saptanması	38
4.5.1. Çalkalamalı ve statik inkübasyon şartlarının fitaz sentezi üzerine etkisi	38
4.5.2. Çalkalama hızının fitaz sentezi üzerine etkisi	39
4.5.3. İnkübasyon süresinin fitaz sentezine etkisi	40
4.5.4. Fitaz sentezi için uygun inkübasyon sıcaklığı	41
4.5.5. Fitaz sentezi için uygun pH değeri	42
4.5.6. Farklı karbon kaynaklarının fitaz sentezi üzerine etkisi	43
4.5.7. Farklı azot kaynaklarının fitaz sentezi üzerine etkisi	44
4.6. İntraselüler ve ekstraselüler enzim üretimi	44
4.7. Enzim aktivitesine etkil inkübasyon koşulları	46
4.7.1. Fitaz aktivitesi için uygun pH değeri	46
4.7.2. Fitaz aktivitesi için uygun sıcaklık değeri	47
4.7.3. Fitaz aktivitesi üzerine enzim substrat oranının etkisi	48
4.7.4. İnhibitör ve divalent katyonların enzim aktivitesi üzerine etkisi	48
4.8. Fitaz enziminin kısmi olarak saflaştırılması	50
4.8.1. Enzim aktivitesinin tanımlanması	51
4.9. SDS-PAGE yöntemi ile enzimin moleküler ağırlığının saptanması	52
KAYNAKLAR	54

ÖZGEÇMİŞ	64
EK-1	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

μ l: mikrolitre

$^{\circ}$ C: Santigrad Derece

g: gram

ml: mililitre

mM: milimolar

mRNA: Messenger RNA

IUB:Uluslararası Biyokimya Birliđi

H⁺ : Hidrojen atomu

μ m: mikrometre

SDS : Sodyum dodesil sülfat

PAGE :Poliakrilamid jel Elektroforezi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Kofaktör çeşitleri	4
Şekil 2. 2. Holoenzim ve Apoenzim yapıları	5
Şekil 2. 3. (a) Fitik asitin molekül yapısı (b) Fitik asit - metal kompleksi	8
Şekil 2. 4. Fitik asitin doğadaki döngüsü	9
Şekil 2. 5. Fitazın hidroliz reaksiyonu a. myo- inositol hekzakisfosfat b. 1D-myo- inositol 1,2,3,5,6-pentakisfosfat c. Ortofosfat	10
Şekil 2. 6. <i>Bacillus subtilis</i>	16
Şekil 3. 1. Jelin polimerizasyonu	28
Şekil 3. 2. Örneklerin jele yüklenmesi	29
Şekil 3. 3. Örneklerin jelde yürütülmesi	30
Şekil 4. 1. a. Fitaz negatif suş b. Fitaz pozitif suş	31
Şekil 4. 2. NCBI veri tabanında dizi eşleşmesi	35
Şekil 4. 3. Fitaz pozitif suşun üreme grafiği	37
Şekil 4. 4. Fitaz aktivitesi için kalibrasyon grafiği	37
Şekil 4. 5. Çalkalama hızının fitaz sentezi üzerine etkisi	39
Şekil 4. 6. Fitaz sentezi için uygun inkübasyon süresi	40
Şekil 4. 7. Fitaz sentezi için uygun inkübasyon sıcaklığı	41
Şekil 4. 8. Fitaz sentezi için uygun pH değeri	42
Şekil 4. 9. Fitaz sentezi için uygun karbon kaynağı	43
Şekil 4. 10. Fitaz sentezi için uygun azot kaynağı	44

Şekil 4. 11. Ekstraselüler Fitaz Aktivitesi için Uygun pH Değeri	46
Şekil 4. 12. Ekstraselüler Fitaz Aktivitesi için Uygun Sıcaklık Değeri	47
Şekil 4. 13. Fitaz aktivitesine etkili uygun substrat miktarı	48
Şekil 4.14. a. Protein markerının kDa aralığı b. Fitaz enziminin SDS- PAGE sonucu	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2. 1. Enzim Sınıfları ve Bazı Örnekler	6
Çizelge 2. 2. Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Fitazlar ve Genel Özellikleri	12
Çizelge 2. 3. Ticari fitaz enzim örnekleri	14
Çizelge 3. 1. Sodyum fitatlı besiyeri bileşimi	19
Çizelge 3. 2. Fitaz enzimi kalibrasyon grafiğinin hazırlanması	20
Çizelge 3. 3. Enzim üretim ortamı	23
Çizelge 4. 1. Farklı çevrelerden izole edilen suşlar	32
Çizelge 4. 2. Sodyum fitatlı katı besiyerinde fitaz pozitif ve negatif suşlar	33
Çizelge 4. 3. Fitaz pozitif suşların zon çapları	36
Çizelge 4. 4. Çalkalamalı ve statik inkübasyon koşullarının fitaz sentezine etkisi	38
Çizelge 4. 5. EDTA ve Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine etkisi.....	49

1. GİRİŞ

Enzimler, çeşitli reaksiyonları katalizleyen biyokatalitik özelliğe sahip biyomoleküllerdir. Genellikle protein yapıda olan enzimler canlı organizmaların hayatsal fonksiyonlarını gerçekleştirmelerinde önemli rol oynarlar. Enzimler bu özellikleri ile araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir [1].

Birçok alanda geniş kullanım alanına sahip olan enzimler, başlıca gıda ve deterjan endüstrisinde kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde, ürün elde etmek ya da ürüne farklı özellikler kazandırmak amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Tatlandırıcılar, glukoz şurupları, fırıncılık, alkollü içkiler, önceden pişirilmiş tahıllar, bebek gıdaları, balık yemleri, peynir ve süt ürünleri, meyve suyu, alkolsüz içecekler ve bitkisel yağ örnek olarak verilebilir. Ayrıca hamur olgunlaştırmada ve etin yumuşatılması gibi uygulamalarda da enzimlerin kullanımı söz konusudur. Bu alanların dışında tekstil, kağıt üretimi, yem katkı maddesi olmak üzere çeşitli alanlarda da enzimlerden faydalanılmaktadır [2].

Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı mikrobiyal kaynaklıdır. Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktiviteleri bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre çok yüksektir. Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin stabiliteleri daha yüksektir. Ayrıca ucuz ve fazla miktarda elde edilebilmektedirler. Bu özellikler mikrobiyal kaynaklı enzimlerin endüstriyel kullanımını cazip kılmaktadır [3].

Beslenme son yıllarda artan nüfus oranı ile birlikte öncelikli sorunlardan biri haline gelmiştir. Gelişmekte olan ülkelerde tahıl ve baklagil türevi yiyeceklerin sıklıkla tüketimi, bu besinler üzerine olan besin değeri artırıcı çalışmalara ilgiyi artırmaktadır [4].

Hayvan yemi üretimi ve katkı maddesi kullanımında da enzimler büyük önem taşımaktadır. Hayvan beslenmesinde önemli bir yeri olan tahıllı bitkilerde bulunan "Myo-inositol 1,2,3,4,5,6 heksakis dihidrojen fosfat veya fitik asit" toplam fosforun yaklaşık % 80' ini oluşturmaktadır [5].

Fitazlar, fitik asitin hidrolizini sağlayarak yapısındaki fosfatları uzaklaştıran enzimlerdir. Son yıllarda kümes hayvanı yetiştiriciliğinde yem katkısı olarak önem kazanmıştır. Kümes hayvanları basit yapılı midelerinden dolayı fitik asitin fosfatından yararlanamazlar. Beslenmede oluşan fosfor eksikliği yemlere ilave edilen inorganik fosfat ile önlenmektedir. Ancak bu yöntem hem pahalı hem de hayvan dışkısı ile doğaya atılan fosfat miktarının artışına neden olmaktadır. Oluřacak fosfor kirliliğini azaltmak ve yemdeki fosfordan daha yüksek verimde faydalanmak adına fitaz enzimi yem katkısı olarak kullanılmaktadır. Fitaz enzimi çeşitli kaynaklardan elde edilmektedir. Bununla birlikte ticari olarak kullanılan fitaz enzimleri mikrobiyal kaynaklıdır [6].

Bu çalışmada topraktan izole edilen ve fitaz enzimi üreten suşlar arasından yüksek miktarda enzim üreten suşun seçimi ve bu mikroorganizmanın fitaz enziminin üretimine etkili fizyolojik özelliklerin incelenmesi ve optimal değerlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler ve Özellikleri

2.1.1. Enzimler

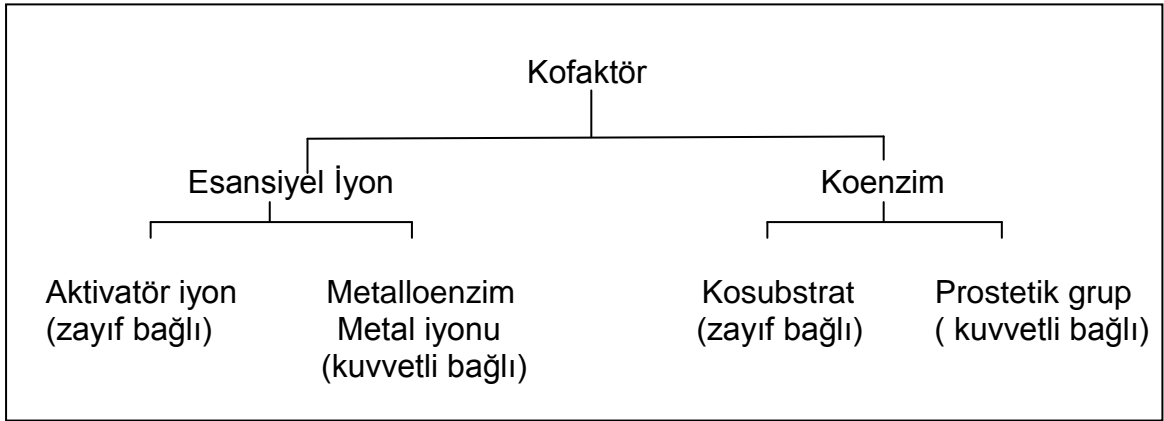
Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen hücre içi veya dışı karakterli olan, çeşitli biyokimyasal tepkimeleri katalizleyen, genellikle protein yapıdaki biyokatalizörlerdir. Enzimler, çeşitli biyokimyasal reaksiyonların hızını aktivasyon enerjilerini düşürerek arttırmaktadır. Enzimlerin en önemli özelliklerinden birisi de özgül aktivite göstermeleridir. Enzimler tarafından katalizlenen bir tepkimede, enzim ve substratı kimyasal ve kimyasal olmayan bağlar vasıtasıyla enzim-substrat ara kompleksi oluşturmakta ve reaksiyonun devamında ürün oluşurken enzim serbest hale gelerek tekrar aynı reaksiyon döngüsüne katılmaktadır [7].

Enzimler protein yapıdadır. Ancak son yıllarda bazı RNA moleküllerinin de (L19 RNA, snRNA vs) enzim aktivitesi gösterdikleri saptanmıştır. Genetik biliminde transkripsiyonun ardından RNA'daki intron adı verilen kısımların çıkarılarak ekzon bölgelerinin birleştirilmesi "splicing" olarak ifade edilir. Ökaryotlarda ekzon bölgelerinin birleştirilmesi sonucunda öncül mesajcı RNA (pre-mRNA) mesajcı RNA'ya dönüşür. Oluşan bu mRNA ise protein sentezinde kullanılır. Ekzon bölgelerinin birleştirilmesi bir dizi biyokimyasal tepkimeden oluşur. Bu tepkimeler splisozom adı verilen bir snRNP (small nuclear ribonucleoproteins=küçük çekirdeksel ribonükleoproteinler) kompleksi tarafından katalizlenir. RNA'dan intron bölgelerinin çıkarılıp ekzon kısımlarının uçlarının birleştirilmesi süreci 1977'de Philip Sharp ve Richard J. Roberts tarafından keşfedilmiştir [8, 9].

Enzimler polipeptit zincirler halinde sentezlenmektedir. Ancak, enzimin aktivite kazanabilmesi için polipeptidin sekonder, tersiyer ve bazı hallerde de kuarterner yapı kazanması gerekmektedir. Enzimi oluşturan polipeptit zincirinin primer yapısı, bu enzimin sentezinden sorumlu olan genler tarafından tayin edilmektedir. Eğer enzim tek polipeptit zincirden meydana gelmiş ve bir tek monomerden oluşmuş ise tersiyer yapıdan sonra enzim tamamen aktiftir [10].

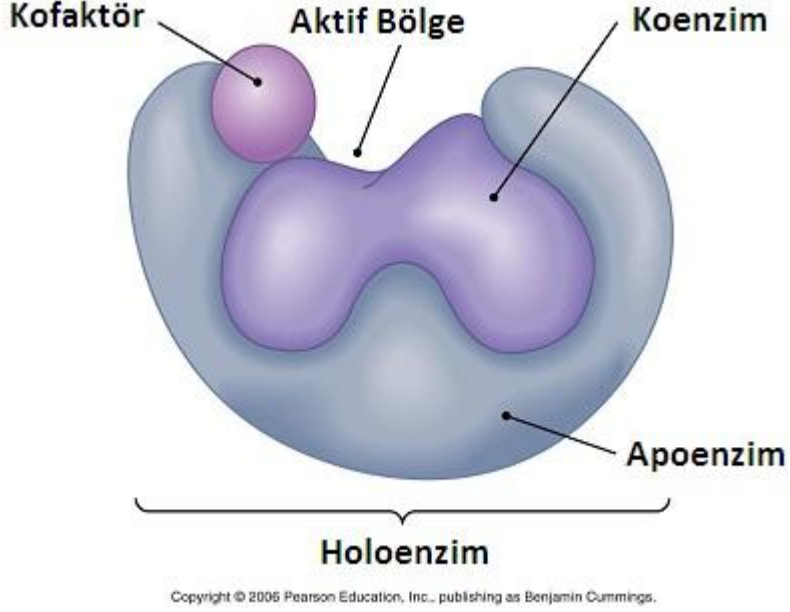
İki veya daha fazla monomerdan veya subüniteden meydana gelmiş olan enzim moleküllerinin alt birimleri aktivite gösterebilmek için daha üst yapılar meydana getirmek üzere belli bir düzen dahilinde bir araya gelmek zorundadır. Bu yapı şekli kuarterner yapıdır. Enzim molekülleri genellikle iki ya da daha fazla monomerdan oluştukları için kuarterner yapıdadırlar. Enzim proteinindeki aminoasitlerin özel dizilişi enzimin özel bir konformasyon ve kuarterner yapıyı kazanmasında en önemli rolü oynamaktadır [11].

Enzimlerin bir kısmı, katalizledikleri reaksiyonları gerçekleştirmek için protein yapıda olmayan moleküllere ihtiyaç duymaktadır. Bu moleküller metal iyonu ya da organik bileşik olabilmektedir ve koenzim veya kofaktör adını almaktadırlar. Çoğu enzimatik reaksiyonların katalizlenmesinde kofaktörler yer alır. Kofaktörler, metal iyonlarını içerirken koenzim olarak isimlendirilen grup ise transfer ajanlarını içerirler [12]. Enzime bağlanış biçimlerine göre de aşağıdaki şekilde isimlendirilirler (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kofaktör çeşitleri [13]

Kofaktör ve koenzimler enzimlere kovalent ya da non-kovalent şekilde bağlanabilirler. Enzime kovalent olarak bağlanan ve protein yapısında olmayan bu gruplar prostetik grup olarak adlandırılmıştır. Enzimin protein yapısında olan, ısı ile denatüre olabilen kısmına apoenzim denir. Apoenzim tek başına katalitik aktivite gösteremez. Ancak kofaktör, koenzim ya da her ikisi ile birleştiğinde katalitik aktivite gösterebilmektedir. Kofaktör ve/veya koenzimle ile apoenzimin oluşturduğu yapıya ise holoenzim denir(Şekil 2. 2). Enzimin özelliği ve özgüllüğü (spesifikliği) apoenzime bağlı olduğundan koenzimi aynı olan fakat etkileri farklı olan pek çok enzim vardır [14].



Şekil 2. 2. Holoenzim ve Apoenzim yapıları [15]

2.1.2.Enzimlerin İsimlendirilmesi

Enzimler katalizledikleri reaksiyonlar ve substratlar esas alınmak suretiyle isimlendirilmektedir. Enzimler, substratlarının veya reaksiyonun sonuna **-az-** takısı eklenerek isimlendirilir. Örneğin Üre (üreaz) , protein (proteinaz) veya oksidaz, dekarboksilaz gibi [16].

Enzim sınıflandırmalarındaki karışıklığın önlenmesi amacıyla Uluslararası Biyokimya Birliğinin (IUB) Enzim Komisyonu tarafından sistematik isimlendirme önerilmiştir. Bu sistemde her enzim, katalizlediği reaksiyon tipine ve mekanizmasına göre isimlendirilmektedir. Günlük kullanımda önerilen kısa isme ilaveten daha detaylı sistematik ismin kullanılması öngörülmüştür. Sistematik isimlendirme ile enzimler, reaksiyon mekanizmalarına göre 6 ana grupta incelenmektedir [17] (Çizelge 2. 1). Bunlar;

- 1. Oksidoredüktazlar :** Oksidasyon (yükseltgenme) ve redüksiyon (indirgenme) reaksiyonlarını katalizlerler.
- 2. Transferazlar:** Fonksiyonel bir grubun (H^+ dışında) bir molekülden diğerine transferini katalizlerler.
- 3. Hidrolazlar:** Su katılmasıyla kimyasal bağların parçalanmasını katalizleyerek hidroliz reaksiyonlarını gerçekleştiren enzimlerdir.

4. Liyazlar: Oksidasyon ve hidroliz reaksiyonları harici mekanizmalarla çeşitli kimyasal bağları kırabilen enzimlerdir. Çoğu zaman bu reaksiyonları çift bağ veya halka yapısı oluşturarak gerçekleştirmektedirler.

5. İzomerazlar: Bir molekül içindeki konformasyonel değişiklikleri katalizleyen enzimlerdir.

6. Ligazlar: Yüksek enerjili fosfatların enerjisini kullanarak, karbon ile C,O,S,N arasında bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir.

Enzim komisyonunca her enzime bir kod numarası verilmiştir (EC). Bu kod için dördü sayı grupları kullanılmaktadır. Dizideki birinci sayı enzimin hangi sınıfa dahil olduğunu göstermektedir. İkinci ve üçüncü sayılar alt ve daha alt sınıfları ifade etmektedir. Dördüncü sayı ise enzimin kendine özgü sıra numarasını belirtmektedir. Örneğin EC (2.7.1.1) ATP: glukoz fosfotransferaz (Hekzokinaz) [18]

Çizelge 2.1. Enzim Sınıfları ve Bazı Örnekler [19]

Ana gruplar	Enzim	Koenzim içeriği	E.C. kodu
1. Oksidoredüktaz	Laktat dehidrogenaz	NAD ⁺	1.1.1.27
2. Transferaz	Alanin Transaminaz	Piridoksal fosfat	2.6.1.2
3. Hidrolaz	Tripsin	-	3.4.21.4
4. Liyaz	Piruvat Dekarboksilaz	Tiamin pirofosfat	4.1.1.1
5. İzomeraz	Alanin Rasemaz	Piridoksal Fosfat	5.1.1.1
6. Ligaz	Glutamin sentetaz	ATP	6.3.1.2

2.2. Fitik Asit

2.2.1. Tarihçesi

Buğday, tahıl ve baklagil gibi bitkilerde fitik asit (myo-inositol heksakisfosfat ya da fitat) başlıca fosfor kaynağıdır. Fosfor, hayvanlarda büyüme, çoğalma ve kemik kalsifikasyonu için gerekli mineral kaynağıdır [20].

Fitik asit, ilk olarak 1855 ve 1856 yıllarında Hartig ve ark. tarafından, farklı bitkilerin tohumlarından nişasta olmayan ve küçük partiküller olarak izole edilmiştir. İlerleyen zamanlarda, çeşitli araştırmacılar fitatı küresel "globoid" formda izole etmiş kimyasal yapısının karbon, fosfor ve metal iyonlarından oluştuğu belirlenmiştir. 1897 yılında Winterstein tarafından "inositol-fosforik asit" ismi verilmiştir. 1968 yılında da IUPAC-IUB tarafından günümüzde geçerli olan "Myo-inositol 1,2,3,4,5,6 heksakis dihidrojen fosfat" olarak adlandırılmıştır [21].

2.2.2. Doğal Dağılımı

Fitik asit, çoğunlukla bitki tohumlarında, tohumun farklı yerleşim yerlerinde (mısırdaki çekirdeğin iç kısmında, buğday ve pirinçte çekirdeğin alevron tabakasında) bulunmaktadır [22].

Yağlı tohumlarda ve tahıl tanelerindeki fitik asit proteinle birlikte ve globoidlerin içinde yoğunlaşmış hücre içi inklüzyonlar halinde bulunmaktadır. Fitik asit'in, bazı bitki tohumlarında örneğin soyada ise özel bir yerleşimi yeri yoktur. Aynı zamanda sebze ve meyvelerin köklerinde ve yumrularında da fitik asit görülmektedir.

Yem bitkilerinden susam, kabak ve keten tohumu en yüksek fitik asit (%3.7-%4.7) içeriğine sahiptirler. Diğer yem bitkilerinde bu oran %1 ve %3 arasında değişmektedir. Yem bitkilerinin yanı sıra, tatlı su balıklarında, kaplumbağalarda ve kuşların çekirdekli alyuvarlarında da fitik asit bulunmaktadır [23].

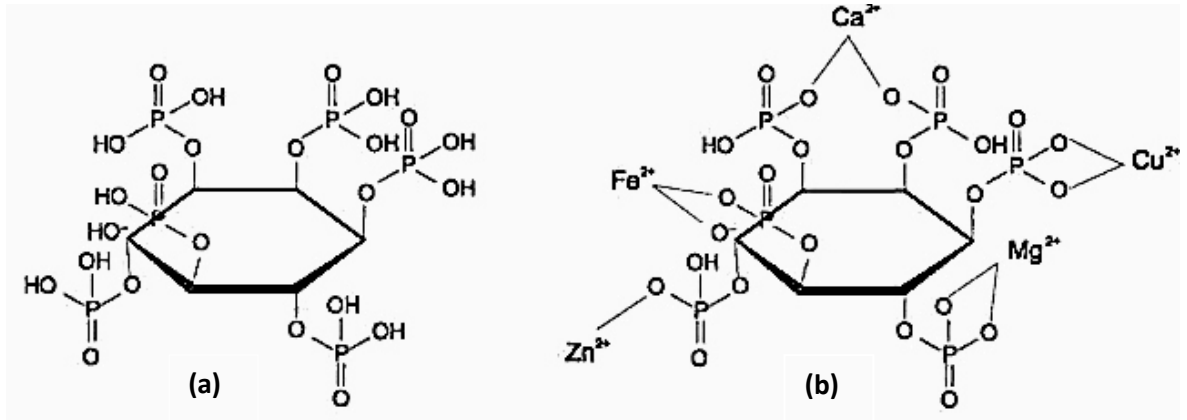
Fitik asit genellikle pirinç, buğday, bakla ve susam tohumlarında kalsiyum-magnezyum-potasyum-sodyum tuzları olarak bulunur. Fitik asitin tuzlarına fitat denilmektedir. Tohumlarda olgunlaşma dönemi boyunca protein, nişasta ve yağ gibi maddelerle birlikte fitik asit de hızla biriktirilir.

Tohumlarda bulunan fitik asit, tohum çimlenmesinde etkili olmakla birlikte tohumda fosfor deposu işlevi de görmektedir [24].

2.2.3. Fizyolojik Fonksiyonları

Fitik asit tohum çimlenmesi esnasında fosfor deposu işlevi görmektedir. Ancak monogastrik hayvanlarda ve insanlarda beslenmeye olumsuz etkileri de gözlenmektedir. Fitik asit, Ca^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} gibi birçok divalent katyonlar ile şelat oluşturarak kararlı yapı formuna dönüşerek bu minerallerin emilimini azaltmaktadır [25] (Şekil 2. 3).

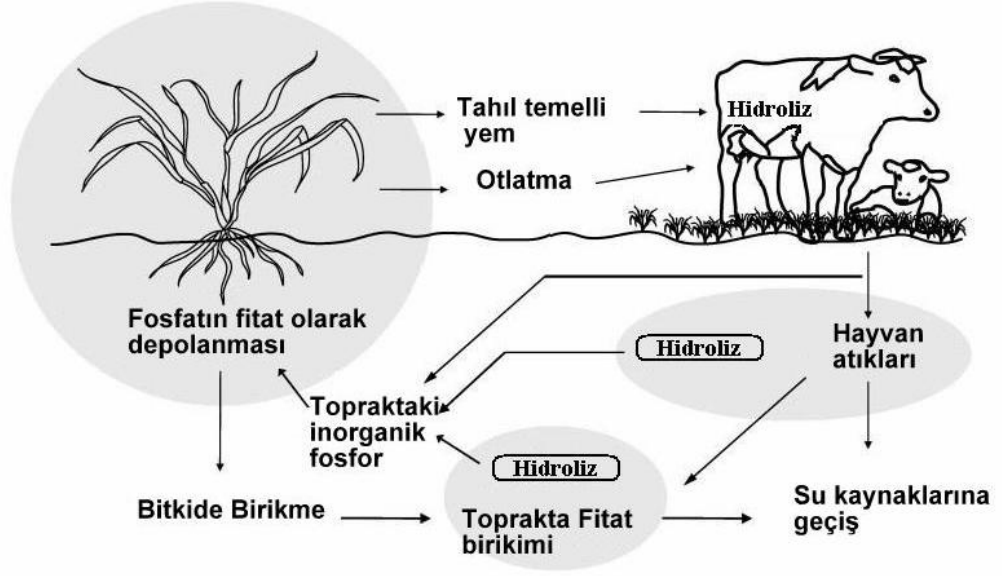
Fitik asit, düşük ve yüksek pH değerlerinde proteinler ile çeşitli kompleksler oluşturmakta ve proteinlerin yapısını değiştirmektedir. Bu reaksiyonlar sonucunda ise sindirim enzimlerinin çalışması (α -amilaz, pepsin, tripsin gibi endojen proteazlar) engellenirken, proteinler proteolitik sindirime karşı dirençli hale gelmektedir [26].



Şekil 2.3. (a) Fitik asitin molekül yapısı (b) Fitik asit - metal kompleksi [27]

Fitik asit, aktivitesi veya stabilitesi için metal iyonlarına ihtiyaç duyan bazı sindirim enzimlerinin fonksiyonlarını azaltmaktadır. Örneğin, karboksipeptidaz, amilaz, alkalın fosfataz, aminopeptidaz gibi bazı metallo enzimlerin ihtiyaç duydukları çinko ve kalsiyumla şelat yapısı oluşturarak aktivite kaybına neden olur [28].

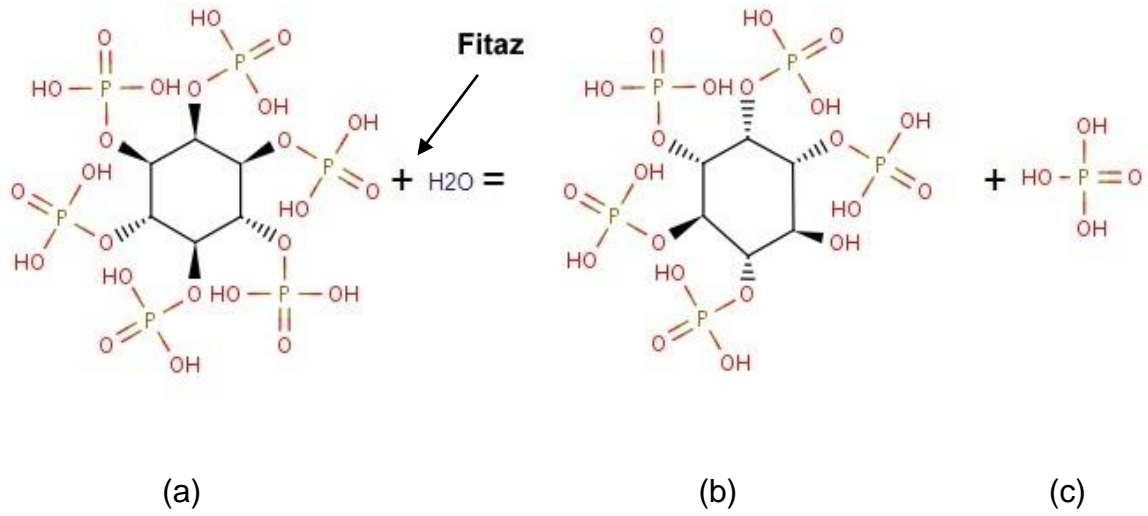
Fitik asit bünyesindeki fosforun büyük kısmı, fitaz enzimine sahip olmamaları nedeniyle çoğu monogastrik hayvanlar için kullanılamaz haldedir. Dışkı aracılığıyla doğaya atılan fitik asit, özellikle hayvancılığın yoğun olduğu bölgelerde toprakta fosfor kirliliğine neden olmaktadır. Ayrıca topraktan yer altı sularına geçen fosfor, sularda da alg patlamasına neden olmaktadır [29] (Şekil 2. 4).



Şekil 2.4. Fitik asitin doğadaki döngüsü [30]

2.3. Fitaz

Fitaz (myo-inositol heksakisfosfat hidrolaz, EC 3.1.3.8/ EC 3.1.3.26) fitik asiti daha az fosforlanmış myo-inositol türevlerine ve inorganik fosfata ayrıştıran enzimlerdir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Fitazın hidroliz reaksiyonu a. myo- inositol heksakisfosfat b.1D-myoinositol 1,2,3,5,6-pentakisfosfat c.ortofosfat [31]

Doğada mikroorganizmalara, bitkilere ve hatta bazı hayvan dokularına kadar uzanan geniş bir dağılım yelpazesi gösteren fitazlar IUPAC-IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry) tarafından iki sınıfa ayrılmıştır:

1. **EC 3.1.3.8:** 3-fitaz (myo-inositol-heksakisfosfat 3-fosfohidrolaz,) mikrobiyal fitazlar genellikle bu sınıfta yer almaktadır.
2. **EC 3.1.3.26:** 6-fitaz (myo-inositol-heksakisfosfat 6-fosfohidrolaz,) bitkisel fitazlar bu sınıfta yer almaktadır [32].

Diğer bir sınıflandırma şeklide fitaz enziminin üretildiği kaynağa göre sınıflandırılmasıdır. Üretildikleri kaynağa göre fitaz enzimleri 3 gruba ayrılmaktadır [33]. Bunlar:

1.Bitkisel Kaynaklı Fitaz: Bitkisel fitaz enzimi ilk olarak pirinç kepeğinden izole edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda fitazın bitki türleri arasında geniş bir çeşitlilik gösterdiği gözlemlenmiştir.

Bu bitkiler arasında buğday, çavdar, tritikale (buğday ile çavdar melezinden oluşur), arpa, malt çilinde yüksek oranda bulunmaktadır. Ayrıca turp, zambak, marul ve ispanaktan da fitaz elde edilmiştir [34;35].

2. Hayvansal kaynaklı Fitaz: Hayvansal fitaz ilk olarak Mc Collum ve Hart (1908) tarafından inek karaciğerinde ve kanında belirlenmiştir. İlerleyen çalışmalarda memeli kanında fitaz enzimine rastlanmamıştır [36]. Ancak kuş, sürüngen, balık ve deniz kaplumbağasında yapılan çalışmalarda kanda fitaz enzimi varlığı tespit edilmiştir. Çeşitli araştırmacılar tavuk, sığır, inek, domuz ince barsağından fitaz enzimini izole etmiştir. Geviş getiren hayvanlar ise fitaz aktivitesini rumen mikrobiyal flora elemanları aracılığıyla gerçekleştirmektedir [37].

3. Mikrobiyal Kaynaklı Fitaz: Mikrobiyal fitaz kaynakları içerisinde birçok bakteri, maya ve fungus türü girmektedir. Bakteriyel kaynaklı fitazlar *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella sp.* gibi birçok bakteri türünden elde edilmiştir [38].

Fungal kaynaklı elde edilen fitazların büyük bir kısmı *Aspergillus sp.*'den izole edilmiştir. Ayrıca *Penicillium* ve *Mucor* türlerinden de fitaz izole edilmiştir. Mayalardan ise *Candida intermedia*, *Candida tropicalis*, *Clavispora lusitanae*, *Saccharomyces cerevisiae* türlerinde izole edilmiştir [39].

Fitazlar genellikle ekstraselüler ya da intraselüler olmaktadır. Fungal fitazların birçoğu ekstraselüler fitazlardır. Bakteriyel fitazlar ise çoğunlukla intraselüler olmakla birlikte *Bacillus* türlerinde ekstraselüler fitaz aktivitesi de gözlenmiştir [40] (Çizelge 2. 2).

Çizelge 2. 2. Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Fitazlar ve Genel Özellikleri [41]

Bakteri	Optimum sıcaklık (°C)	Optimum pH	Moleküler ağırlık (kDa)
<i>Aerobacter aerogenes</i>	27	6.8	-
<i>Bacillus sp. DS11</i>	37	6.5	
<i>Bacillus subtilis</i>	60	6.0- 6.5	36-38
<i>Enterobacter sp.</i>	50	7.0-7.5	-
<i>Escherichia coli</i>	55	4.5	42
<i>Klebsiella aerogenes</i>	60-70	4.5-52	10-13, 700
Fungus	Optimum sıcaklık (°C)	Optimum pH	Moleküler ağırlık (kDa)
<i>Aspergillus ficuum</i>	55–60	4–6	85–100
<i>Aspergillus niger</i>	53	5.5	200
<i>Aspergillus terreus</i>	70	4.5	214
<i>Aspergillus oryzae</i>	50	5.5	120–140
Maya	Optimum sıcaklık (°C)	Optimum pH	Moleküler ağırlık (kDa)
<i>Saccharomyces castellii</i>	77	4.4	490
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45	4.6	–
Bitki	Optimum sıcaklık (°C)	Optimum pH	Moleküler ağırlık (kDa)
Kanola tohumu	50	5.2	-
Kabak	48	4.8	66.5
Soya fasulyesi	55	4.5-4.8	60
Kılçıksız buğday	45	6.0	68
Buğday kepeği	55	5.0-5.6	47
Hayvansal Doku	Optimum sıcaklık (°C)	Optimum pH	Moleküler ağırlık (kDa)
İnsan intestinal mukoza	-	7.4	-
Tavuk	-	8.25	-
Sıçan	-	7.0-7.5	70-90

Günümüzde ticari amaçla kullanılan fitaz enzimleri çoğunlukla mikrobiyal kaynaklıdır. Yaygın olarak *Aspergillus niger*, *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus fumigatus* kullanılmaktadır. Bakteriyel fitazlar substrat spesifitesi ve proteolizize karşı direnç gibi özellikleri ile fungal fitazlara farklı alternatifler oluşturmaktadır [42].

Ticari olarak kullanılan fitaz enzimlerinde ısıya dayanıklılığın artırılması için rekombinant DNA teknolojileri kullanılmaktadır. Örneğin, *E. coli* fitazının, *Pichia pastoris* kullanılarak modifiye edilmiş ticari enzim hali "Phytase Granular Feed Grade ® " adında granüler ticari enzim olarak Winovazyme Biological Science & Technology Co., Ltd. tarafından satılmaktadır (Çizelge 2. 3) [43].

2.3.1. Fitaz Enziminin Ticari Uygulama Alanları

2.3.1.1. Yem Sanayi

Bitkisel yemler, kanatlı kümes hayvanlarının beslenmesinde başlıca bileşendir. Bitkisel kaynaklarda fosfor kaynağı olarak fitik asit bulunmaktadır. Ruminant hayvanların mikroflorasında gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar ile fitik asitin parçalanması gerçekleşmektedir. Ancak, monogastrik canlıların barsaklarında özellikle domuz ve kanatlı hayvanlarda fitaz enzimi çok az üretilmekte ya da üretilmemektedir. Bu nedenle beslenmelerine yem katkısı olarak inorganik fosfor ilave edilmektedir. Bu durum hayvan yetiştiriciliği yapılan bölgelerde doğaya atılan fosfor miktarının artışına neden olmaktadır. Fosfor ilavesi hem maliyeti hem de fosfat kirliliğini artırmaktadır. Hayvan yem katkısı olarak eklenen fitaz enzimi fosfattan yararlanılabilirliği artırmaktadır [44].

Balık yetiştiriciliğinde kullanılan bitkisel kökenli yemlerde fitik asit bulunmaktadır. Ancak bunu parçalayacak fitaz enzimi balıklarda yer almadığından bu yemlerde bulunan fitik asitin fosforundan yararlanılması için yemlere fitaz ilavesi yapılmaktadır. Bu bağlamda, sularda fosfor düzeyinin artışı önlenmiş olmakla birlikte bitkisel fosforun da yararlanılabilirliği artırılmaktadır [45].

Çizelge 2.3. Ticari fitaz enzim örnekleri [46]

Ürün	Şirket	Protein Kökeni	Tür	Ekspresyon	NCBI Kodu	pH optimumu	Sıcaklık optimumu
Allyzme® SSF	Alltech	<i>Aspergillus niger</i>	3	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-
Finase® EC	AB Vista	<i>E. coli</i> AppA	6	<i>Trichoderma reesei</i>	M58708	4.5	55
Finase® P/L	AB Vista	<i>Aspergillus niger</i> Phy B	3	<i>Trichoderma reesei</i>	L20567	2.5	-
Natuphos®	BASF	<i>Aspergillus niger</i> Phy A	3	<i>Aspergillus niger</i>	CAA78904	2.0,5-5.5	65
Optiphos®	Enzyvia JBS United	<i>E. coli</i> AppA2	6	<i>Pichia pastoris</i>	AAR87658	3.4-5.0	58
Phyzyme®	Dupont Industrial Bioscience	<i>E. coli</i> AppA	6	<i>Schizosaccharo myces pombe</i> ATCC 5233	M58708	4.5	55
Ronozyme® P	Novozyme ve DSM	<i>Peniophora lycii</i> Phy A	6	<i>Aspergillus oryzae</i> DSM 14223	CAC48195	4-4.5	50-55

2.3.1.2. Gıda Endüstrisi

Fitik asitin divalent iyonlarla şelat yapma özelliği besinlerden alınan kalsiyum, magnezyum, demir, çinko, bakır gibi minerallerin alınımını olumsuz etkilemektedir. Fizyolojik pH değerlerinde şelat halindeki fitik asit- mineral kompleksi çözünmez haldedir. Bu durum fitik asit içeriği yüksek diyetle beslenen toplumlarda düşük mineral emilimi görülmesine yol açmaktadır. Fitaz enziminin gıda üretimi sırasında kullanılması ile insanlarda mineral madde emiliminde artış olması amaçlanmaktadır [47]. Gıda sanayinde gıdaların işlenmesi sırasında fitaz ilavesi ekmek yapımı, bitkisel protein izolatlarının üretimi ve tahıl kepeklerini parçalamak amaçlı kullanılmaktadır [48].

2.3.1.3. Myo- inositol Fosfat Eldesi

İnositol fosfatlar ve fosfolipidler transmembran sinyalizasyonunda ve intraselüler kaynaklardan kalsiyumun iletiminde görev almaktadır. Fitaz enzimi myo-inositol fosfatı parçalayarak serbest myo-inositol türevleri açığa çıkarmaktadır. Bu özelliğinden yola çıkılarak fitaz enzimleri myo-inositol fosfat eldesi için farklı bir alternatif oluşturmaktadır [49].

Çeşitli araştırmacılar bu amaçla *Saccharomyces cerevisiae* ve *E.coli* fitazı kullanarak fitik asitin enzimatik olarak hidrolizinden myo-inositol fosfat türevleri hazırlamışlardır. Yine aynı araştırmacılar daha sonraki çalışmalarında inositol fosfat türelerinin eklem iltihabı ve astım gibi solunum hastalıklarına karşı kullanıldığı bildirmiştir [50].

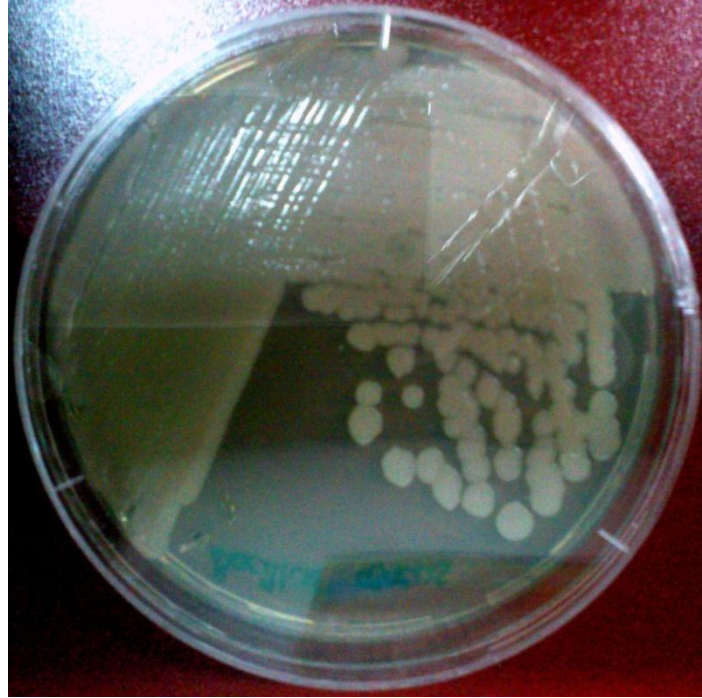
2.3.1.4. Toprak Zenginleştirme

Çeşitli alanlardaki topraklarda fitik asit ve türevleri toplam organik fosforun %50'sini oluşturabilmektedir [51]. Bu özelliği göz önüne alan araştırmacılar mısır bitkisi için topraktaki fitik asitten fosforun kullanılabilmesinde fitazın etkisini araştırmışlardır [52].

Toprağa fitaz ilave edildiğinde fitik asitin parçalanma oranının arttığını ve buna bağlı olarak büyümenin de uyarıldığını bildirmişlerdir. Bu çalışma, bitkilerin köklerinde fitaz geninin ekspresyonu ile transgenik bitkilerle topraktaki fosforun kullanılabilmesi ile ilgili araştırmalara yön vermektedir [53].

2.4. *Bacillus sp.*'nin Özellikleri

Bacillus cinsi bakteriler Gram pozitif, çubuk şekilli, sporlu mikroorganizmalardır. *Bacillus sp.* aerob ya da fakültatif anaerob, genellikle R tipi koloni özelliği göstermektedir. Peritriş flagellaları ile hareketlidir. Aerobik ve fakültatif anaerob olup endospor oluştururlar. Tek ya da gruplar halinde gelişebilen, çift veya zincir şeklindedirler. Vejetatif hücreler 0.5x1.2 µm ile 2.5x10 µm çapındadır. Genellikle beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir (Şekil 2. 6). Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklerde pigmentli kolonilere de rastlanmaktadır [54].



Şekil 2.6. *Bacillus subtilis*

Çoğu *Bacillus* türü kalın bir peptidoglikan tabakasına sahiptir. Birçok türünde hücre duvarı çapraz bağlı mezo-diamino-pimelik asitten oluşur. Toprakta sıklıkla rastlanan *Bacillus* genusu patojen ve patojen olmayan türleri içermektedir. Olumsuz çevre koşullar altında endospor oluşturarak uzun süre spor formunda kalabilmektedirler.

Oluşturdukları endospor silindirik, oval, yuvarlak veya böbrek şeklinde olabilir. Bunun dışında sporlar hücre içerisinde sentral ya da subterminal olarak yerleşebilir [55]. *Bacillus*'ların termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunur. Çok yüksek sıcaklık derecelerinde bile canlı kalırlar. Genellikle 35-37°C'de ve pH 7.0 civarında ürerler.

Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren, nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi ürerler. Tipik habitatları toprak olmasına rağmen doğada geniş olarak, süt ve süt ürünlerinden, hava, su ve yiyecek gibi birçok ortamdan elde edilirler [56].

Genelde prototrof olan *Bacillus* cinsinde oksotrof türler de mevcuttur. *Bacillus*'lar çok çeşitli metabolik özelliklerinin yanı sıra, farklı fizyolojik yetenekleri ile de geniş bir yelpazeye sahiptir. Pek çok türü psikrofil veya termofil olabilirken, asidofilik ya da alkalifilik karakter göstermeleri ya da haloterant, halofil olmaları mümkündür. Bu nedenle endüstriyel uygulamalarda kullanılma potansiyelleri yüksektir [57].

2.4.1 *Bacillus*'ların Endüstriyel Önemi

Bacillus cinsi bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstride büyük öneme sahiptir. Bu cinse ait bakteriler kolay üretilibilmeleri nedeniyle de çalışmalarda sıklıkla tercih edilirler. Olumsuz koşullara dayanıklılık, metabolizma çeşitliliği, geniş bir çevrede dağılım göstermeleri önemli avantajları arasındadır [58].

Bacillus türleri çoğu farklı endüstriyel alanlarda kullanılan birçok enzim ve endüstriyel ürünün üreticisidir. *Bacillus*'ların bazı türleri yiyecekler için önemli olabilirler. Bazı *Bacillus*'ların proteolitik enzimleri peynir yapımında kullanılabilir. Bu bakterilerin yağları ve proteinleri parçalama yetenekleri çok yüksektir. Bazı türleri de böcek patojenidir. *Bacillus*'ların birkaç türü polipeptid sınıfından antibiyotik üretir [59].

Endüstriyel kullanım alanı oldukça geniş dağılım gösteren bu enzimler arasında, proteaz, selülaz, amilaz, glukoz izomeraz, pullunaz, fitaz yer almaktadır [63]. Bakteriyel enzim kaynakları arasında sıkça kullanılan *Bacillus* türleri fitaz enzim üretiminde de tercih edilmektedir. Literatürde, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* gibi *Bacillus* türlerinin fitaz üretimi amaçlı kullanımı gözlenmektedir [60].

3.MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar

Bu çalışmada kullanılan bakteriler Tokat ilindeki kümes ve ahır çevrelerinden alınan 12 farklı toprak örneğinden izole edilmiştir. Örnekler önceden steril edilmiş 250 mL hacimli kapaklı steril cam şişelere, steril spatül yardımıyla alınmıştır. Mikroorganizmaların izolasyon işlemi tamamlanincaya kadar +4⁰C'de muhafaza edilmiştir.

3.2. Mikroorganizma İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Toprak örneklerinin her birinden 10 gram tartılıp 100 ml serum fizyolojik içinde vorteks ile homojenize edilmiştir. Örnekler 37⁰C'de 24 saat boyunca etüvde bekletilmiştir. Etüvde bekletilen örneklerden 1/10 oranında sulandırım yapılmış ve en uygun seyreltim oranı olarak seçilen 10⁻⁶lık seyreltimden 100 µl örnek Nutrient Agar besiyerine tek koloni ekim tekniğine uygun bir şekilde yayılmıştır. 37⁰C'de 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra tek koloniler (karışık kültürler tekrar izolasyona tabi tutulmuştur) sodyum fitatlı besiyerine steril kürdan ile nokta ekim tekniği ile inokule edilmiştir. Bu besiyerinde fitaz pozitif mikroorganizmalar saptanmıştır (Bkz Bölüm 3.5.1) [61].

Fitaz pozitif mikroorganizmaların DNA izolasyonu "Bioeksen Medikal ve Biyoteknolojik Araştırma Sistemleri" tarafından Bioseepdy DNA izolasyon kiti ® protokülüne uygun şekilde yapılmış ve 16S rRNA dizi analizi ile tür tayini gerçekleştirilmiştir (Bkz. Ek-1)

3.2.1. Bakteri Üreme Eğrisinin Türbidometrik Yöntemle Belirlenmesi

Fitaz pozitif bakteri örnekleri Sodyum fitatlı sıvı besiyerine inokule edilerek 30⁰C'de 96 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Her saat başı spektrofotometrede (Shimadzu UV-1700 UV-visible Spectrophotometer®) 600 nm'de ölçüm yapılmıştır. Ölçüm tamamlandıktan sonra elde edilen sonuçlar ile bakterilerin üreme eğrisi grafiği elde edilmiştir [61].

3.3. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltileri

3.3.1. Sodyum- Fitatlı Besiyeri

Bu besiyeri fitaz pozitif mikroorganizmaların belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır [62] (Çizelge 3.1). Besiyerinde agar hariç tüm kimyasal Sigma Aldrich ®'ten temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Sodyum fitatlı besiyeri bileşimi [62]

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

Besiyeri pH'sı 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl tamponları ile pH 7 ± 0.1'e ayarlandıktan sonra 121⁰C'de 1,5 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir.

3.3.2. Sodyum fitat çözeltisi

Fitaz substratı olarak 2 mM 100mL sodyum fitat çözeltisi hazırlanmıştır. Sodyum fitat daha önceden hazırlanan pH 5.5 sodyum asetat tamponu içerisinde çözülmüştür [63].

3.3.3. Enzim Aktivitesi Ölçümü İçin Gerekli Çözeltiler

3.3.3.1. Reaksiyonu Durdurucu Çözelti

Reaksiyonu durdurmak için distile suda hazırlanan %5'lik TCA (Trikloroasetik asit) çözeltisi kullanılmıştır [64].

3.3.3.2. Renklendirme Çözeltisi

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

Çözelti 2: 2,5 g amonyum molibdat, çözelti 1'de çözündürülerek %2,5(w/v)'luk çözelti 2 hazırlanmıştır.

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

Renklendirme çözeltisi dört hacim çözelti 2, bir hacim çözelti 3 ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Bu çözelti her deneyden önce taze olarak hazırlanmıştır [65].

3.3.3.3. KH_2PO_4 Çözeltisi

Potasyum dihidrojen fosfat çözeltisi 0,012 g KH_2PO_4 , 240 mL distile su içersinde çözülerek, 50 $\mu\text{g/mL}$ KH_2PO_4 çözeltisi olarak hazırlanmıştır. Kalibrasyon grafiği hazırlanması için, Çizelge 3.2'de belirtildiği gibi hazırlanan örneklerin her birinden 1 mL tüplere alınmış ve 1,5 mL renklendirme çözeltisi ilave edilmiştir. Vortekslenen (İka Vortex 3®) karışımların absorbansı 700 nm dalga boyunda, spektrofotometrede köre karşı ölçülmüştür. Bu değerler kullanılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur [66].

Çizelge 3.2. Fitaz enzimi kalibrasyon grafiğinin hazırlanması

	Kör	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4
dH ₂ O(mL)	5	4,9	4,75	4,5	4,25
Stok çözelti (KH_2PO_4) (mL)	0	0,1	0,25	0,5	0,75
Hazırlanan Çözeltinin Konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)		1	2,5	5	7,5

3.4. Enzim Üretimine Etkili Fizyolojik Koşulların Saptanması

3.4.1.Çalkalamalı ve Statik İnkübasyon Şartlarının Fitaz Sentezine Etkisinin Saptanması

Statik ve çalkalamalı inkübasyon koşullarının enzim sentezine etkisini araştırmak üzere fitaz pozitif olarak belirlenen potent suş sodyum fitatlı besiyerine iki paralel olacak şekilde inokule edilmiştir. Deney grubunda biri statik etüvde 30°C'de 72 saat, diğeri ise çalkalamalı inkübatörde 150 rpm'de 30°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda her iki deney grubunda da fitaz aktivitesine ve üreme miktarı ölçülmüştür.

3.4.2. Çalkama Hızının Fitaz Sentezine Etkisinin Saptanması

Çalkalamalı inkübasyon ortamında çalkalama hızının etkisini saptamak için 5 farklı hız (50,100,150,200,250 rpm) seçilmiştir. Her çalkalama hızı için ayrı ayrı sodyum fitatlı besiyerine mikroorganizma inokule edilmiştir. Kültürler 30°C'de 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda fitaz aktivitesi ve üreme miktarı ölçülmüştür.

3.4.3. İnkübasyon Süresinin Fitaz Sentezine Etkisinin Saptanması

Sodyum fitatlı besiyeri inokule edilen potent suş 150 rpm çalkalama hızında 96 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi boyunca 24 saatlik aralıklarla kültür ortamındaki üreme ve fitaz aktivitesi ölçülmüştür.

3.4.4. Fitaz Sentezi İçin Uygun Sıcaklığın Saptanması

Beş farklı deney gurubu için, sodyum fitatlı besiyerine potent suş inokule edilmiş ve 5 farklı sıcaklık derecesinde(20,25,30,35,40°C) 150 rpm'de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında üreme miktarı ve fitaz aktivitesi ölçülmüştür.

3.4.5. Fitaz Sentezi İçin Uygun pH Değerinin Saptanması

Fitaz sentezi için uygun pH değerinin saptanması amacıyla 1 M NaOH, 1 M HCl, 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl tamponları kullanılarak pH 3.0-9.0 arasında değişen pH değerlerinde sodyum fitatlı besiyeri hazırlanmıştır.

Bu besiyerlerine potent suş inokule edilmiş ve 150 rpm'de 30°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda fitaz aktivitesi ve üreme miktarı ölçülmüştür.

3.4.6. Farklı Karbon Kaynaklarının Fitaz Sentezi Üzerine Etkisinin Saptanması

Fitaz sentezi için uygun karbon kaynağını saptamak amacıyla maltoz, glukoz, nişasta ve laktoz kullanılmıştır. Sodyum fitatlı besiyerinde kullanılan glukoz miktarı ile aynı miktarda (20 g/L) eklenerek besiyeri modifiye edilmiştir. Bu besiyerine potent suş inokule edilmiş ve 150 rpm'de 30°C'de pH 7.0'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda fitaz aktivitesi ve üreme miktarı ölçülmüştür.

3.4.7. Farklı Azot Kaynaklarının Fitaz Sentezi Üzerine Etkisinin Saptanması

Fitaz sentezi için besiyeri içeriğindeki uygun azot kaynağını saptamak amacıyla 4 farklı azot kaynağı (NH₄NO₃, maya özütü, pepton ve NaNO₃) sodyum fitatlı besiyerinde kullanılan amonyum nitrat ile aynı miktarda (5 g/L) sodyum fitatlı besiyerine eklenmiştir. Hazırlanan besiyerlerine potent suş inokule edilmiş ve 150 rpm'de 30°C'de pH 7.0'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda fitaz aktivitesi ve üreme miktarı ölçülmüştür.

3.5 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

3.5.1. Katı Besiyerinde Fitaz Varlığının Araştırılması

Bölüm 3.2'de bahsedildiği gibi toprak örneklerinden izole edilen koloniler sodyum fitatlı besiyerine nokta ekim tekniği ile inokule edilmiştir. İnokule edilen suşlar 30°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında koloni etrafında oluşan şeffaf zon oluşumu incelenmiştir. Zon oluşumu gözlenen mikroorganizmalar fitaz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.5.2. Sıvı Besiyerinde Fitaz Üretiminin Saptanması

Katı besiyerinde fitaz pozitif olarak değerlendirilen suşlar çizelge 3.3'de gösterilen enzim üretim ortamına Mc Farland No:0.5 bulanıklığına kullanılarak inokule edilmiştir. 30°C'de 72 saat 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra 11000 rpm'de +4°C'de 5 dakika santrifüje edildikten sonra süpernatant ve çökelti kısmı ayrılmıştır.

Çizelge 3.3. Enzim üretim ortamı

Besiyeri Bileşimi	g/L
D-glukoz	20
Sodyum fitat	4
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	2
Amonyum nitrat (NH ₄ NO ₃)	5
Potasyum klorür (KCl)	0,5
Magnezyum sülfat (MgSO ₄ (7H ₂ O))	0,5
Demir sülfat (FeSO ₄ (7H ₂ O))	0,01
Mangan sülfat (MnSO ₄ (7H ₂ O))	0,01
Potasyum dihidrojen fosfat(KH ₂ PO ₄)	0,5
Dipotasyum hidrojen fosfat(HK ₂ PO ₄)	0,4

1. Ekstraselüler Fitaz Aktivitesi

Ekstraselüler fitaz aktivitesi için daha önce bahsedildiği üzere her örneğin süpernatant kısmından fitaz aktivitesi ölçülmüştür. Süpernatanttan alınan 100 µL enzim örneği ile 900 µL substrat vorteks ile karıştırıldıktan sonra 15 dakika 37°C'de su banyosunda inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasında reaksiyonu durdurmak amacıyla 750 µL %5'lik TCA ilave edilmiştir. Bu karışıma 1,5 mL renklendirme çözeltisi eklendikten sonra 15 dakika oda sıcaklığında beklenmiş ve 11000 rpm'de 5 dakika santrifüje edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra örnekler köre karşı 700 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür [67].

2. İntraselüler Fitaz Aktivitesi

Bölüm 3.4.2'de bahsedildiği üzere santrifüje edilen her örneğin çökelti kısmından fitaz aktivitesi tayini yapılmıştır. İntraselüler aktivite tayini için kullanılacak olan çökelti kısmı buz dolu bir kap içerisine alınarak homojenize edilmiştir.

Homojenizattan alınan 100 µL enzim ile 900 µL substrat vorteks ile karıştırıldıktan sonra 15 dakika 37°C'de su banyosunda inkübe edilmiştir.

Reaksiyonu durdurmak için 750 µL %5'lik TCA ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımına 1,5 mL renklendirme çözeltisi eklendikten sonra 15 dakika oda sıcaklığında beklenmiş ve 11000 rpm'de 5 dakika santrifüje edilmiştir.

Santrifüj işleminden sonra örnekler köre karşı 700 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır [68].

3.6. Enzim Aktivitesine Etkili İnkübasyon Koşulları

3.6.1. Fitaz İçin Uygun pH Değerinin Saptanması

Aktivite gösterdiği pH değerinin saptanması için pH 3.0-10.0 arasında değişen farklı pH değerlerine sahip ve içerisinde 2 mM sodyum fitat bulunan substrat çözeltisi hazırlanmıştır. Aktivite tayini için 100 µL enzim ile 900 µL substrat vorteks ile karıştırıldıktan sonra 15 dakika 37°C'de su banyosunda inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için 750 µL %5'lik TCA eklenmiştir. Reaksiyon tüplerine 1,5 mL renklendirme çözeltisi eklendikten sonra 15 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra 11000 rpm'de 5 dakika santrifüje edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra örnekler köre (100 µl tampon ve 900 µl substrat) karşı 700 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür.

3.6.2. Fitaz İçin Uygun Sıcaklık Değerinin Saptanması

Optimum sıcaklığın saptanması için 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C'lik sıcaklıklar seçilmiştir. Aktivite tayini için 100 µL enzim ve optimum pH değerinde hazırlanmış 900 µL substrat karıştırılmış 1,5 ml renklendirme çözeltisinde eklenerek spektrofotometrede 700 nm'de aktivite tayini yapılmıştır.

3.6.3. Fitaz Aktivitesi Üzerine Enzim-Substrat Oranının Etkisi

Fitaz aktivitesine substrat enzim oranının etkisini saptamak üzere 10 paralel halinde aktivite ölçüm ortamı hazırlanmıştır. Bu çalışmada standart aktivite tayininde kullanılan 100 µl enzim 900 µl substrat oranının dışında, kaba enzim miktarı 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 µl olarak eklenirken substrat ise 950, 900, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500 µl miktarında eklenmiştir.

Bu oranlarda hazırlanan reaksiyon tüpleri vortekslelendikten sonra 15 dakika 37°C'de su banyosunda inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için 750 µL %5'lik TCA eklenmiştir. Reaksiyon tüplerine 1,5 mL renklendirme çözeltisi eklendikten sonra 15 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra 11000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra örnekler köre karşı 700 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür.

3.6.4 İnhibitör ve Divalent Katyonların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzim inhibitörü olarak EDTA, metal iyonları olarak MgCl₂, CuCl₂, CaCl₂, ZnCl₂ ve CoCl₂ kullanılmıştır. İnhibitör ve metal iyonlarının stok çözeltisi hazırlanmıştır. Enzim ve çözelti karışımının son konsantrasyonu 1 mM (1 µL çözelti ve 99 µL enzim) ve 5 mM (5 µL çözelti ve 95 µL enzim) olacak şekilde hazırlandıktan sonra 1 saat 37°C'de ön inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ön inkübasyondan sonra 100 µL enzim ve 900 µL substrat karıştırılarak en uygun pH ve sıcaklıkta değerlerinde standart aktivite tayini yapılmıştır.

3.7. Fitaz Enziminin Kısmi Olarak Saflaştırılması

Bölüm 3.5.2.'de belirtildiği gibi süpernatant ve çökelti kısmı ayrılmış süpernatant Whatman No:1 kağıdından geçirildikten sonra toplam hacmin %70'i etil alkol olacak şekilde %96'lık soğuk etanol eklenerek süspansiyon -20°C'de 1 gece boyunca bekletilmiştir. Alkol süspansiyonu 11000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüje edilmiştir. Daha sonra çökelti halindeki konsantre olmuş enzim, pH'sı 5.5 olan 0,1 M sodyum asetat tamponunda çözülerek SDS-PAGE yöntemi ile moleküler ağırlığının belirlenmesinde kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır [70].

3.8. SDS-PAGE Yöntemi İle Enzimin Moleküler Ağırlığının Saptanması

Fitaz enziminin moleküler ağırlığının saptanması amacıyla %10'luk SDS-PAGE kullanılmıştır. %12 konsantrasyonda ayırma jeli ve %5 konsantrasyonda yükleme jeli hazırlanmıştır [71].

3.8.1. SDS-PAGE Yöntemi İçin Gerekli Solüsyonlar

Solüsyon A (Monomer (akrilamid/bis) Çözeltisi)

30 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Buzdolabında +4°C'de koyu renkli şişede saklanmıştır [70].

Solüsyon B (4X)

18.17 g Tris base, 4 mL %10'luk SDS 100mL distile suda çözülmüştür. 1N HCl ile pH 8.8'e ayarlanmıştır. Buzdolabında +4°C'de saklanmıştır [71].

Solüsyon C (4X)

6.06 g Tris base, 4 mL %10'luk SDS 100 mL distile su çözülmüştür. 1N HCl ile pH 6.8'e ayarlanmıştır. Buzdolabında+ 4°C'de saklanmıştır [71] .

%10 SDS

10 g SDS distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir [71].

%10 Amonyum Persülfat (APS)

SDS-PAGE jellerinin hazırlanmasında polimerizasyon başlatıcı olarak kullanılmıştır. 0,5 g Amonyum Persülfat distile su ile 5 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti kullanımdan hemen önce hazırlanmalıdır [71].

TEMED (N, N, N', N'-tetramethylene-ethylenediamine)

Polimerizasyonun gerçekleşmesi için katalizör olarak kullanılmıştır [71].

Örnek Yükleme Tamponu (62,5 mM Tris (pH 6.8), %2 SDS, %10 gliserol, 0,72M 2-β-merkaptotanol, %0,05 bromfenol mavisi)

0,075 g Tris 5 mL distile suda çözüldükten sonra HCl ile pH 6.8'e ayarlanmış ve 0,2 g SDS, 1 mL gliserol, 0,0855 mL 2-β-merkaptotanol, 0,005 g bromfenol mavisi eklendikten sonra distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Kullanılacak hacimlere bölünerek -20°C saklanmıştır [72].

Yürütme Tamponu (0,025M Tris, 0,192 M glisin, %0,1 SDS, pH 8.3)

3 g Tris, 14,4g glisin, 1g SDS tartıldıktan sonra distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Buzdolabında +4°C'de saklanmıştır [71].

Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyama Çözeltisi

SDS-PAGE jelinin elektroforez işleminden sonra boyanması ve protein bantlarının görünür hale gelmesi amacı ile kullanılmıştır. 1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 boyası 500 mL metanolde çözündürüldükten sonra 100 mL asetik asit eklenerek çözelti distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Bu çözelti oda sıcaklığında saklanabilir [71].

Yıkama (bağlanmamış boyayı uzaklaştırma 'destaining') Çözeltisi

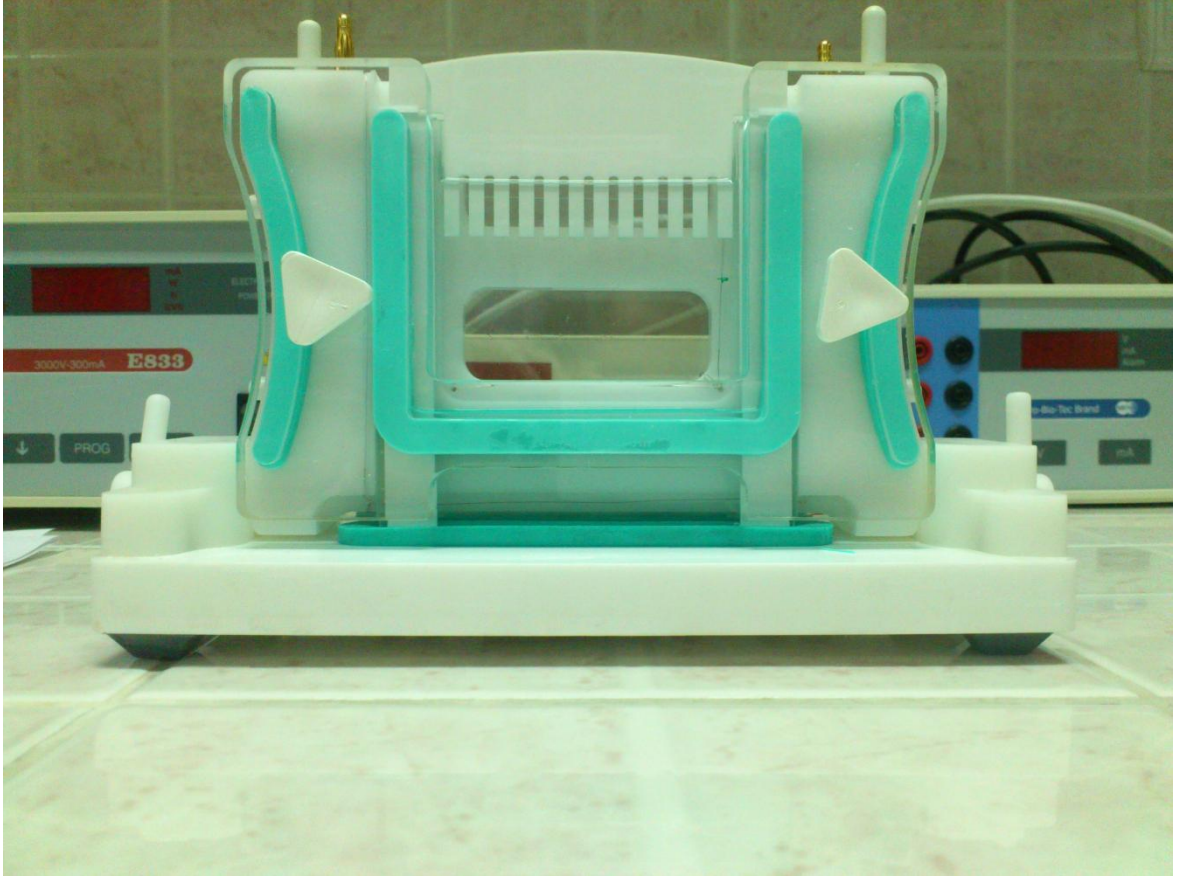
SDS-PAGE jelinin Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyandıktan sonra jeldeki boya fazlalığının geri alınarak bantların netleşmesi amacı ile kullanılmıştır. 125 mL metanol, 175 mL asetik asit ve 2200 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında 1 ay saklanabilir [73].

3.8.2. Ayırma Jelinin Hazırlanması (%12' lik)

8 mL Monomer (Solüsyon A), 5 mL Tampon (Solüsyon B), 7 mL distile H₂O karışımına 66 µL Amonyum persülfat ve 15 µL TEMED eklenerek jel kasetine otomatik pipet yardımıyla yeterli miktarda doldurulmuştur. Jelin üst yüzeyi atmosferik oksijenin difüzyonunu önlemek ve düzgün bir tabaka elde etmek amacı ile ince bir su tabakası veya 0.3 mL su ile doyurulmuş n-butanol ile kapatılarak oda sıcaklığında 30-60 dakika süreyle polimerizasyon gerçekleştirilmiştir (Şekil.3.1) [74].

3.8.3. Yükleme Jelinin Hazırlanması (%5' lik)

Ayırma jelinin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra jelin üst yüzeyindeki distile su dökülerek, 1,5 mL Monomer (Solüsyon A), 2,25 mL Tampon (Solüsyon C), 5,25 mL distile su karışımına sonra 30 µL Amonyum persülfat ve 10 µL TEMED eklenerek ayırma jelinin üzerine otomatik pipet yardımıyla yeterli miktarda dengeleme jeli dökülüp örnek kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Jelin polimerizasyonu

Atmosferik oksijen difüzyonunu önlemek amacıyla üst yüzey su ile kaplanmış ve oda sıcaklığında 30-60 dakika süreyle polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra tarak kuyucukların bozulmamasına dikkat edilerek yavaşça çıkarılmıştır [75; 76].

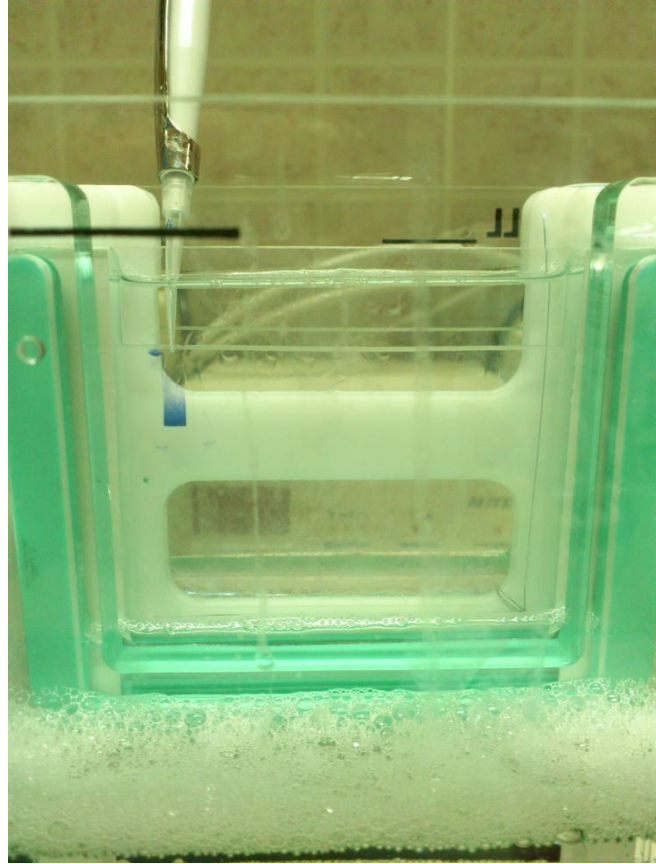
3.8.4. Örneğin ve Standartın Hazırlanması

Enzim ve örnek yükleme tamponu eşit hacimde ependorf tüpünde karıştırılmıştır. Aynı zamanda standart (marker) protein karışımı da örnek yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra tüm tüpler 10 dakika 90°C'de kaynar su banyosunda bekletilmiştir [77].

3.8.5. Enzim Örneklerinin SDS-PAGE Jeline Yüklmesi ve Yürütülmesi

Protein örnekleri 40 µL, marker protein ise 10 µL konsantrasyonda jele yüklenmiştir (Şekil.3.2).

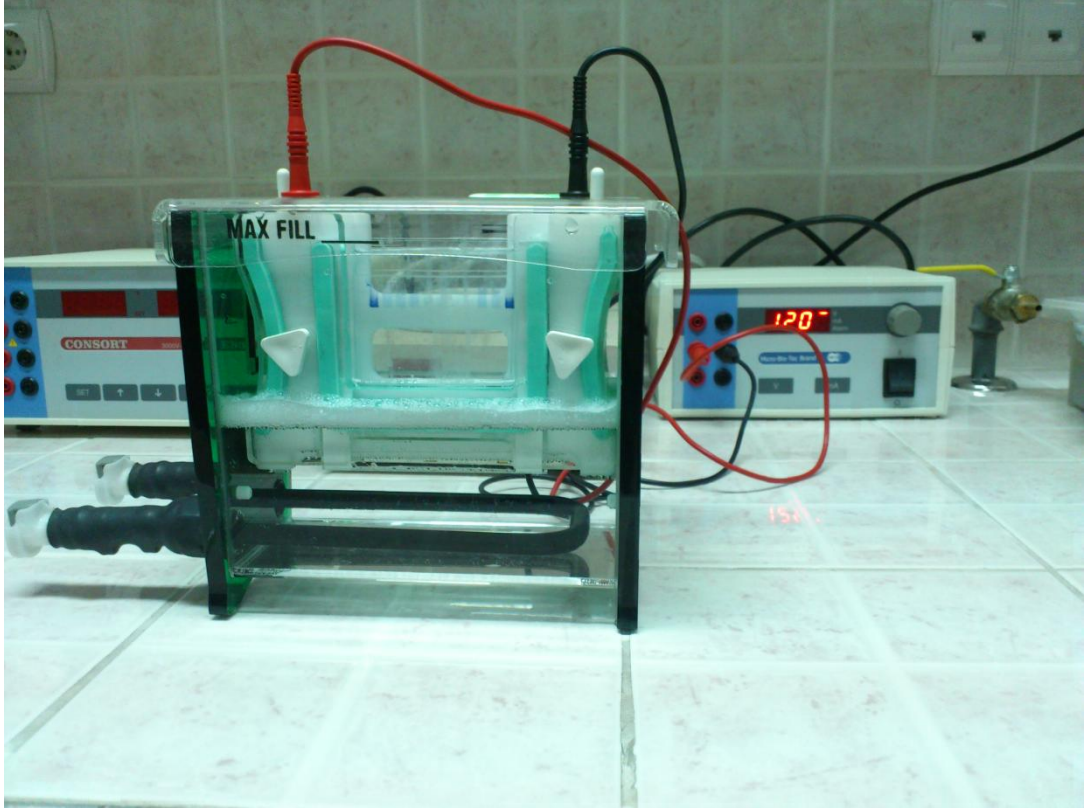
Yürütme tamponu elektroforez sisteminin alt bölümündeki işaretli yere kadar doldurulduktan sonra jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Elektroforez sisteminin üst bölümü de yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Sistem güç kaynağına bağlanarak 120 volt akımda yaklaşık 4 saat yürütülmüştür (Şekil 3. 3) [78].



Şekil 3.2. Örneklerin jele yüklenmesi

3.8.6. SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Görüntülenmesi

Elektroforez işleminden sonra jel dikkatlice cam plakalar arasından çıkarılmış ve Coomassie Brilliant Blue R-250 ile 24 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üstünde boyanmıştır. Boyama işleminden sonra jele bağlanmış fazla boyanın uzaklaştırılması için birkaç kez boyayı geri alma çözeltisi değiştirilerek 1 gece boyayı geri alma çözeltisinde bekletilen jel, şeffaflaşması için %10 gliserol ihtiva eden gliserollü su içinde 3 saat bekletilmiş ve görüntülenmiştir [78].



Şekil 3.3. Örneklerin jelde yürütülmesi

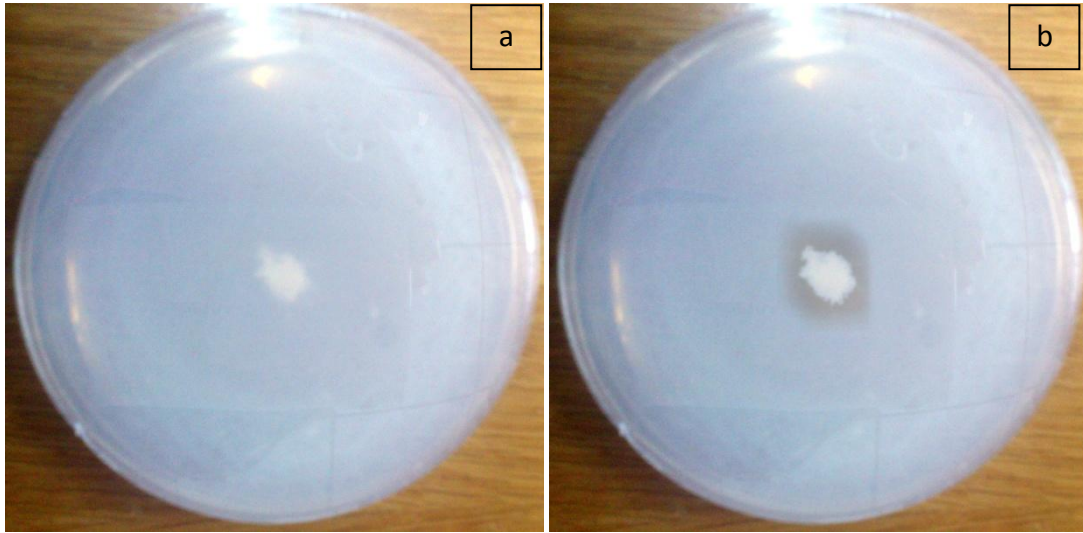
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Mikroorganizma İzolasyonu

Çalışmamızda kullanılan mikroorganizmalar Bölüm 3.1'de bahsedildiği gibi Tokat ilindeki kümes ve ahır çevrelerinden alınan 12 farklı toprak örneğinden izole edilmiştir. Çizelge 4.1.'de gösterildiği üzere 32 adet mikroorganizma izole edilmiştir. İzolasyon işlemi gerçekleşen bu mikroorganizmaların sodyum fitatlı besiyerinde fitaz enzimi üretilip üretilmediği test edilmiş ve üretici mikroorganizmalar saptanmıştır.

4.2. Uygun Mikroorganizma Seçimi ve İdentifikasyonu

Toprak örneklerinden izole edilen koloniler sodyum fitatlı besiyerine nokta ekim tekniği ile inokule edilmiştir. Ardından inokule edilen suşlar 30°C'de 96 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında koloni etrafında oluşan şeffaf zon oluşumu incelenmiştir (Şekil 4.1). Zon oluşumu en fazla gözlemlenen suşlar fitaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.1. a. Fitaz negatif suş b. Fitaz pozitif suş

Çizelge 4.1. Farklı çevrelerden izole edilen suşlar

Mikroorganizmanın İzolasyon Bölgesi	İzole Edilen Mikroorganizma Kodu
Ahır 1	A1, A2
Ahır 2	A3, A4
Ahır 3	A5
Ahır 4	A7
Ahır 5	A6, A8, A9, A10, A11, A12, A13
Ahır 6	A14, A15
Kümes 1	K1 , K2
Kümes 2	K3, K4, K5, K6
Kümes 3	K7, K8, K9, K10, K11
Kümes 4	K12, K13
Kümes 5	K14,K15
Kümes 6	A16, A17

Çizelge 4.2. Sodyum fitatlı katı besiyerinde fitaz pozitif ve negatif suşlar

Fitaz Pozitif Suşlar	Fitaz Negatif Suşlar
A1	A2, A3, A4, A5, A7, A8, A9, A10
A6	K4
K1	K5
K2	K6
K3	K8
K7	K9
K12	K10
A16	K11
A17	K13
K14	A11, A12, A13, A14, A15, K15

İzole edilen 32 mikroorganizma içerisinde 10 adet mikroorganizma fitaz pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu mikroorganizmalardan zon çapı en geniş olan mikroorganizma seçilerek sıvı besi yerinde enzim üretimine geçilmiştir (Çizelge 4. 3). Deneylerin devamında kullanılmak üzere seçilen bu mikroorganizmanın tür düzeyinde teşhisi için 16S rRNA analizi yapılmıştır. Sekans analiz sonucunda mikroorganizma *Bacillus subtilis* (accession numarası KC733848.1 %99 eşleşme) olduğu belirlenmiştir(Şekil 4. 2). Yapılan çalışmalarda topraktan izole edilen bakteri popülasyonu arasında çoğunlukla *Bacillus* cinsi yer almaktadır. Dongre ve ark. pamuk tarlasından *Bacillus subtilis* izole etmiş ve 16S rRNA analizi ile tür tayini yapmıştır [79]. Ahmed ve ark., topraktan *Bacillus subtilis* MH-4 izolasyonu gerçekleştirmiş ve bu izolattan antibiyotik üretmiştir [80]. Bu çalışmada topraktan izolasyonu gerçekleştirilen *Bacillus subtilis* üzerinden deneylere devam edilmiştir. *Bacillus subtilis* ile fitaz aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar da mevcuttur.

Kim ve ark., topraktan, haşlanmış pirinçten ve geleneksel Kore kojisinden *Bacillus* sp. izolasyonu yapmışlardır. Bu izolatlardan *Bacillus* sp. KHU-10'dan ekstraselüler fitaz elde etmişlerdir [81]. Vijayasai ve ark. ise toprak solucanında izole ettikleri *Bacillus subtilis*'ten fitaz üretimi gerçekleştirmiştir [82]. Jorquera ve ark., Şili'de volkanik tarım topraklarından *Paenibacillus* spp. izole etmiş ve fitaz gen varlığını PCR yöntemi ile göstermişlerdir [83]. Yapılan çalışmalarda yalnızca topraktan değil farklı ortamlardan da izole edilen mikroorganizmalardan da fitaz varlığı tespit edilmiştir. Kumar ve ark., bataklık suyundan bakteri izolasyonu yapmışlardır. İzole edilen 21 bakteri suşu içinden 8 izolatta fitaz pozitif özellik olduğunu gösteren şeffaf zonlar saptanmıştır [84]. Çalışmamızda izolasyon materyali olarak kullanılan toprak örnekleri ahır ve kümes çevresinden alınmıştır. Toprak örneklerinden elde edilen suşlardan kümes toprağından izole edilen K12 izolatu en yüksek fitaz aktivitesi göstermiştir. Daha önce belirtildiğı gibi K12 izolatu 16S rRNA analizi sonucunda *Bacillus subtilis* olarak tanımlanmıştır. Çalışmamıza benzer sonuçlar mevcuttur. Sreedevi ve ark. ahır ve tavuk çiftliğinde alınan toprak örneklerinden izole ettikleri *Bacillus subtilis* C43 suşundan fitaz üretimini gerçekleştirmişlerdir [85]. Ahır ve kümes bölgesinde hayvanların dışkılarında bulunan fitaz üreticisi mikroorganizmaların dışkı aracılığıyla dış ortama atılması ve burada bulunması mümkündür. Ayrıca toprağına karışan fitik asiti parçalama özelliğı olan mikroorganizmaların bu bölgelerde yoğunlukla bulunacağı düşünöldüğünden ahır ve kümes çevresinden alınan toprak örnekleri alınmıştır.

Daha öncede belirtildiğı üzere topraktan izole edilen suşları fitaz enzimi varlığı tespitinde sodyum fitatlı katı besiyerine nokta ekim yapılmıştır. İnkübasyon sonrası koloniler etrafında zon oluşumu belirlenmiş ve şeffaf zon oluşturan koloniler fitaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen izolatlar çerisinde en geniş zon çapını 3,3 cm ile kümes bölgesi toprağından izole edilen K12 suşu vermiştir. Bu suşun 16S rRNA analiz sonucunda *Bacillus subtilis* olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda çeşitli toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus* türlerinin fitaz ürettiğı tespit edilmiştir. Ushasri ve ark. yaptığı çalışmada pamuk tarlasında aldıkları toprak örneğinde *Bacillus* sp. NBtRS6 suşunu izole etmişlerdir [86]. Bu izolatu sodyum fitatlı katı besiyerinde 12 cm zon çapı verdiğı belirtilmiştir. Costa ve ark. yaptığı çalışmada bozkırdan ve amazon yağmur ormanlarından alınan toprak örneklerinden *Chromobacterium* sp. suşları izole etmişlerdir. Bu izolatların sodyum

fitatlı katı besiyerinde oluşturdukları zon çapları 1 cm ile 12 cm arasında değişim göstermektedir [87].

Bacillus subtilis strain SK25.001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [gb|KC733848.1](#) Length: 1482 Number of Matches: 1

Range 1: 19 to 1455 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2647 bits(1433)	0.0	1436/1437(99%)	1/1437(0%)	Plus/Plus
Query 1	GATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGC	60		
Sbjct 19	GATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGC	78		
Query 61	CTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGC	120		
Sbjct 79	CTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGC	138		
Query 121	ATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATT	180		
Sbjct 139	ATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATT	198		
Query 181	GCTAGTTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA	240		
Sbjct 199	GCTAGTTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA	258		
Query 241	TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC	300		
Sbjct 259	TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC	318		
Query 301	TTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGAT	360		
Sbjct 319	TTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGAT	378		
Query 361	CGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGG	420		
Sbjct 379	CGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGG	438		
Query 421	TACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGC	480		
Sbjct 439	TACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGC	498		
Query 481	AAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT	540		
Sbjct 499	AAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGT	558		
Query 541	GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGA	600		
Sbjct 559	GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGA	618		
Query 601	GGAGAGTGGAAITCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGG	660		
Sbjct 619	GGAGAGTGGAAITCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGG	678		

Şekil 4.2. NCBI veri tabanında dizi eşleşmesi

Çizelge 4.3. Fitaz pozitif suşların zon çapları

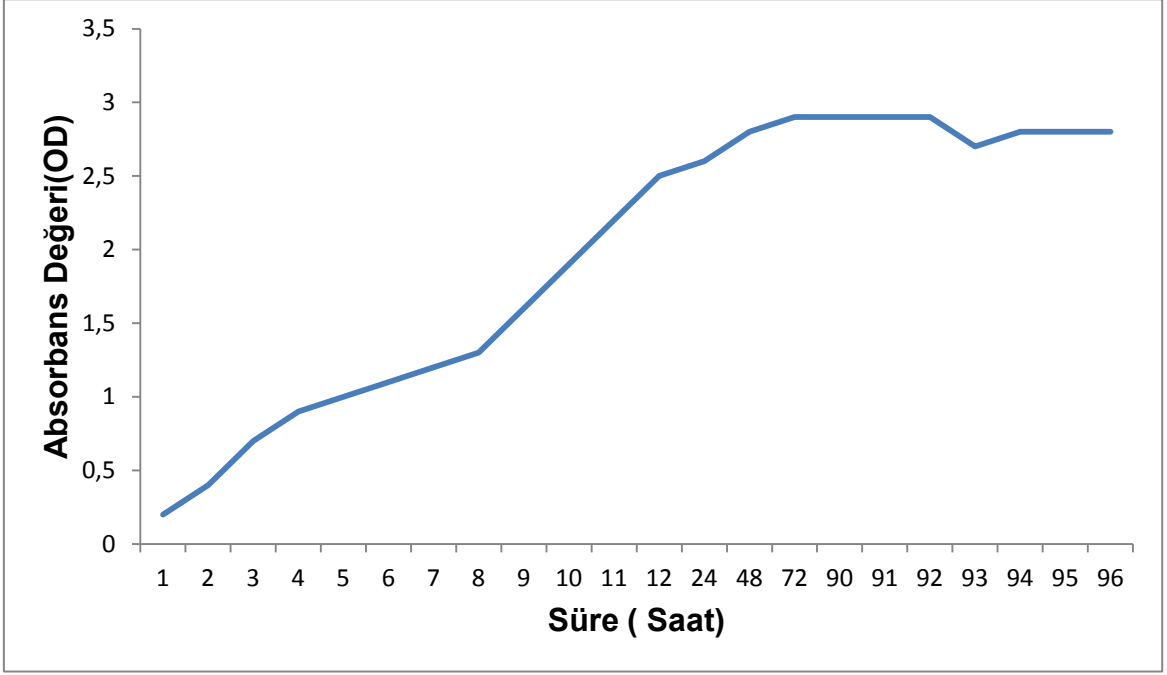
Mikroorganizma Kodu	Zon Çapı (cm)
A1	1,3
A6	1,2
K1	1,4
K2	1,5
K3	1,9
K7	2,3
K12	3,3
A16	2,7
A17	2,5
K14	2,6

4.3. Bakteri Üreme Eğrisinin Türbidometrik Yöntemle Belirlenmesi

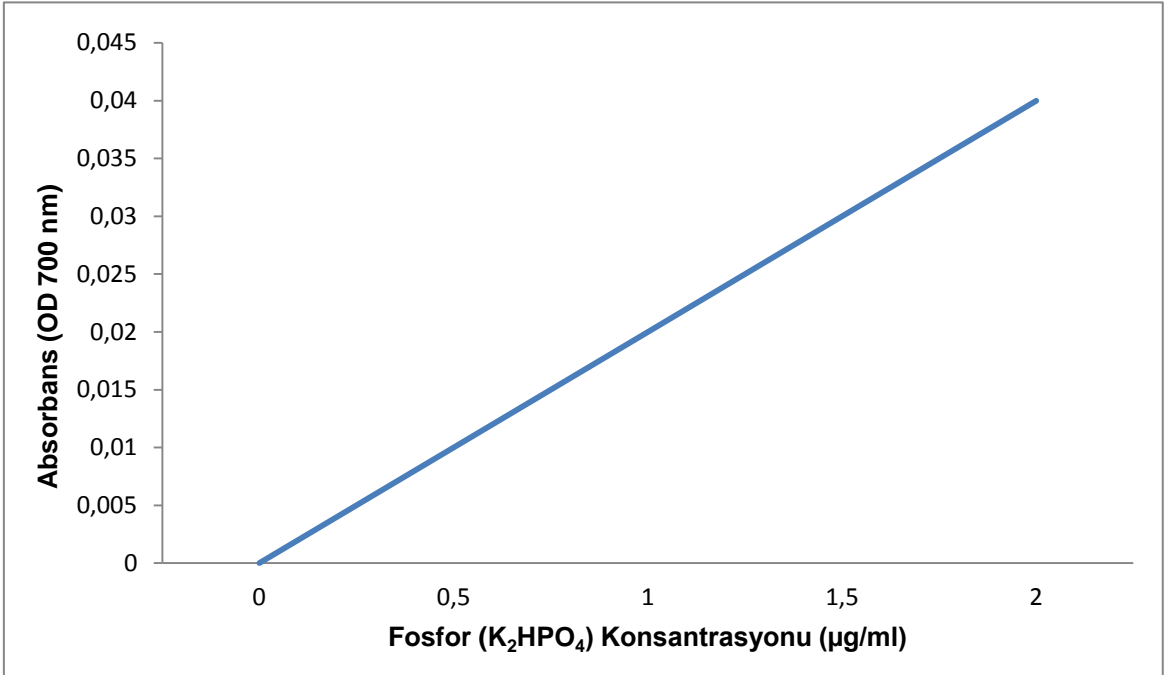
Fitaz pozitif bakteri örnekleri Sodyum fitatlı sıvı besiyerine inokule edilerek 30°C'de 96 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Her saat başı spektrofotometrede 600 nm'de ölçüm yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre üreme grafiği oluşturulmuştur (Şekil.4.3). Bu sonuçlara göre 8. saatten itibaren bakterinin üreme hızının arttığı 72. saate ise en yüksek değerine ulaşarak durgunluk dönemine girdiği görülmektedir.

4.4. Kalibrasyon Grafiğinin Belirlenmesi

Fitaz aktivitesinin hesaplanması için, 0.5,1, 2.5, 5 ve 7.5 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan KH₂PO₄ çözeltilerinin 700 nm'deki absorbans değerleri saptanmıştır. Şekil.4.4'de KH₂PO₄ konsantrasyonları ve absorbans değerleri arasındaki doğrusal ilişki verilmiştir. Grafikten elde edilen eğim değeri aktivite hesaplaması formülünde kullanılmıştır.



Şekil 4.3. Fitaz pozitif suşun üreme grafiği



Şekil 4.4. Fitaz aktivitesi için kalibrasyon grafiği

4.5. Enzim Üretiminde Etkili Olan Uygun Fizyolojik Koşulların Saptanması

4.5.1. Çalkalamalı ve Statik İnkübasyon Şartlarının Fitaz Sentezi Üzerine Etkisi

Statik ve çalkalamalı inkübasyon koşullarının enzim sentezine etkisini araştırmak üzere Bölüm 3.4.1'de belirtildiği gibi yapılan deneylerde çalkalamalı inkübasyon koşulunda statik inkübasyona nazaran fitaz sentezinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Çalkalamalı ve statik inkübasyon koşullarının fitaz sentezine etkisi

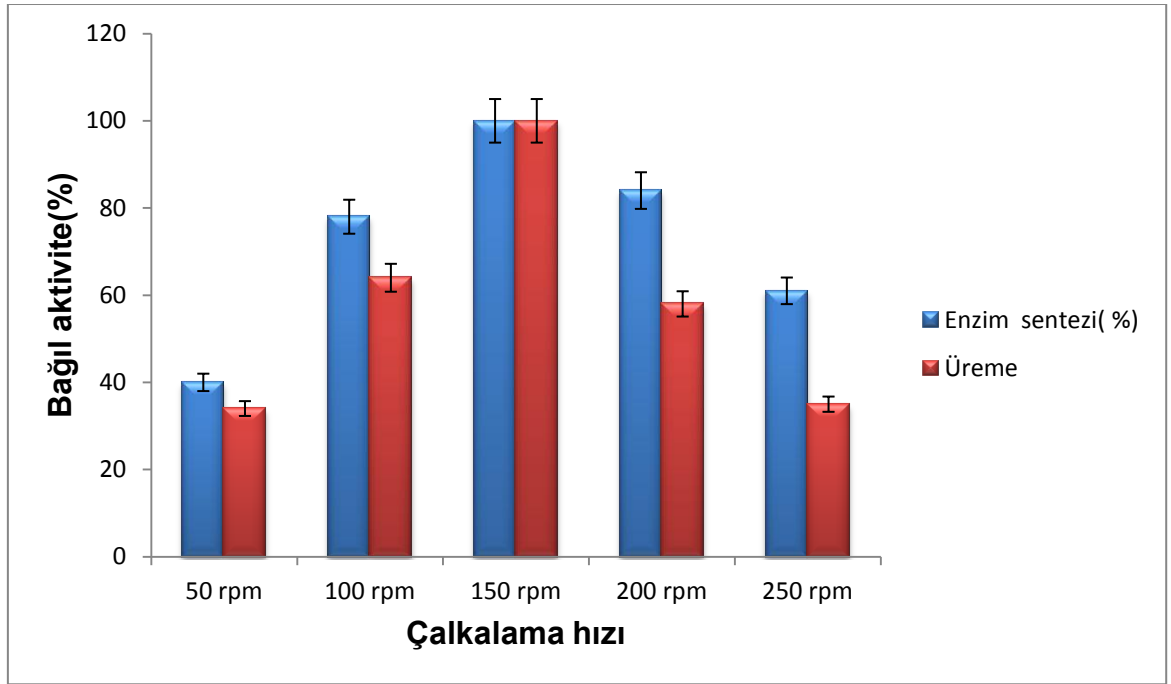
İnkübasyon Koşulu	Üreme miktarı (OD değeri)	Enzim miktarı (OD değeri)
Statik İnkübasyon	0,386	0,275
Çalkalamalı inkübasyon	0,587	0,675

Çalkalamalı inkübasyon koşullarında bakteri üremesinin de daha yüksek olduğu görüldüğünden çalkalamalı şartlarda saptanan yüksek enzim üretiminin yüksek üreme sonucunda ortaya çıktığı da ileri sürülebilir. Bu takdirde çalkalamalı ve statik koşullarda ortaya çıkan üreme ve enzim sentezlerinin oranı bize çalkalamanın enzim üretimine olumlu bir etkisinin olup olmadığını gösterecektir. Bu açıdan bakıldığında OD cinsinde verilen üreme miktarının enzim miktarına oranlanmasıyla (Çalkalamalı inkübasyonda üreme 0,587 OD iken enzim 0,675 OD çıkıyorsa bu durum statik inkübasyonda üreme 0,386 OD verdiği enzimde 0,443 OD değerinde olmalı idi) gözlemlenen değerler ile yapılan hesaplama arasında statik üretim koşullarında enzim üretiminin daha düşük olduğu gösterilmektedir. Bu veri çalkalamalı koşulda üretimin enzim sentezi açısından olumlu sonuç yarattığını göstermektedir. Bunlardan ayrı olarak *Bacillus* genusu üyelerinin aerobik karakterde olmaları nedeniyle üretimin çalkalamalı şartlarda sürdürülmesi uygun bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda da belirtildiği üzere (Jacob ve ark.) çalkalamalı inkübasyon koşullarında fitaz enzim sentezinde artış gözlenmektedir [88] . Birçok çalışmada kullanılan *Bacillus*, *Pseudomonas*, *E.coli*, *Aspergillus* türlerine ait mikroorganizmaların fitaz üretiminin çalkalamalı inkübasyon koşullarında daha yüksek olduğu belirtilmiştir [83;83].

4.5.2. Çalkama Hızının Fitaz Sentezi Üzerine Etkisi

Çalkama hızının fitaz sentezine etkisini saptamak amacıyla denen 5 farklı hızda (50,100,150,200,250 rpm) gerçekleştirilen deneylerde 150 rpm çalkama hızında en yüksek aktivite ve üreme gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).



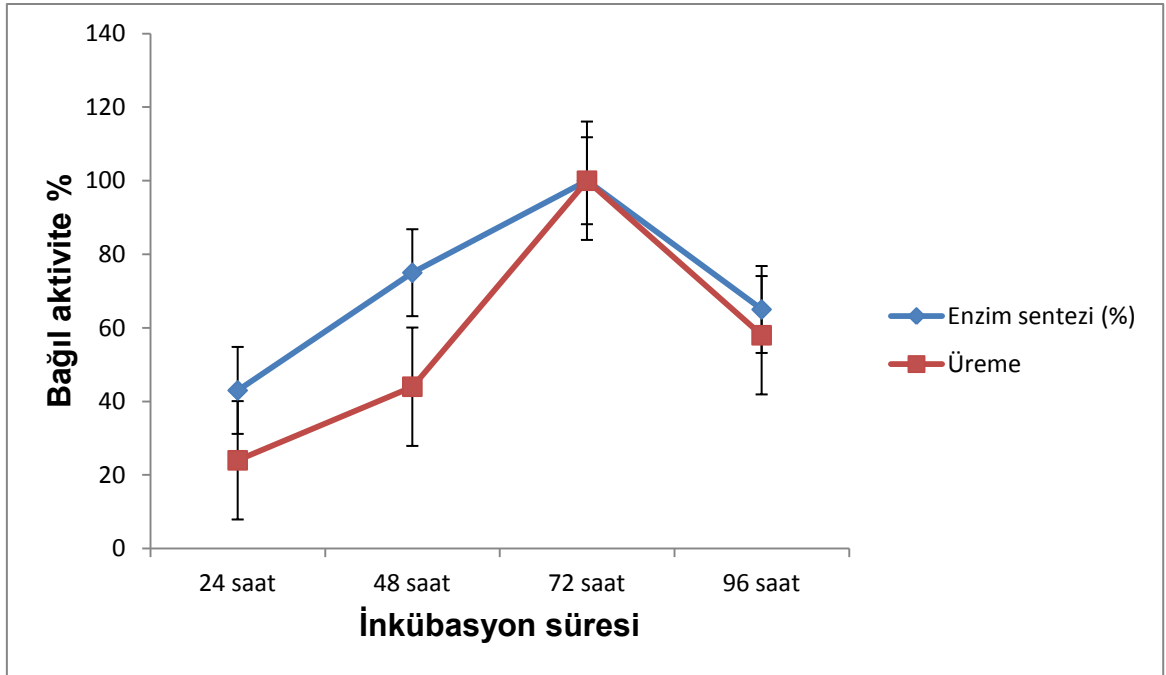
Şekil 4.5. Çalkama hızının fitaz sentezi üzerine etkisi

Yapılan çalışmalar incelendiğinde fitaz enzimi sentez koşullarında çalkama hızı olarak 150 rpm uygun çalkama hızı olarak belirtilmiştir [89]. Ancak bazı araştırmacılar 200 rpm çalkama hızını da uygun olarak bildirmişlerdir. 200 rpm'den daha yüksek çalkama hızının enzim sentezini olumsuz etkilediği belirtilmektedir [90].

4.5.3. İnkübasyon Süresinin Fitaz Sentezine Etkisi

Sodyum fitatlı besiyeri inokule edilen K12 suşu 30⁰C'de 150 rpm çalkalama hızında 96 saat boyunca inkübasyona bırakılan kültürlerde üremenin ve fitaz sentezinin en yüksek olduğu inkübasyon süresi 72 saat olarak saptanmıştır (Şekil.4.6). Yapılan çalışmalarda inkübasyon süresi kullanılan mikroorganizmaya göre çeşitlilik göstermektedir. *Aspergillus* türlerinden fitaz eldesi ile ilgili yapılan bir çalışmada inkübasyon süresi 96 saat olarak bildirilmiştir [91].

Macedo ve ark. *Saccharomyces cerevisiae*'den elde edilen fitaz için uygun inkübasyon süresini 120 saat olarak belirtmiştir. Ancak bu durum bakteriyel kaynaklı fitaz eldesinde değişiklik göstermekle birlikte genellikle 72 saat olarak belirtilmektedir [85]. Kumar ve ark.'ın yaptığı diğer bir çalışmada atık sulardan izole edilen *Bacillus megaterium*' dan fitaz sentezi için uygun inkübasyon süresi 62 saat olarak belirlenmiştir [84].

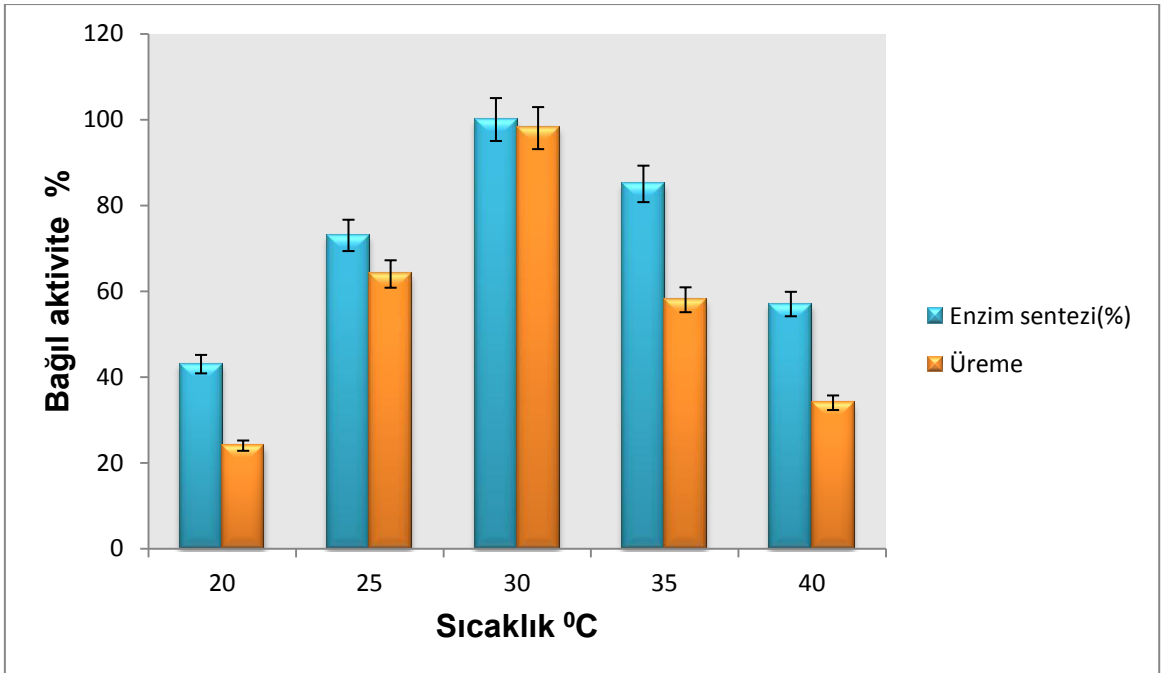


Şekil 4.6. Fitaz sentezi için uygun inkübasyon süresi

4.5.4. Fitaz Sentezi İçin Uygun İnkübasyon Sıcaklığı

Fitaz sentezi için uygun inkübasyon sıcaklığı belirlemek üzere 150 rpm çalkalama hızında 72 saat boyunca 20,25,30,35,40°C sıcaklıklarda K12 suşu sodyum fitatlı besiyerinde üretilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 30°C'nin fitaz sentezi için en uygun sıcaklık olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yapılan ölçümlerde üremenin de en yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 4.7). Singh ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada farklı toprak örneklerinden izole edilen bakterilerin uygun inkübasyon sıcaklığı 30°C olarak belirtilmiştir [90]. Sreedevi ve ark., ahır ve tavuk çiftliklerinden izole ettikleri *Bacillus* fitazının sentezi için uygun sıcaklığı 30°C olarak belirlemişlerdir [91]. K12 izolatu bir *Bacillus* türüdür (*Bacillus subtilis*). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'e göre *Bacillus subtilis* mezofilik bir bakteridir ve bu nedenle de bakterinin 30°C yüksek üreme göstermesi beklenen bir sonuçtur [92]. Mezofilik karakterli bakterilerin optimal üreme gösterdikleri sıcaklık dereceleri 20-45°C arasındadır [93].

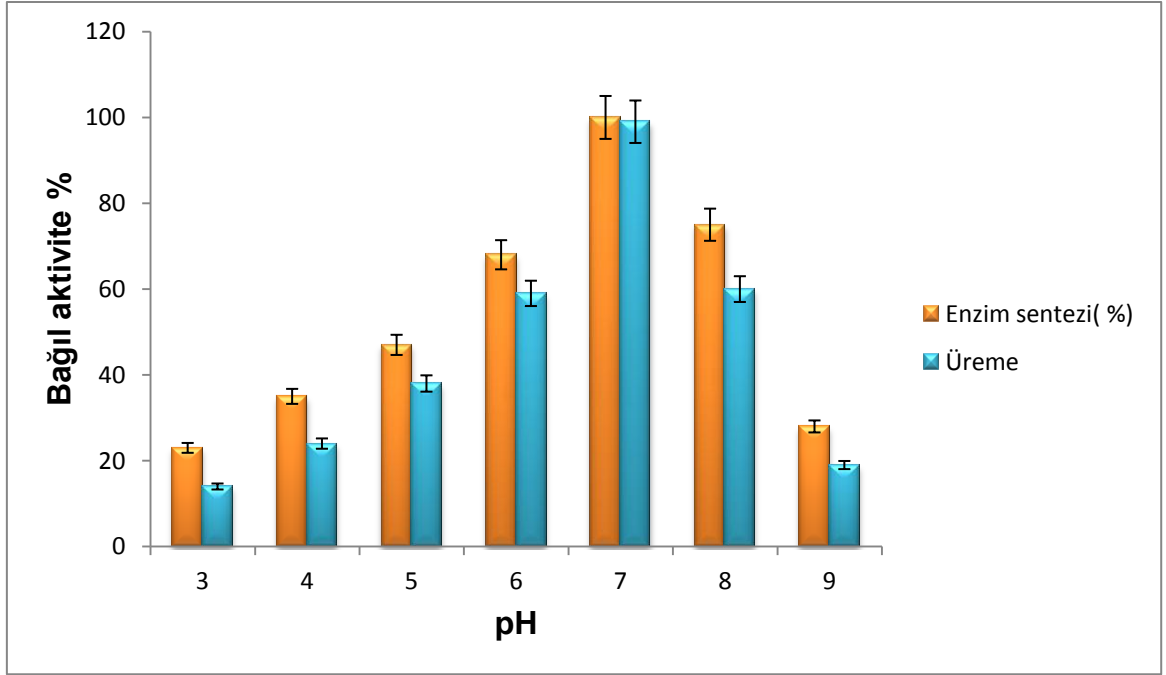
Benzer olarak atık sulardan izole edilen *Bacillus megaterium* için uygun sıcaklık 37°C olarak saptanmıştır [94]. Çeşitli araştırmacılar fitaz enzimini funguslardan *Aspergillus niger* 11T53A9 türünden elde etmiş ve sentez için uygun sıcaklığı 30°C olarak saptamışlardır [95].



Şekil 4.7. Fitaz sentezi için uygun inkübasyon sıcaklığı

4.5.5. Fitaz Sentezi İçin Uygun pH Değeri

Bölüm 3.4.5'te bahsedildiği gibi fitaz sentezi için uygun pH değerinin saptanması amacıyla yapılan deneylerde uygun pH değeri pH 7.0 olarak belirlenmiştir (Şekil.4.8). Yapılan çalışmalarda, bakteriyal kökenli fitaz enziminin sentez için uygun pH değeri 5.5-7.5 arasında değişmektedir. *Bacillus* türü bakterilerin pH değeri ise çoğunlukla pH 6.0-7.0 arasında değişmektedir [96]. Çalışmamızda kullanılan *Bacillus* K12 izolatı için pH 7.0 en uygun pH değeri olarak değerlendirilmiştir. Fungal fitazlarda ise pH değeri 4.0-5.5 arasında değişmekle birlikte nadiren de olsa pH 6.0 değerlerinin, fitaz sentez için uygun olduğu fungus türleri de mevcuttur . Satyanarayana ve Vohra 2002 *Pichia anomala* ile yaptığı çalışmada uygun pH değeri 4.0 olarak bildirilmiştir [97]. Lei ve ark. *Aspegillus niger* fitazında yaptıkları çalışmada uygun pH değerini 2.5 olarak belirtmişlerdir [98].

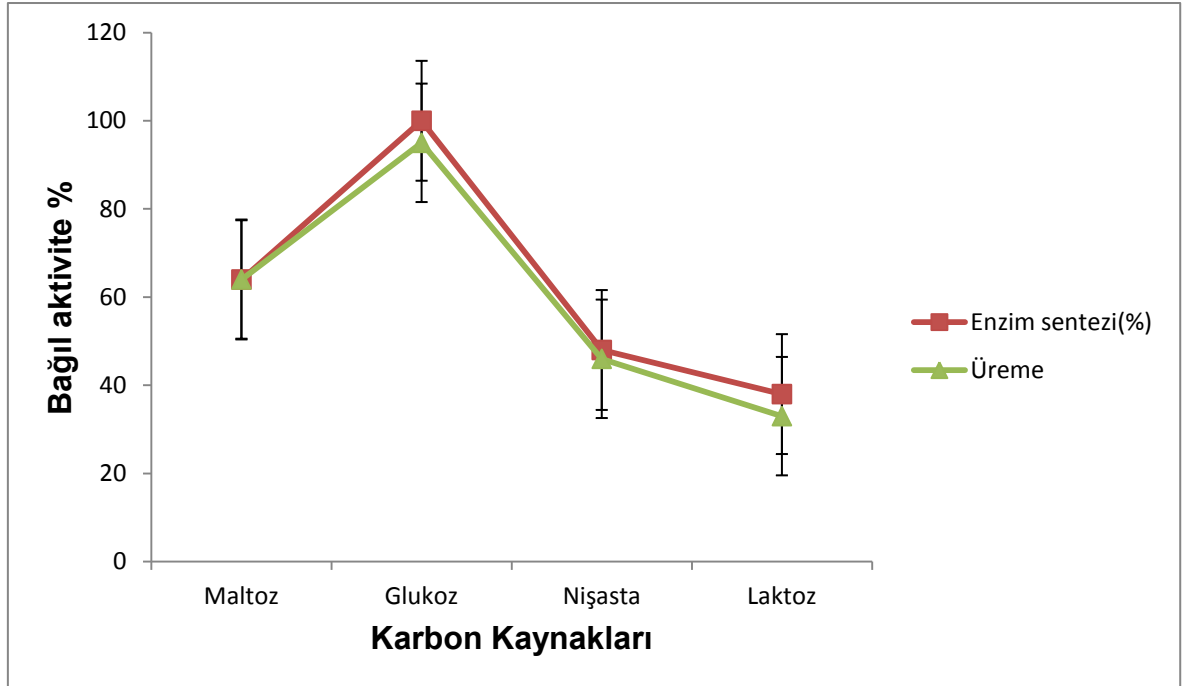


Şekil 4.8. Fitaz sentezi için uygun pH değeri

4.5.6. Farklı Karbon Kaynaklarının Fitaz Sentezi Üzerine Etkisi

Fitaz sentezi için uygun karbon kaynağını saptamak amacıyla maltoz, glukoz, nişasta ve laktoz kullanılmıştır. Üreme ve fitaz sentezi için en uygun karbon kaynağının glukoz olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9).

Çeşitli araştırmacılar (Kumar ve ark. 2011) *Bacillus subtilis* ekstraselüler fitazı için en uygun karbon kaynağını glukoz olarak tespit etmişlerdir [84]. Hosseinkhani ve ark. fekal örneklerden izole edilen *Pseudomonas sp.* ekstraselüler fitazı için yaptıkları çalışmada en uygun karbon kaynağının glukoz+sükroz karışımı olarak rapor etmişlerdir [85]. Bilindiği gibi glukoz gibi organik karbon kaynaklarının biyolojik oksidasyonu ile bakteri hücresinin biyosentetik veya asimilatör reaksiyonları için gerekli ATP veya daha basit organik veya inorganik bileşenler üretmesi heterotrofik metabolizma olarak tariflenmektedir [100]. *Bacillus* cinsinde heterotrofik metabolizma gösterdiğinden bulgumuz uyumlu olmaktadır.

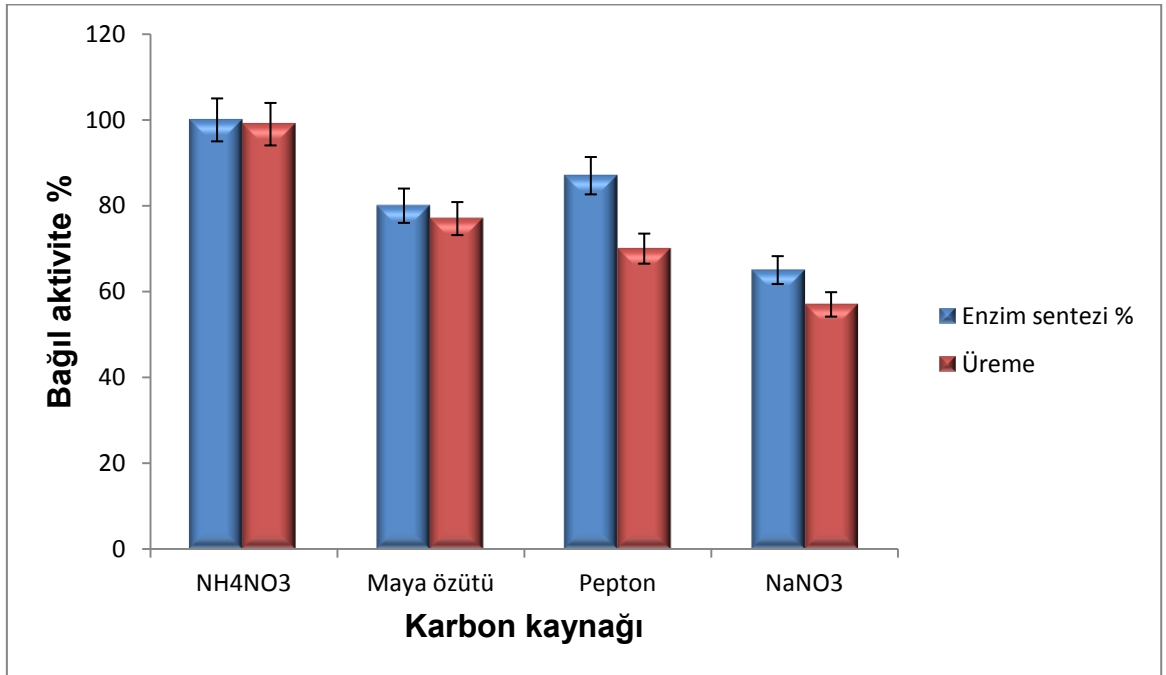


Şekil 4.9. Fitaz sentezi için uygun karbon kaynağı

4.5.7. Farklı Azot Kaynaklarının Fitaz Sentezi Üzerine Etkisi

Fitaz sentezi için besiyeri içeriğindeki uygun azot kaynağını saptamak amacıyla 4 farklı azot kaynağı (NH_4NO_3 , maya özütü, pepton ve NaNO_3) kullanılmış ve NH_4NO_3 'ün en uygun azot kaynağı belirlenmiştir (Şekil 4.10). Azot DNA, RNA ve proteinler gibi birçok organik molekülün temel bileşenidir. Ana azot deposu %79 azot gazı bileşeni ile havadır. Ancak havadaki azot gazı canlıların kullanımı için uygun değildir. Canlı bünyesinde azot amonyum, üre ya da nitrat gibi yapılar halinde kullanılmaktadır. Havadaki azot *Rhizobium* gibi bitkilerle simbiyotik olarak yaşayan bakteriler tarafından gerçekleştirilmektedir [101;102].

Kumar ve ark. *Bacillus megaterium* fitazı için uygun azot kaynağını NH_4NO_3 olarak belirtmişlerdir [82]. La luz mora ve ark. volkanik topraktan izole ettikleri suşların fitaz üretimi için uygun azot kaynağının pepton olarak belirtmişlerdir [103].



Şekil 4.10. Fitaz sentezi için uygun azot kaynağı

4.6. İntraselüler ve Ekstraselüler Enzim Üretimi

Katı besiyerinde fitaz pozitif olarak değerlendirilen suşlar arasından seçilen potent suş Çizelge 3.3.'de belirtilen enzim üretim ortamına Mc Farland No:0.5 bulanıklığına kullanılarak inokule edilmiştir.

30°C'de 72 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edildikten sonra 11000 rpm'de +4°C'de 5 dakika santrifüje edildikten sonra süpernatant ve çökelti kısmı ayrılmıştır. Süpernatant kısmı ekstraselüler enzim aktivitesi belirlenmesi için çökelti kısmı ise intraselüler enzim aktivitesi belirlenmesi için kullanılmıştır. Yapılan ölçümlerde kayda değer bir intraselüler enzim aktivitesine rastlanılmadığı için deneylerin devamı ekstraselüler enzim aktivitesi üzerinden devam etmiştir. Ekstraselüler enzim aktivitesi ölçümü için daha önce belirtildiği gibi inkübe edilen ve daha sonra santrifüje edilen süpernatant kısmı kullanılmıştır. Ekstraselüler enzim aktivitesi spektrofotometrede 700 nm'de ölçülmüştür. Çalışmalar ekstraselüler fitaz aktivitesi üzerinden devam edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda farklı mikroorganizmalardan ekstraselüler ve intraselüler fitaz enzimi elde edilmiştir. Powar ve Jagannathan *Bacillus subtilis*' te ekstraselüler fitaz enzimi varlığını göstermişlerdir. Yoon ve ark., *Enterobacter sp.*4'te ekstraselüler fitaz enzimi elde ederken, Howson ve Davis *Aspergillus* türlerinden *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus versicolor* ve *Aspergillus wentii* de ekstraselüler fitaz varlığını tespit etmişlerdir. Fitazlar bazı mikroorganizmalarda ise intraselüler özellikte bulunmaktadır. Greaves ve ark. *Aerobacter aerogenes*'te intraselüler fitaz enzimi varlığını tespit etmişlerdir. Greiner ve ark. *E.coli*'de, Irving ve ark ise *Pseudomonas sp.*'de intraselüler fitaz varlığını tespit etmişlerdir [104].

Aktivite hesabı:

$$\text{Enzim aktivitesi} = \frac{W \times V \times 1000}{V_E \times t \times M}$$

W: Açığa çıkan fosfat miktarı (OD₇₀₀/ Standart grafikten elde edilen eğim)

V_E: Enzim hacmi

V: Reaksiyon çözeltisi hacmi

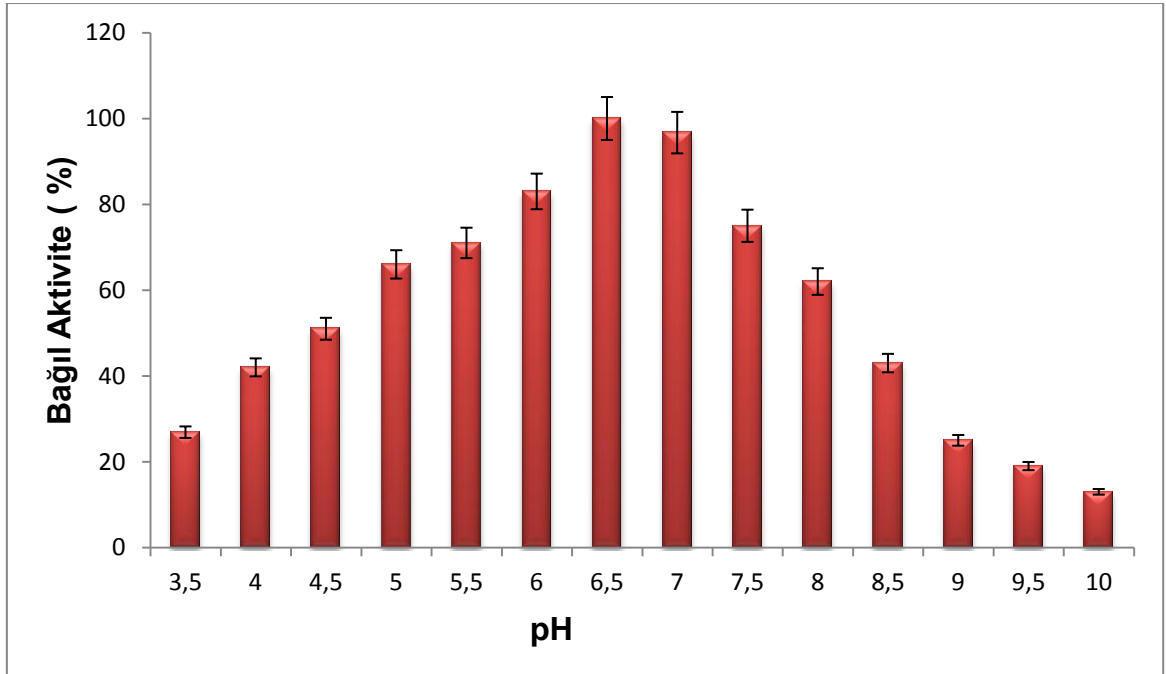
T: Reaksiyon süresi

M: Fosfor'un atom ağırlığı (30.974 g/mol)

4.7. Enzim Aktivitesine Etkili İnkübasyon Koşulları

4.7.1. Fitaz Aktivitesi İçin Uygun pH Değeri

Ekstraselüler fitazın aktivite gösterdiği pH değerinin saptanması için pH 3.0-10.0 arasında değişen farklı pH değerlerinde ölçüm yapılmış ve enzimin bağıl aktivitesi hesaplanmıştır. Yapılan ölçümlerde enzim aktivitesinin pH 3.0'de bağıl aktivite %15 iken pH 6.5'da en yüksek absorbans değeri ile %100 olarak hesaplanmıştır. pH 7'de aktivite kaybı çok fazla gözlenmezken pH 7'den sonra aktivite kaybı gözlenmiştir. Bu nedenle optimum pH değeri pH 6.5 olarak alınmaktadır. Fitaz pozitif suşun pH aralığına bağlı aktivite grafiği Şekil.4.11.'te gösterilmektedir. Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmektedir. Yapılan çalışmalarda *Bacillus* türlerinin genellikle nötr ya da alkali pH' da optimum fitaz aktivitesi göstermektedir [105]. Kumar ve ark., yaptıkları bir çalışmada ekstraselüler fitaz aktivitesi için optimum pH değerini *Bacillus subtilis* için pH 6.0- 6.5, *Bacillus amyloliquefaciens* için pH 7.0-7.8 ve *E.coli* için pH 5.0 olarak bulmuşlardır [84]. Walsh ve ark. *Rhizopus oligoporus* ATCC 22959 ekstraselüler fitaz aktivitesi için optimum pH değerini 5.5 olarak bulmuşlardır [106].



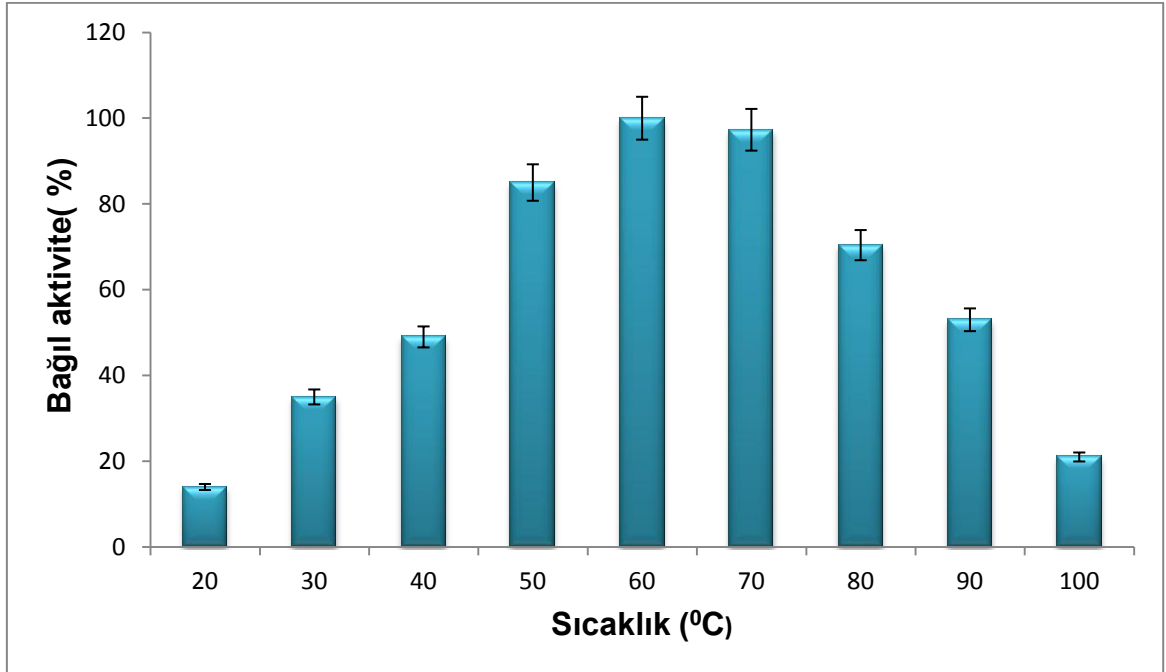
Şekil 4.11. Ekstraselüler Fitaz Aktivitesi için Uygun pH Değeri

4.7.2. Fitaz Aktivitesi İçin Uygun Sıcaklık Değeri

Ekstraselüler fitaz için uygun sıcaklığın saptanmasında 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C'lik sıcaklıklar seçilmiştir. Enzimin ölçümleri yapıp ve değerler bağıl enzim aktivitesi olarak hesaplanmıştır. Ekstraselüler olan bu enzim 60°C'de en yüksek absorbans değerini vermiş ve bu değer %100 kabul edilmiştir. 60°C'den daha yüksek sıcaklıklarda aktivitede düşüş gözlenmiştir (Şekil.4.12). Bu nedenle optimum sıcaklık değeri 60°C olarak kabul edilmektedir.

Yapılan araştırmalarda fitaz enziminin çok farklı sıcaklık derecelerinde aktif olduğu belirlenmiştir. Tran ve ark., *Bacillus Sp.* MD.2 suşunun sıcaklık optimumunu 70°C olarak bulmuşlardır [107]. *Bacillus* türlerinde optimum sıcaklık değeri değişmekle birlikte genellikle 50-70°C arasında değişmektedir. Kim ve ark., *Bacillus amyloliquefaciens*'te yaptıkları çalışmada ekstraselüler fitazın 80°C termal stabilitesini 42 dakika olarak belirtmiştir [81]. Tong ve ark. *Aspergillus ficuum* NTG-23'de fitaz için optimum sıcak değerini 67°C olarak belirtmiştir [108].

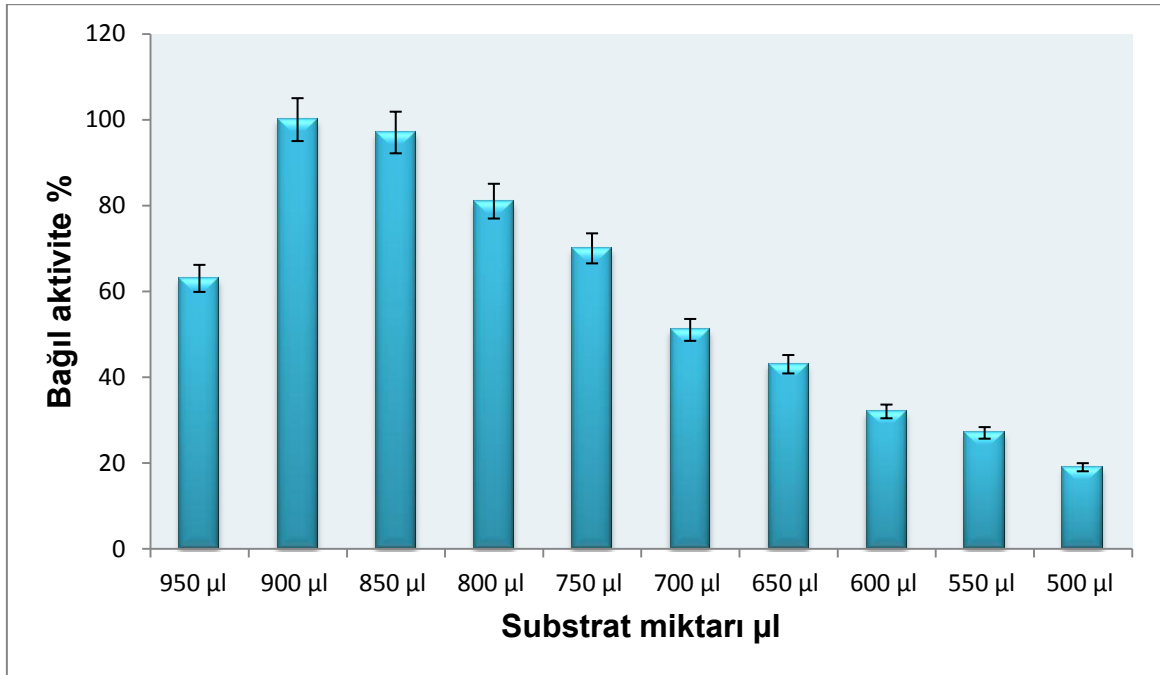
Ali ve ark. topraktan izole edilen *Streptomyces*'in iki farklı türü için optimum sıcaklık derecesi 37°C ve 55°C olarak belirtmişlerdir [109].



Şekil 4.12. Ekstraselüler Fitaz Aktivitesi için Uygun Sıcaklık Değeri

4.7.3. Fitaz Aktivitesi Üzerine Enzim-Substrat Oranının Etkisi

Bölüm 3.6.3'te bahsedildiği gibi enzim-substrat oranının enzim aktivitesi üzerine etkisi belirlemek amacıyla yapılan deneyler sonucunda, 100 µl enzim 900 µl substrat oranının en yüksek fitaz aktivitesinin görüldüğü oran olarak belirlenmiştir (Şekil.4.13). Yapılan çalışmalarda araştırmacılar *Bacillus sp.*'den elde ettikleri ekstraselüler fitaz aktivitesi belirlemek için 0.1 ml enzim 0.9 ml substrat oranını en uygun oran olarak belirtmişlerdir. Sreedevi ve ark. yaptıkları çalışmalarda *Bacillus subtilis*'in ürettiği ekstraselüler fitaz enzimi aktivitesi için yine aynı oranı en uygun enzim-substrat oranı olarak belirtmişlerdir [91]. Diğer birçok çalışmada enzim-substrat konsantrasyonu farklılık göstermekle birlikte sıklıkla kullanılan oranlar 100 µl enzim+900 µl substrat, 250 µl enzim+750 µl substrat olacak şekildedir. Çalışmamızdan elde edilen sonucun yapılan çalışmalarla enzim aktivitesi için kullanılan substrat- enzim oranlarına uygunluk gösterdiği görülmektedir.



Şekil 4.13. Fitaz aktivitesine etkili uygun substrat miktarı

4.7.4. İnhibitör ve Divalent Katyonların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzim inhibitörü olarak EDTA, metal iyonları olarak $MgCl_2$, $CuCl_2$, $CaCl_2$, $ZnCl_2$ ve $CoCl_2$ kullanılmıştır. Enzim ve çözelti karışımının son konsantrasyonu 1 mM (1 µL çözelti ve 99 µL enzim) ve 5 mM (5 µL çözelti ve 95 µL enzim) olacak şekilde hazırlandıktan sonra 1 saat 37°C'de ön inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Optimum pH ve optimum sıcaklıkta değerlerinde relatif olarak aktivite tayini yapılmıştır (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. EDTA ve Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine etkisi

Kullanılan İnhibitör ve İyonlar	1mM Konsantrasyon (Aktivite yüzdesi)	5mM Konsantrasyon (Aktivite Yüzdesi)
Kontrol	100	100
EDTA	78	74
MgCl ₂	80	69
CuCl ₂	69	60
CaCl ₂	95	107
ZnCl ₂	68	65
CoCl ₂	79	70

Çalışmamızda çeşitli metal iyonlarının ve EDTA'nın fitaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin saptanması amaçlanmaktadır. Bu bağlamda enzim ortamına farklı konsantrasyonlarda (1mM ve 5 mM) çeşitli metal iyonları ve EDTA ilave edilmiştir. Çalışmamızda EDTA'nın 1mM'lık çözeltisinin ekstraselüler fitaz enzim aktivitesini %22, 5mM'lık çözeltisinin ise %26 oranında azalttığı saptanmıştır. Metal iyonlarının enzim üzerine olan etkisinin araştırıldığı çalışmamızda CaCl₂'ün 1mM'lık çözeltisinin aktivitede %5 oranında azalmaya yol açtığı ancak bu sonucun aksine 5 mM'lık çözeltisinin ise aktivitede %7'lik bir artışa neden olduğu görülmektedir. CuCl₂'ün 1mM'lık çözeltisinin enzimin aktivitesini %31, 5 mM'lık çözeltisinin de %40 oranında azalttığı belirlenmiştir. Benzer olarak MgCl₂ 1mM 'lık çözeltisinde %20, 5 mM'lık çözeltisinde %31'lik, ZnCl₂ 'ün 1 mM'lık çözeltisinde %32, 5 mM'lık çözeltisinde %35, CoCl₂ 1mM'lık çözeltisinde %21, 5 mM'lık çözeltisinde de %30 oranında aktivite kaybı belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Yapılan çalışmalarda, fitaz enzimi aktivitesinde metal iyonlarının ve EDTA'nın farklı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Kerouvo ve ark. yaptıkları bir çalışmada *Bacillus subtilis* VTT E-68013 suşundan elde ettikleri fitaz enziminin aktivitesi ya da stabilitesi için CoCl₂ 1mM'lık çözeltisi %21, 5 mM'lık çözeltisi %30 oranında

Ca^{+2} iyonuna ihtiyaç duyduğu belirtilmiştir. Ancak aynı çalışmada EDTA' nın fitaz enzimini inaktif hale getirdiği bulunmuştur. Enzim aktivitesindeki bu kaybın konformasyonel değişiklik nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Çünkü holoenzimin sirküler dikromik yapısı ile metal- bağlı enzimin yapısı farklıdır. Bu nedenle enzimin yeniden aktif hale geçmesi için ortama Ca^{+2} iyonu eklenmiştir. Böylelikle enzimin konformasyonel yapısı yeniden düzenlenebilecek hale geçmiştir [110]. Çalışmamızda da bu bulguya uyumlu olarak sadece $CaCl_2$ ' ün 5mM'lık konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerinde olumlu etkide bulunduğu gösterilmektedir. Ayrıca araştırmacılar Ba^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} , Cr^{+3} , Cu^{+2} , Hg^{+2} ve Mn^{+2} gibi metal iyonlarının inhibitörük etkiye sahip olduklarını göstermişlerdir [81]. Öte yandan insektisitlerin de fitaz enzim aktivitesinde azalmaya yol açtığı gösterilmiş ve Perna ve ark.'ların yaptığı bir çalışmada atrazin, liuron, diuron herbisitleri ve crytoxiphos, phosphamidon, dichlorovos insektisitlerinin inhibitörük etkisi olduğu gösterilmiştir [111]. Çeşitli çalışmalarda EDTA'nın inhibitorik etkisine rastlanmaktadır. Kim ve ark. topraktan izole ettikleri *Bacillus sp.* KHU-10 cinsinde 1mM EDTA çözeltisinin enzim aktivitesini %90 oranında inhibe ettiğini bulmuşlardır [81]. Nakaromi ve ark. topraktan izole ettikleri *Klebsiella oxytoca* MO-3 Na, Fe ve Zn iyonların enzim aktivitesini inhibe ettiğini gözlemlemiş ancak EDTA'nın herhangi bir inhibisyon etkisine rastlamamıştır [112]. Bulgularımız yukarıdaki bilgilere uyumluluk sağlamaktadır.

4.8. Fitaz Enziminin Kısmi Olarak Saflaştırılması

Bölüm 3.5.2.'de belirtildiği gibi çökelti kısmı ayrılmış süpernatant Whatman No:1 kağıdından geçirildikten sonra toplam hacmin %70'i etil alkol olacak şekilde %96'lık soğuk etanol eklenmiş ve süspansiyon $-20^{\circ}C$ 'de 1 gece boyunca bekletilmiştir. Alkol süspansiyonu 11000 rpm'de $+4^{\circ}C$ 'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra çökelti halinde konsantre olmuş enzim pH'sı 5.5 olan 0,1 M sodyum asetat tamponunda çözülerek fitaz aktivite analizlerinde kullanılmak üzere $+4^{\circ}C$ 'de saklanmıştır.

4.8.1. Enzim Aktivitesinin Tanımlanması

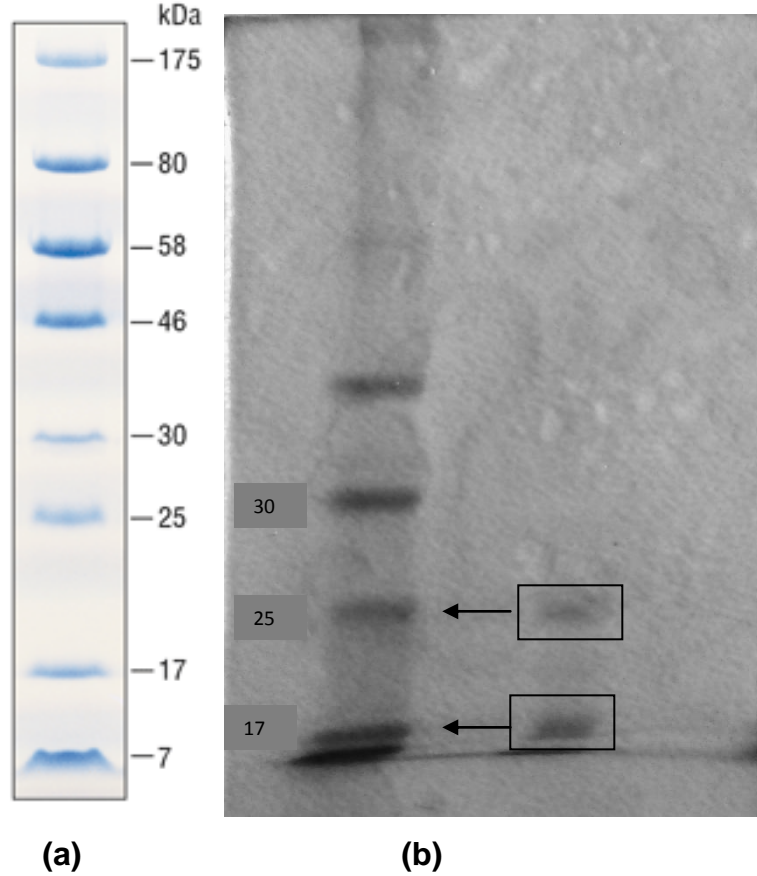
Kısmi saflaştırılan enzimle yapılan çalışmalar sonucunda 1 ünite fitaz enzimi aktivitesi 2 mM sodyum fitattan 60°C'de pH 6.5'da 1mM fosfat açığa çıkaran miktarı olarak tarif edilmiştir.

4.9. SDS-PAGE Yöntemi İle Enzimin Moleküler Ağırlığının Saptanması

Fitaz enziminin moleküler ağırlığının saptanması amacıyla %10'luk SDS-PAGE kullanılmıştır. Protein marker olarak New England Biolabs Prestain Protein Marker 7-175 kDa® kullanılmıştır. SDS-PAGE jel elektroforezinde örneklerin yürütülmesi sonucunda kısmi saflaştırılan enzimin yaklaşık olarak 17 kDa ve 25 kDa olan birbirinden bağımsız iki ayrı bant elde edilmiştir (Şekil.4.14.) [90].

Chadha ve ark. tarafından *Bacillus laevolactus*'dan elde edilen fitaz %10 SDS-PAGE jelde yürütülmüş ve 41 ve 46 kDa'luk iki farklı bant gözlemlenmiştir [113]. El-Toukhy ve ark. *Bacillus subtilis* MJA suşunun %12'lik SDS-PAGE jel elektroforezinden yaklaşık 38 kDa moleküler ağırlığında bir bant elde etmişlerdir [114]. Satyanarayana ve ark. *Pichia anomala* fitazını %10'luk SDS-PAGE jelde yürütmüş ve 64 kDa'luk tek bir bant elde etmiştir [98]. Quan ve ark. İse *Cladosporium sp.* fitazının SDS-PAGE analizinde yaklaşık olarak 32.6 kDa'luk bir bant elde etmişlerdir [115]. Chen ve ark. *Pichia pastoris* fitazından ise 45 kDa'luk tek bir bant elde etmişlerdir [116]. Sdeerevi ve Reddy *Bacillus subtilis* C43 suşunun SDS-PAGE jel elektroforezinde yaklaşık 55 kDa'luk tek bir bant görüntülemişlerdir [91].

Yukarıda da belirtildiği gibi fitaz enzimi SDS-PAGE ile elde edildiği kaynağa bağlı olarak bazen bir bazen ise iki bant göstermektedir. Bu durum enzimin iki veya tek alt birimli oluşunun bir sonucudur. Çalışmamız da SDS-PAGE jel elektroforezinde iki bant görülmesi izole ettiğimiz *Bacillus subtilis* K12 suşunun fitaz enziminin iki alt birimden oluştuğunu göstermektedir.



Şekil 4.14. a. Protein markerinin kDa aralığı **b.** Fitaz enziminin SDS-PAGE sonucu

Özetle;

- ❖ Çalışmamızda ahır ve kümes bölgesinden alınan 12 farklı toprak örneğinden izole edilen 32 adet mikroorganizmanın 10 adeti fitaz pozitif olarak belirlenmiştir.
- ❖ Fitaz pozitif 10 suşun içerisinde sodyum fitatlı katı besiyerinde en geniş zon çapını veren suş K12 seçilerek deneylerin devamında kullanılmıştır.
- ❖ Seçilen bu suşun 16S rRNA analizine göre türü *Bacillus subtilis* olarak belirlenmiştir.
- ❖ Fitaz enzimi sentezi için uygun koşulların sağlanması amacıyla yapılan deneylerde;
 - Çalkalamalı inkübasyonda daha fazla enzimi üretildiği,
 - 150 rpm çalkalama hızının enzim sentezi için en uygun çalkalama hızı
 - 72 saatin en uygun inkübasyon süresi,

- 30⁰C'nin en uygun inkübasyon sıcaklığı,
 - En uygun pH değerinin pH 7.0,
 - En uygun karbon kaynağının glukoz,
 - En uygun azot kaynağının ise amonyum nitrat (NH₄NO₃) olduğu belirlenmiştir.
- ❖ Optimize edilmiş koşullarda üretilen fitaz enzim aktivitesi için yapılan deneyler sonucunda reaksiyon ortamında;
- Fitaz aktivitesi için en uygun pH 6.5,
 - En uygun sıcaklık 60⁰C,
 - Enzim-substrat oranının aktivite üzerine etkisine bakıldığında ise yüksek aktivite için en uygun oran 100 µl enzim 900 µl substrat oranı,
 - Divalent iyonların ve EDTA'nın enzim aktivitesine etkisine bakıldığında; MgCl₂, CuCl₂, ZnCl₂ ve CoCl₂ çözeltileri ve EDTA'nın aktivite kaybına neden olduğu,
 - CaCl₂ çözeltisinin aktiviteyi artırıcı yönde etkisi olduğu tespit edilmiştir.
- ❖ SDS-PAGE jel elektroforezi sonucunda yaklaşık 25 ve 17 kDa'luk iki farklı bant görüntüsü elde edilmiştir.
- ❖ Bu durumda topraktan izole edilen *Bacillus subtilis* K12 suşunun optimum koşullarda üretilen ekstraselüler fitaz enzim aktivitesi Bölüm 4.6.'da belirtilen formüle uygun şekilde hesaplanmış ve 0,846 U/ ml olarak belirlenmiştir.

Tarım ve hayvan yem endüstrisinde yer alan enzimler arasında bulunan fitaz enziminin doğal kaynaklardan eldesi amacıyla yapılan çalışmalara oldukça sıklıkla rastlanmaktadır. Bu bağlamda çalışmamız, yeni bir fitaz enzim kaynağı eldesi araştırmalarına başlangıç olarak değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- [1] Ahle, W., Enzymes in Industry Production and Application. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2004**.
- [2] Atlas, R. M., Handbook of Media for Environmental Microbiology, Second Edition. CRC Press Publishing Company, New York,10, 0-8493-3560-4, **2005**.
- [3] Aygan, A., Haloalkalofil *Bacillus* sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. Ç.Ü. FBE. Doktora Tezi.,**2008**.
- [4] Bae, H.D., Yanke, L.J., Cheng, K.-J., Selinger, L.B., A novel staining method for detecting phytase activity. Journal of Microbiological Methods 39, 17–22,**1999**.
- [5] Billington, D.C., The inositol phosphates. Chemical Synthesis and Biological Significance, Verlag Chemie, Weinheim. ,**1993**.
- [6] Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., Industrial enzyme applications,Current Opinion in Biotechnology,13, 345-351,**2002**.
- [7] Bohn, L., Meyer, A.S., and Rasmussen, S.K., Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. Journal of Zhejiang Univ. Sci. B, 9(3):165-191. **2008**.
- [8] Brinch-Pedersen, H., Olesen, A., Rasmussen, S.K., and Holm, P.B., Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) for constitutive accumulation of an *Aspergillus* phytase. Molecular Breeding, 6, 195–206. **2000**.
- [9] Brocades, G., DNA sequence encoding phytase. Patent EP 420 358, **1991**.
- [10] Halkman, K., Tarım Mikrobiyolojisi, A.Ü. Ziraat Fak. Yayınları, No:1214, 82s., Ankara. **1991**,
- [11] Doğan, G., Bircan, R., Bitkisel yem hammaddelerinde bulunan antibesleyici faktörler ve balıklar üzerine etkileri. Journal of Fisheries Sciences, 3(4): 323-332. **2009**.
- [12] Cheryan, M., Phytic acid interactions in food systems. Critical Reviews in Food Science Nutrition, 13: 297–336. **1980**

- [13] <http://www.thepigsite.com/articles/3875/proceedings-of-the-1st-international-phytase-summit-2010>, **Kasım 2013**.
- [14] DAY, P.R.,. Genetic modification of plants: significant issues and hurdles to success. *American Journal of Clinical Nutrition*, 63,651-656,**1996**.
- [15] <http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%205/enzymes.html>, **Aralık 2013**.
- [16] D´Silva, C.G., Bae, H.D., Yanke, L.J., Cheng, K.-J., Selinger, L.B., Localization of phytase in *Selenomonas ruminantium* and *Mitsuokella 121 multiacidus* by transmission electron microscopy, *Canadian Journal Microbiology*, 46,391-395,**2000**.
- [17] Enzyme Technical Association,. *Enzymes a Primer on Use and Benefits Today and Tomorrow*, 1800 Massachusetts Avenue, N.W. Second Flor Washington, DC 20036, s.1-34.,**2001**.
- [18] Feil, B.,. Phytic Acid. *Journal of New Seeds*, 3(3),**2001**.
- [19] Findenegg, G.R., and Nelemans, J.A.,. The effect of phytase on the availability of P from *myo*-inositol hexaphosphate (phytate) for maize roots. *Plant Soil*, 154,189-196,**1993**.
- [20] Fredlund, K., Isaksson, M., Rossander-Hulthen, L., Almgren, A., and Sandberg, A.S.,. Absorption of zinc and retention of calcium: Dose-dependent inhibition by phytate. *Journal of Trace elements in Medicine and Biology*, 20(1), 49–57,**2006**.
- [21] Fredrikson, M., Biot, P., Larsson Alming, M., Carlsson, N.G., and Sandberg, A.S.,. Production process for high-quality pea protein isolate with low content of oligosaccharides and phytate, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49,1208-1212,**2001**.
- [22] Garfin, D.E., *Gel Electrophoresis of Proteins*. In *Essential Cell Biology*, Volume 1: Cell Structure, A Practical Approach, Edited by DAVEY, J. and Lord, M., Oxford University Press, Oxford UK. Pages 197-268,**2003**.
- [23] Golovan, S.P., Wang, G., Zhang, J., Forsberg, C.W.,. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities, *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 59–71,**2000**.

- [24] Greaves, M.P., Anderson, G., Webley, D.M., The hydrolysis of inositol phosphates by *Aerobacter aerogenes*. Biochim. Biophys. Acta 132, 412-418 **1967**.
- [25] Bilgin, E., Toprak bakterilerinden İzole Edilen Fitazların Özellikleri. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, **2007**.
- [26] Casey, A., and Walsh, G., Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. Journal of Biotechnology, 110, 313–322. **2004**.
- [27] Greiner, R., Jany, K-D, Larsson Alminger, M., Identification and properties of *myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases (phytases) from Barley (*Hordeum vulgare*), Journal of Cereal Science, 31, 127–139. **2000**.
- [28] Hamada, A., Yamaguchi, K.I., Ohnishi, N., Harada, M., Nikumaru, S., and Honda, H., High-level production of yeast (*Schwanniomyces occidentalis*) phytase in transgenic rice plants by combination of signal sequence and codon modification of the phytase gene, Journal of Plant Biotechnology, 3, 43–55. 124, **2005**.
- [29] Moghaddam M.J.M., Emtiazi G., Bouzari M., Mostajeran A., Salehi Z., Novel Phytase and Cellulase Activities in Endophytic Azospirilla, Journal of World Applied Sciences, 10, 1129-1135, **2010**.
- [30] Hurrell, R.F., Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability., Journal of Nutrition, 133, 2973-2977, **2003**.
- [31] <http://www.brenda-enzymes.org> **Aralık 2013**.
- [32] J. Microbiol. Biotechnol., 14(5), 1004-1008. IUPAC-IUB (Commission on Biochemical Nomenclature),. Nomenclature of Phosphorus Containing Compounds of Biochemical Importance. Eur. J. Biochem., 79:1-9. 126 **1977**
- [33] Iqbal, T.H., Lewis, K.O., and Cooper, B.T.,. Phytase activity in the human and rat small intestine. Gut, 35, 1233–1236. **1994**
- [34] Karademir, A., Akgül, M., Tutuş, A.,. Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı, KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi 5(1), **2002**.

- [35] Kerovuo, J.,. A Novel Phytase from *Bacillus*. Characterization and Production of the Enzyme. Academic Dissertation, 68 p., Helsinki, **2000**.
- [36] Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkinen, N.,Apajalahti, J., Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*, Applied Environment Microbiology, 64,2079-2085,**1998**.
- [37] Bedford M.R.,Cowieson A.J.,Phytase and Phytate Interactions,AB Vista Feed Ingredients,32,231-235,**2002**.
- [38] Kumar, D.j.M., Balakumaran, M.D. P.T., Pandey, A., Singh, A., Raja, R,B, Isolation, Production & Application Of Extracellular Phytase By *Serratia Marcescens* Asian Journal of Experimental Biological Sciences,2(4), 663-666,**2011**.
- [39] Zhang G.Q.,Wu Y.Y.,Ng B.T.,Chen Q.J.,Wang H.X.,A,Phytase Characterized by Relatively High pH Tolerance and Thermostability from the Shiitake Mushroom *Lentinus edodes*,Biomed Research International,**2013**.
- [40] Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., and Becker, K.,Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition. Food Chemistry 120, 945 959. **2010**
- [41] Lei, X.G., and Porres, J.M.,. Phytase enzymology, applications, and biotechnology.,Biotechnology Letters, 25,1787-1794,**2003**.
- [42] Lonnerdal, B.,. Phytic acid-trace element (Zn, Cu, Mn) interactions. International Journal of Food Science and Technology, 37, 749–758, **2002**.
- [43] Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J.,Biology of Microorganisms, Eighth Ed., Prentice-Hall, Inc., USA, 986,**1997**.
- [44] Marlida, Y., Delfita, R., Adnadi, P., and Ciptaan, G.,Isolation, Characterization and Production of Phytase from Endophytic Fungus its Application for Feed,Pakistan Journal of Nutrition,9,471-474,**2010**.
- [45] Mullaney, E.J., Daly, C.B., Kim, T., Porres, J.M., Lei, X.G., Sethumadhavan, K., Ullah, A.H.J.,. Site-directed mutagenesis of *Aspergillus niger* NRRL 3135 phytase at residue 300 to enhance catalysis at pH 4.0. Biochemical and Biophyscis. Res. Commun. 297: 1016–1020. **2002**.

- [46] Nelson, D.L., Cox, M.M., Lehninger Principles of Biochemistry, Chapter 6. W. H. FREEMAN, Fourth Edition. **2004.**
- [47] Lei, G., X., Weamer, J., D., Mullaney, E., Ullah, A., H., Azain, M., J., Phytase, a New Life for an " Old" Enzyme, The Annual Review of Animal Biosciences, 13, **2012.**
- [48] Quan, C-S., Fan, S.,D., Zhang, L.,H., Wang, Y.,J., and Ohta, Y., Purification and Properties of a Phytase from *Candida krusei* WZ-001. Journal of Bioscience and Bioengineering, 94(5), 419-425,**2002.**
- [49] Quan, C., Zhang, L., Wang, Y., and Ohta, Y.,. Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 92(2), 154–160. **2001.**
- [50] Raghavendra, P., Rao, T.S.C., and Halami, P.M., Evaluation of beneficial attributes for phytate-degrading *Pediococcus pentosaceus* CFR R123,Beneficial Microbes,1,259-264,**2010.**
- [51] Rees, T.J.,The development of a Novel Antifungal Silage Inoculant, Doctoral Research Thesis, Cranfield University Biotechnology Centre, UK,**1997.**
- [52] Richardson, A.E., and Hadobas, P. A.,. Soil isolates of *Pseudomonas spp.* That utilise inositol phosphates, Canadian Journal of Microbiology, 43, 509–516,**1997.**
- [53] Robinson, E.H., Jackson, S., and Li, M.H., Supplemental phytase in catfish diets.,Aquaculture Magazine, 22,80-82,**1996.**
- [54] Rodriguez, E., Mullaney, E., Lei, X.G., Expression of the *Aspergillus fumigatus* gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme,Biochemical and Biophysics,268,373–378,**2000.**
- [55] Rodriguez, E., Wood, Z.A., Karplus, P.A., Lei, X.G.,. Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*, Biochemical and Biophysics,382,105–112,**2000.**
- [56] Sajidan, A., Farouk, A.,Greiner, R., Jungblut, P., Muller, E.-C., Borriss, R.,Molecular and physiological characterization of a 3-Phytase from soil bacteria *Klebsiella* sp. ASR1,Applied Microbiology Biotechnology,65,110–118,**2004.**

- [57] Sandberg, A.S., Larsen, T., and Sandstrom, B., High dietary calcium level decreases colonic phytate degradation in pigs fed a rapeseed diet, *Journal of Nutrition*, 123, 559–566, **1993**.
- [58] Shimizu, M., Purification and characterization of a phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77, *Journal of Biosciences and Biotechnology*, 56, 1266-1269, **1992**.
- [59] Temizkan, G., ve Arda, N.,. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi, 345s.139 **2008**
- [60] Ullah, A.H.J., Sethumadhavan, K., Lei, X.G., Mullaney, E.J., Biochemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* phytase (*phyA*), *Biochemical and Biophysics*, 275, 279–285, **2000**.
- [61] Ullah, A.H.J., and Phillippy, B.Q., Substrate selectivity in *Aspergillus ficuum* phytase and acid phosphatases using myo-inositol phosphates, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42, 423–425, **1994**.
- [62] Konietzny U., Greiner R., Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases), *International Journal of Food Sciences and Technology*, 37, 791–812, **2002**.
- [63] Weremko, D., Fandrejewski, H., Zebrowska, T., Han, K., Kim, J.H., and Cho, W.T.,. Bioavailability of phosphorus in feeds of plant origin for pigs, *Asian-Australians Journal of Animal Sciences*, 10, 551 -566, **1997**.
- [64] Wiseman, A.,. *Handbook of Enzymes Biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry p. 274-373. **1987**
- [65] Wyss, M., Pasamontes, L., Remy, R., Kohler, J., Kuszniir, E., Gadiant, M., Muller, F., Van Loon, A.P.G.M., Comparison of the thermostability properties of three acid phosphatases from molds: *Aspergillus fumigatus* phytase, *A. niger* phytase, and *A. niger* pH 2.5 acid phosphatase, *Applied Environmental Microbiology*, 64, 4446–4451, **1998**.
- [66] Yang, W.J., Matsuda, Y., Inomata, M., Nakagawa, H., Developmental and dietary induction of 90 kDa subunits of rat intestinal phytase, *Biochemistry and Biophysics*, 1075, 83-87, **1991**.

- [67] Yanke, L.J., Selinger, L.B., Cheng, K.J., Phytase activity of *Selenomonas ruminantum*: a preliminary characterization. Letters in Applied Microbiology, 29, 20-25, **1999**.
- [68] Sasirekha B., Bedashree t., Champa K.L., Statistical optimization of medium components for improved phytase production by *Pseudomonas aeruginosa*, International Chemical Technology Research, 4, 891-895, **2012**.
- [69] Zhang, W., Aggrey, S.E., Pesti, G.M., Bakalli, R.I., Edwards, H.M., Correlated responses to divergent selection for phytate phosphorus bioavailability in a randombred chicken population. Poultry Science, 84, 536–542, **2005**.
- [70] Liu C.H., Chiu C.H., Wang S.W., Cheng W., Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhanced the growth, innate immune responses and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*, Journal of Fish & Shellfish Immunology, 1-8, **2012**.
- [71] Greiner, R., and Konietzny, U., Phytase for food application, Food Technology and Biotechnology, 44(2), 125–140, **2006**.
- [72] Siren, M., Use of an ester of inositol triphosphate for the preparing of medicaments. U.S. Patent 5846957. **1998**.
- [73] Dalal, R.C., Soil organic phosphorus. Adv. Agronom., 29: 83-117. **1978**.
- [74] <http://www.bio.davidson.edu/genomics/method/SDSPAGE/SDSPAGE.html>, **Aralık 2013**.
- [75] http://www.science.smith.edu/departments/Biochem/Biochem_353/sdpage.html, **Aralık 2013**.
- [76] <http://www.med.upenn.edu/ostaplab/documents/SDSPAGEBuffers.pdf>, **Aralık 2013**.
- [77] Haliskaranfil S., Termoalkalifilik amilaz ve selülaz enzim (multi enzim) üreticisi *Bacillus* sp. İzolasyonu, enzimlerin karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulanabilirliği Yüksek lisans tezi Adana, **2012**
- [78] <http://vemo-feedadditives.com/en/products/vemozyme-f-10000ntp>) **Aralık 2013**

- [79] Powar, V.K., Jagannathan, V., Purification and properties of phytatespecific phosphatase from *Bacillus subtilis*, Journal of Bacteriology, 151,1102-1108, **1982**.
- [80] Jamil, B., Hasan F., Hameed A., Ahmed S., Isolation of *Bacillus subtilis* MH-4 soil and its potential of polypeptidic antibiotic production, Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences,20,26-31, **2007**.
- [81] Choi Y.M., Suh H.J., Kim J.M., Purification and Properties of Extracellular Phytase from *Bacillus sp.* KHU-10, Journal of Protein Chemistry,20,287-292, **2001**.
- [82] Vijayasai L., Vijaya Lakshmi K., Shaheen S.K., Prasanna N.D. Isolation, Characterization of Phytase Producing *Bacillus Subtilis* MTCC No.9878 from The Gut of Eisenia Foetida, An International Quarterly Journal of Life Sciences,6,553-556, **2011**.
- [83] Jorquera, M.A., and Mora, M, L., *Bacillus*-like phosphobacteria in agronomic volcanic soils from Chile , 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World1 – 6 August **2010**
- [84] Shamna, K.S., Rajamanikandan, K.C.P., Mukesh, Kumar, D.J., Balakumar M.D., Kalaichelvan P.T., Extracellular Production of phytases by a Native *Bacillus subtilis* Strain, Annals of Biological Research, 3, 979-987, **2012**.
- [85] Sreedevi S., Reddy B.N., Isolation, Screening and Optimization of Phytase Production from newly isolated *Bacillus sp.* C43, International Journal of Pharmacy and Biological Science, 2, 218-231, **2012**.
- [86] Ushasri K., Sivaragini P., Vijayalakshmi K., Isolation, Characterization of Phytase Producing *Bacillus* sps NBtRS6 from the rhizosphere soil of NBt cotton field, International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2, 142-149, **2013**.
- [87] Costa P.S., Nascimento A.M.A., Lima-Bittencourt C.I., Chartone-souza E., Santos R.F., Vilas-Boas, A., *Chromobacterium Sp.* from the Tropics: Detection and Diversity of Phytase Activity, Brazilian Journal of Microbiology, 42, 84-88, **2011**.
- [88] <http://www.abvista.com/products/enzymes/phytase>, **Kasim 2013**.
- [89] <http://phytate.info>, **Kasim 2013**.

- [90] Singh N.K., Joshi D.K., Gupta R.K., Isolation of Phytase Producing Bacteria and Optimization of Phytase Production Parameters, Jundishapur Journal of Microbiology, 6, **2013**.
- [91] Sreedevi S., Reddy B.N. Purification and Biochemical Characterization of Phytase from newly isolated *Bacillus subtilis* C43, Journal of Advanced Biotechnology, 12, 01-06, **2013**.
- [92] Bergey's Manuals of Determinative Bacteriology Ninth Edition, **1994**.
- [93] Vats P., Banerjee U.C., Studies on the production of phytase by a newly isolated strain of *Aspergillus niger* var teigham obtained from rotten wood-logs, Journal of Process Biochemistry, 38, 211-217, **2002**.
- [94] Kumar D., Rajesh S., Balashanmugam P., Rebecca L.J., Kalaichelvan P.T., Screening, Optimization and Application of Extracellular Phytase from *Bacillus Megaterium* Isolated From Poultry Waste, Journal of Modern Biotechnology, 2, 46-52, **2013**.
- [95] Greiner R., Silvia L.G., Couri S., Purification and Characterisation of an Extracellular Phytase from *Aspergillus Niger* 11T53A9, Brazilian Journal of Microbiology, 40, 795-807, **2009**.
- [96] Li Z., Zhao A., Wang X., Jin X., Li J., Yu M., Cloning, Overexpression and Functional Characterization of a Phytase from Genus *Bacillus*, Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 23, 193-202, **2013**.
- [97] Vohra A., Satyanarayana T., Purification and characterization of a thermostable and acid-stable Phytase from *Pichia anomala*, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 18, 687-691, **2002**.
- [98] Han Y., Lei X.G., Role of Glycosylation in the Functional Expression of an *Aspergillus niger* Phytase (phyA) in *Pichia pastoris*, Journal of Biochemistry and Biophysics, 83-90, **1999**.
- [99] Hosseinkhani B., Emtiazi G., Nahvi I., Analysis of Phytase producing bacteria (*Pseudomonas sp.*) from poultry faeces and optimization of this enzyme production, African Journal of Biotechnology, 8, 4229-4232, **2009**.
- [100] Baron S., Heterotrophic metabolism, Medical Microbiology 4th edition, University of Texas Medical Branch at Galveston, **1996**.
- [101] <http://soyroothair.org/education/17-the-role-of-nitrogen-in-the-biosphere.html> **Aralık 2013**

- [102] Yao M.Z., Lu L.W., Chen T.G., Wang W., Fu Y.J., Yang B.S., Liang A.H., Effect of metals ions on thermostable alkaline phytase from *Bacillus subtilis* YCJS isolated from soybean rhizosphere soil, *Annals of Microbiology*, 5, **2013**.
- [103] Jorquera M.A., Hernandez M.T., Rengel Z., Marschner P., La Luz Mora M., Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil, *Journal of Biology and Fertility Soils*, 1025-1034, **2008**.
- [104] Vohra A., Satyanarayana T., Phytases: Microbial Sources, Production, Purification and Potential Biotechnological Applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, 29-60, **2003**.
- [105] Idriss E.E., Makarewicz O., Farouk A., Rosner K., Greiner R., Bochow H., Richter T., Borriss R., Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect, *Journal of General Microbiology*, 148, 2097-2109, **2002**.
- [106] Casey A., Walsh G., Purification and Characterization of Extracellular Phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142, *Bioresource Technology*, 183-188, **2003**.
- [107] Tran T.T., Hashim S.O., Gaber Y., Mamo G., Mattiasson B., Hattukaul R., Thermostable alkaline phytase from *Bacillus sp.* MD2: Effect of divalent metals on activity and stability, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1000-1007, **2011**.
- [108] Zhang G.Q., Dong, X.F., Wang, Z.H., Zhang, Q., Wang H.X., Tong J.M., Purification, Characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23, *Journal of Bioresource Technology*, 4125-4131, **2010**.
- [109] Ali T.H., Mohammed L.A., Ali N.H., Phytic Acid (Myo-inositol Hexakisphosphate) Phosphohydrolase from *Streptomyces hygroscopicus* NRRL B-1476, *Journal of Biological Sciences*, 1727-3048, **2007**.
- [110] Kerovuo J., Lauraeus M., Nurminen P., Kalkkinen N., Apajalahti J. Isolation, Characterization, Molecular Gene Cloning, and Sequencing of a

- Novel Phytase from *Bacillus subtilis*, Journal of Applied and Environmental Microbiology, 2079-2085, **1998**.
- [111] Cervelli S., Perna A., Phytase Inhibition By Insecticides and Herbicides, Water, Air and Soil Pollution, 24, 397-403, **1985**.
- [112] Jareonkitmongkol S., Ohya M., Watanabe R., Takagi H., Nakamori S., Partial Purification of Phytase from a Soil Isolate Bacterium, *Klebsiella oxytoca* MO-3, Journal of Fermentation and Bioengineering, 393-394, **1997**.
- [113] Gulati H.K., Chadha B.S., Saini H.S. Production and Characterization of Thermostable alkaline phytase from *Bacillus laevolacticus* isolated from rhizosphere soil, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 34, 91-98, **2006**.
- [114] El-Toukhy N.M.K., Youssef A.S., Mikhail M.G.M., Isolation, Purification and Characterization of phytase from *Bacillus subtilis* MJA, African Journal of Biotechnology, 12, 2957-2967, **2013**.
- [115] Quan C.S., Tian W.J., Fan S.D., Kikuchi J.I., Purification and Properties of a Low-Molecular-Weight Phytase from *Cladosporium* sp.FP-1, Journal of Bioscience and Bioengineering, 97, 260- 266, **2004**.
- [116] Chen C.C., Wu P.h., Huang C.T., Cheng K.J., A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase, Journal of Enzyme and Microbial Technology, 315-320, **2004**.

EK-1

DNA İzolasyonu

DNA İzolasyonu için Biospeedy DNA İzolasyon Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılmıştır. Kit protokolü aşağıdaki gibidir.

1. Bir mikrosantrifüj tüpüne 600 µl Parçalama Tamponu (%2 CTAB-hexadecyltrimethylammonium bromide-, 100 mM TrisHCl pH 8, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl) eklenmiş, daha sonra katı besi yerinden alınan yaklaşık 200 mg bakteri kolonisi tamponun içine bırakılmıştır.
2. Numunenin homojenizatörde 2 dakika, 6000 rpm'de homojenizasyonundan sonra 95°C'de 10 dk inkübe edilmiştir.
3. Tüp 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen üst sıvı yeni bir tüpe transfer edilmiştir. Elde edilen üst sıvı hacmi kadar isopropanol, üst sıvı hacminin 2 katı kadar Bağlama Tamponu (6.75M Guanidinium thiocyanate, 15mM Tris-Cl pH 8.0) eklenmiş ve vorteksle karıştırılmıştır.
4. Karışım DNA Kolonu'na eklenmiş, 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra alt sıvı atılmıştır.
5. Kolona 500 µl İnhibitör Eleme Tamponu (5 M thiocyanate, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6, %40 EtOH) eklenmiş, 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve alt sıvı atılmıştır.
6. Kolona 500 µl Yıkama Tamponu (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5; 80% v/v Ethanol) eklenmiş, 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve alt sıvı atılmıştır. Bu adım iki defa daha tekrarlanmıştır.
7. Kolonun 14000 rpm'de 1 dakika boş santrifüj edildikten sonra steril yeni bir mikrosantrifüj tüpe yerleştirilmiş, 100 µl Çözücü Tampon eklenmiş, 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiş, 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve DNA izolatu elde edilmiştir.
8. Elde edilen DNA -20°C'de saklanmıştır.

Gerçek Zamanlı PCR (Q-PCR)

Q-PCR için Biospeedy Bakteriyel Çeşitlilik Çalışma Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılmıştır. Kit bakteri 16S rRNA'sının, *Escherichia coli* numaralandırmasıyla 8-1522 bazları arasını hedefleyen 5'-AGAGTTTGATC(CA)TGGCTCAG-3' ve geri 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' primerlerini içermektedir.

Bütün reaksiyonlarda Roche Light Cycler Nano (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılmıştır. Reaksiyon 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, 1x Reaksiyon Tamponu, 0.1U Fast Start Taq DNA Polimeraz, 1x EvaGreen, 5 ng/μl kalıp DNA ve her bir primerden 0.5 μM içermektedir. Cihazda, primer çiftine özgü optimizasyonu sağlanmıştır. Tablo 1'de verilen ısı döngüsü programı uygulanmıştır. Q-PCR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 55°C - 95°C arasında erime eğrisi analizi yapılmıştır. Q-PCR dataları Roche LightCycler NanoSoftware® 1.0'da analiz edilmiştir.

Dizi Analizi ve Filogenetik Analiz

Dizi analizi için Bioeksen firmasından hizmet alınmıştır. Elde edilen bakteriyel amplikonların dizi analizleri Sanger yöntemiyle, ABI prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit® kullanılarak, ABI Prism 377 DNA Sequencer'da (Applied Biosystems, ABD) belirlenmiştir. Dizi analizi hem ileri, hem de geri primerler kullanılarak, çift yönlü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen diziler 4peaks yazılımı (<http://nucleobytes.com/index.php/4peaks>) ile analiz edilmiştir. Dizilerin DNA Data bankasında en çok benzer olduğu diziler NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) programı kullanılarak belirlenmiştir. DNA data bankasındaki mevcut dizilere %97 ve üzeri benzerlik gösteren diziler, benzer dizilime sahip organizma ile aynı tür olarak kabul edilmiştir. %70-97 arasında benzerlik gösteren türler ise, hem morfolojik özellikleri hem de 16S rRNA'larının en çok benzediği organizma göz önüne alınarak sınıflandırılmıştır. Bilinen bakteri türlerine 70%'den az benzerlik gösteren türler sınıflandırılmamış olarak listelenmiştir. DNA data bankasında mevcut dizilere %100'den daha az benzerlik gösteren diziler DNA data bankasına eklenmiştir.

Tablo 1. Isı döngüsü Programı

Tespit Formatı		Reaksiyon Hacmi		
SYBR Green		20 µl		
Programlar				
Program İsmi	Döngü Sayısı	Analiz Modu		
Ön-İnkübasyon	1			
Çoğalma	35	Sayım		
Erime Eğrisi	1	Erime Eğrisi		
Soğuma	1			
Sıcaklık Hedefleri				
Hedef (°C)	Okuma Modu	Bekletme (hh:mm:ss)	Hız (°C/s)	Okuma (°C başına)
Ön İnkübasyon				
95		00:10:00	4,8	–
Çoğalma				
95		00:00:20	4,8	–
53		00:00:20	2,5	–
72	Tek	00:00:25	4,8	–
Erime Eğrisi				
95		00:00:05	–	–
65		00:01:00	–	–
98	Sürekli	–	1	10
Soğuma				
40	Tek	00:00:10	2,5	–

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: KÜBRA ERKAN

Doğum Yeri: TOKAT

Medeni Hali: BEKAR

E-posta: kubra.erk@hacettepe.edu.tr

Adresi: H.Ü. Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji ABD, Beytepe Kampüsü ANKARA

Eğitim

Lise: Gaziosmanpaşa Anadolu Lisesi

Lisans: İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce- ÜDS (81.25)

İş Deneyimi

09.2010-05.2011: Araştırma Görevlisi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Kamil Özdağ Fen Fakültesi, Karaman

05.2011- ...: Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,
Ankara

Deneyim Alanları

Biyoteknoloji, Mikrobiyoloji

Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçesi

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP)
Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

(-)

Tezden Üretilmiş Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Erkan, K., Erdönmez, D., Sağlam, N., Aksöz, N., Determination Of Phytase Activity By Using *Chromobacterium violaceum* 026, FEMS 2013 Leipzig/Almanya 21-25 Temmuz 2013, Leipzig **2013**

