

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2014 -YL-040

***Aspergillus tubingensis* TARAFINDAN ÜRETİLEN FİTAZ**
ENZİMİNİN ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU

Sedef SOYAL

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Kubilay METİN

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Sedef SOYAL tarafından hazırlanan "*Aspergillus tubingensis* tarafından üretilen fitaz enziminin üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu" başlıklı tez, tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER	ADÜ	
Üye	: Doç. Dr. Halil BIYIK	ADÜ	
Üye	: Doç. Dr. Kubilay METİN	ADÜ	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN
Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

...../ /2014

Sedef SOYAL

ÖZET

***Aspergillus tubingensis* TARAFINDAN ÜRETİLEN FİTAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Sedef SOYAL

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Kubilay METİN
2014, 147 sayfa

Aspergillus tubingensis HBF 202 suşundan ekstrasellüler olarak PSM ortamında üretilen fitaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, Fenil Sepharoz CL-4B, DEAE Sefaroz CL-6B ve Sefadeks G-100 işlemleri uygulanarak % 7.24 verimle 101 kat saflaştırılmıştır. SDS-PAGE de tek bant elde edilmiş ve moleküler ağırlığı 63.48 kDA olarak hesaplanmıştır. Maksimum enzim aktivitesi pH 2.50 ve 60°C bulunmuştur. Enzimin geniş bir sıcaklık ve pH aralığında stabil olduğu saptanmıştır. Enzimin sodyum fitat için K_m değeri 267 μ M, ve V_{max} değeri 109.89 U/mL olarak hesaplanmıştır. Fitaz enziminin geniş bir substrat spesifikliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Fitaz aktivitesi, Ba^{2+} ve Li^+ katyonları tarafından artarken, Fe^{2+} , Al^{3+} ve Pb^{2+} katyonları tarafından inhibe olmuştur. Enzim NBS, PMSF, DTNB ve 2,3-bütandion tarafından inhibe edilmiştir. Ancak enzim CMC, DTT, ve β - merkaptetanol ile aktive olmuştur. Bu sonuçlar enzimin katalitik merkezinde triptofan, sistein, serin ve arjinin kalıntılarının önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Polihidrik alkollerden yalnızca sorbitolün sıcaklık stabilitesini artırdığı ve organik çözücülerin ise enzim aktivitesini çok fazla etkilemediği belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Fitaz, *Aspergillus tubingensis*, saflaştırma, karakterizasyon.

ABSTRACT**PRODUCTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
PHYTASE FROM *Aspergillus tubingensis* HBF 202**

Sedef SOYAL

M.Sc. Thesis, Department of Biology
Supervisor: Assist. Prof. Dr. Kubilay Metin
2014, 147 pages

Extracellular phytase produced by *Aspergillus tubingensis* HBF 202 in PSM was purified 101 - fold with a recovery of % 7,24 referred to the phytase activity in the crude extract using, ammonium sulphate precipitation, Phenyl Sepharose CL-4B, DEAE Sepharose CL-6B and Sephadex G-100. SDS-PAGE of the purified enzyme gave a single stained band at a molecular mass of approximately 63.48 kDa. The temperature and pH for maximum activity of the enzyme were 60°C and 2.50, respectively. K_m and V_{max} values for sodium phytate of the enzyme were calculated to be 267 μ M and 109.89 U/mL, respectively. The phytase exhibited broad substrate specificity. The phytase activity was stimulated by Ba^{2+} and Li^+ cations inhibited by Fe^{2+} , Al^{3+} ve Pb^{2+} cations. The enzyme activity was inhibited in the presence of NBS, PMSF, DTNB and 2,3-butanedione while CMC, DTT, ve β -mercaptoethanol were activated. This results shows that tryptophan, cysteine, arginine and serine residues play an important role in the catalytic process. Sorbitol enhances thermostability of phytase. The enzyme was determined to be highly resistant against organic solvents.

Key Words: Phytase, *Aspergillus tubingensis*, purification, characterization

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam süresince deneyim ve bilgi birikimini hiçbir zaman esirgemeyen, beni her zaman destekleyen ve çalışmalarına ışık tutan değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Kubilay METİN'e içten teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Z. Burcu BAKIR' a ve Doktora öğrencisi Öznur KOÇ' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın her aşamasında bilgi birikimini ve desteğini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Halil BIYIK'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin ön çalışmalarında yardımcı olan Arş. Gör. Gamze Sevri EKREN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım ve yaşıntımda her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Mehmet ÖZTÜRK'e ve Nilay Ezgi ÇAKAR'a teşekkür ederim.

Maddi ve manevi destekleri ile bugüne kadar hep yanımda olan canım annem Tülay SOYAL'a, sevgili babam Muzaffer SOYAL'a ve dünyadaki en büyük şansım kurtarıcı meleğim olan bir tanecik teyzem Şenay ÖNER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın yürütülmesinde FEF-13013 no'lu proje ile araştırmamızı destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırması Projeleri Başkanlığına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xxi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxv
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Enzimlerin Yapısal Özellikleri.....	1
1.3. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Numaralandırılması.....	3
1.4. Mikrobiyal Enzimler	4
1.5. Fitaz Enzimi (<i>Myo</i> -inositol-hegzafosfat fosfohidrolaz; EC 3.1.3.8)	5
1.6. Fitazların Sınıflandırılması.....	7
1.6.1. Fitazların Katalitik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması	7
1.6.1.1. Histidin asit fosfataz (HAP)	7
1.6.1.2. β - Propeller fitaz (BPPHy).....	9
1.6.1.3. Purple asit fosfataz (PAP)	9
1.6.1.4. Sistidin fosfataz (CP)	10
1.6.2. Fitazların Optimum pH ve Amino Asit Dizilerine Göre	...
Sınıflandırılması	10
1.7. Fitaz Enziminin Kaynakları	12
1.7.1. Mikrobiyal Fitazlar.....	12
1.7.1.1. Bakteriyel Fitazlar	12
1.7.1.2. Fungus ve Maya Fitazları	13
1.7.2. Bitkisel Fitazlar	14

1.7.3. Hayvansal Fitazlar	15
1.8. Fitat ve Yapısı	16
1.8.1. Fitik Asitin Anti-Besinsel Etkisi	17
1.8.2. Fitik Asitin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri	17
1.9. Fitaz Enziminin Endüstride Kullanım Alanları	18
1.9.1. Fitaz Enziminin Yemlerde Kullanılması	18
1.9.2. Fitaz Enziminin Gıda Endüstrisinde Kullanılması	19
1.9.3. Fitaz Enziminin <i>Myo</i> -İnositol Eldesindeki Önemi	20
1.9.4. Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrisi	21
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	22
2.1. Fitazların Saflaştırılması.....	22
2.2. Fitazların Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi.....	25
2.3. Fitazların Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin Etkisi.....	27
2.4. Fitazların Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi.....	28
2.5. Fitazların Substrat Spesifitesi	30
3. MATERYAL ve YÖNTEM	32
3.1. Materyaller	32
3.1.1. Kimyasallar	32
3.1.2. Mikroorganizma	32
3.2. Yöntemler.....	33
3.2.1. Fungusdan Genomik DNA İzolasyonu	33
3.2.2. İzole Edilen Fungusların Moleküler Tanılanması	33
3.3. Aflatoksin Testi	34
3.4. Fitaz Aktivitesinin Kantitatif Tayini	35
3.5. İnorganik Fosfat Standart Grafiği ve Hazırlanışı	36
3.6. Protein Tayini	37

3.6.1. Coomassie Brilliant Blue G-250 Çözeltisinin Hazırlanışı.....	38
3.6.2. Protein Standart Grafiğinin Hazırlanışı.....	38
3.7. Sporulasyon Ortamının Hazırlanışı.....	39
3.8. <i>Aspergillus tubingensis</i> HBF 202'nin Fitaz Üretim Ortamı	39
3.9. <i>Aspergillus tubingensis</i> HBF 202'nin Fitaz Üretimi Üzerine	
Kültür Koşullarının Etkisi	40
3.9.1. Enzim Üretimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi	40
3.9.2. Fitaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	40
3.9.3. Fitaz Üretimi Üzerine Başlangıç pH'sının Etkisi	41
3.10. <i>Aspergillus tubingensis</i> HBF 202'nin Büyüme Eğrisi.....	41
3.11. Fitazın Saflaştırılması.....	42
3.11.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	42
3.11.2. Diyaliz	43
3.11.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	44
3.11.4. İyon Değişim Kromatografisi	45
3.11.5. Jel Filtrasyon Kromatografisi.....	46
3.12. Elektroforez ve Zimografi.....	46
3.12.1. Fitazın Molekül Ağırlığının Belirlenmesi	46
3.12.1.1. PAGE ve SDS-PAGE İçin Gerekli Çözeltiler.....	46
3.12.1.2. Örneklerin Hazırlanışı ve Jele Uygulanışı.....	48
3.12.1.3. Jelin Boyanması	49
3.12.1.4. Zimografi.....	49
3.12.1.5. Fitazın Molekül Ağırlığının Hesaplanması	49
3.13. <i>Aspergillus tubingensis</i> HBF 202 Fitazının Karakterizasyonu	50
3.13.1. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	50
3.13.2. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi	50

3.13.3. Enzim Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi	50
3.13.4. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	51
3.13.5. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'ın Etkisi	51
3.13.6. Enzimin Sıcaklık Stabilitesi Üzerine Polihidrik Alkollerin Etkisi	51
3.13.7. Enzim Stabilitesi Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi	52
3.13.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonun Etkisi	53
3.13.9. Enzim Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi	53
3.13.10. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin ve Denatürantların Etkisi	54
3.13.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi.....	55
3.13.12. Enzim Aktivitesi Üzerine İnorganik Fosfatın Etkisi	55
3.13.13. Verilerin Değerlendirilmesi.....	57
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	58
4.1. Fungusun Moleküler Tanısı.....	58
4.2. Aflatoksin Testi	58
4.3. <i>Aspergillus tubingensis</i> HBF 202'nin Fitaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi	58
4.3.1. Enzim Üretimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi.....	59
4.3.2. Fitaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	63
4.3.3. Fitaz Üretimi Üzerine Başlangıç pH'sının Etkisi.....	66
4.4. <i>Aspergillus tubingensis</i> HBF 202'nin Büyüme Kinetiği.....	69
4.5. Fitazın Saflaştırılması.....	74
4.5.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	74
4.5.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	76
4.5.3. İyon Değişim Kromatografisi.....	76
4.5.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi.....	77
4.6. <i>Aspergillus tubingensis</i> HBF 202 Fitazının Karakterizasyonu.....	82

4.6.1. PAGE ve SDS-PAGE Yöntemi İle Fitazın	
Molekül Ağırlığının Tayini	82
4.6.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	85
4.6.3. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	88
4.6.4. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi	93
4.6.5. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'ın Etkisi.....	96
4.6.6. Enzim Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi	101
4.6.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonun Etkisi.....	102
4.6.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi.....	105
4.6.9. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin ve Denatürantların Etkisi.....	111
4.6.10. Enzim Aktivitesi Üzerine İnorganik Fosfatın Etkisi	115
4.6.11. Enzimin Sıcaklık Stabilitesi Üzerine Polihidrik Alkollerin Etkisi	116
4.6.12. Enzim Stabilitesi Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi	120
4.6.13. Enzim Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi	123
5. SONUÇ	127
KAYNAKLAR	129
ÖZGEÇMİŞ	147

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
[S]	Substrat konsantrasyonu
°C	Derece santigrad
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
AFBA	<i>Aspergillus</i> Differentiation Agar
APS	Amonyum persülfat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BPP	β- Propellar fosfataz
BPPhy	β- Propeller fitazı
BSA	Sığır serum albumini
CMC	Sikloheksil- N-(2-morfolionetil)-karboimid metil-p-toluen sulfonat
CP	Sistidin fosfataz
Da	Dalton
DMSO	Dimetil sülfoksit
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
g	Yer çekimi ivmesi
HAP	Histidin asit fosfataz
HAPPhy	Histidin asit fitaz
HBF	Halil Bıyık Fungus
IU	Uluslararası enzim ünitesi
kDA	Kilodalton
k _{cat}	Turnover sayısı
k _m	Michaelis-Menten sabitesi
L	Litre
M	Molar
MWCO	Molecular Weight Cut Off

MEA	Malt extract agar
mM	Milimolar
mmol	Milimol
NBS	N-bromo suksinamid
nm	Nanometre
Ort	Ortalama
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PAP	Purple asit fosfataz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>p</i> CMB	<i>p</i> - Kloromerküri benzoat
pH	H ⁺ iyonu konsantrasyonu
<i>p</i> HMB	<i>p</i> -Hidroksimerküribenzoik asit
PMSF	Fenil metil sülfonil florür
PSM	Fitaz tarama ortamı
rpm	Dakikadaki devir sayısı
S.H.	Standart Hata
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SH grubu	Sülfidril grubu
sp.	Tür
SSS	Substrat spesifik bölgesi
STE	Sodium klorit-Tris-EDTA
TCA	Trikloro asetik asit
TEMED	N,N,N',N'- Tetrametiletildiamin
U	Unite
V _{max}	Maksimum enzim aktivitesi
A	Alfa
B	Beta

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Fitatın fitaz ile hidrolizi.....	6
Şekil 1.2. Fitazların optimum pH ve amino asit dizilerine göre sınıflandırılması.....	11
Şekil 1.3. Fitik asit (<i>myo</i> -inositol-1,2,3,4,5,6-hexafosfat).....	16
Şekil 3.1. İnorganik fosfat standart grafiği.....	37
Şekil 3.2. Protein standart grafiği.....	38
Şekil 4.1. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 ITS gen bölgesinin dizileri ile en yüksek... homoloji gösteren GENBANK'daki dizilerle elde edilmiş neighbor . joining ağacı.	59
Şekil 4.2. Enzim üretimi üzerine inokulum miktarının etkisi	61
Şekil 4.3. Fitaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi	64
Şekil 4.4. Fitaz üretimi üzerine başlangıç pH'sının etkisi.....	67
Şekil 4.5. <i>A. tubingensis</i> HBF 202' nin gelişimine bağlı hacimsel aktivite ve biyokütle değişimi	72
Şekil 4.6. <i>A. tubingensis</i> HBF 202' nin gelişimine bağlı kültür ortamındaki pH ve biyokütle değişimi	72
Şekil 4.7. <i>A. tubingensis</i> HBF 202' nin kültür ortamındaki zamana bağlı gelişimi	73
Şekil 4.8. Fitaz enziminin hidrofobik etkileşi (Fenil Sefaroz CL-4B) kromatografisinde saflaştırılması	79
Şekil 4.9. Fitaz enziminin iyon değişim (DEAE Sefaroz CL-6B) kromatografisinde saflaştırılması	80
Şekil 4.10. Fitaz enziminin Jel filtrasyon (Sefakril 200 HR) kromatografisinde saflaştırılması	81
Şekil 4.11. Saflaştırma adımlarının PAGE (A) ve zimogram (B) görüntüleri ...	82

Şekil 4.12. Saflaştırma adımlarının SDS- PAGE görüntüleri	83
Şekil 4.13. SDS-PAGE protein standart eğrisi.....	83
Şekil 4.14. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 ham fitazının aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	86
Şekil 4.15. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 fitazının aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	88
Şekil 4.16. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 fitazının 25 ve 37 °C'deki sıcaklık stabilitesi.....	90
Şekil 4.17. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 fitazının 60, 70 ve 80 °C'deki sıcaklık stabilitesi	91
Şekil 4.18. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 ham fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	94
Şekil 4.19. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 saf fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	95
Şekil 4.20. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 fitaz stabilitesi pH'nın etkisi	98
Şekil 4.21. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 fitaz aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi	102
Şekil 4.22. <i>A. tubigensis</i> HBF 202 fitaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Michaelis- Menten Grafiği).....	103
Şekil 4.23. <i>A. tubigensis</i> HBF 202 fitaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk Grafiği).....	104
Şekil 4.24. <i>A. tubigensis</i> HBF 202 fitaz aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA' nın etkisi	110
Şekil 4.25. <i>A. tubigensis</i> HBF 202 fitaz aktivitesi üzerine inhibitörlerin ve denatürantların etkisi	114
Şekil 4.26. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 fitaz aktivitesi üzerine inorganik fosfatın etkisi	116
Şekil 4.27. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 sıcaklık stabilitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi	118

Şekil 4.28. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 fitazının stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisi.....	122
Şekil 4.29. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 fitazının substrat spesifikliğı.....	125

Çizelge 4.9. <i>A.tubingensis</i> HBF 202 fitazının 25 ve 37 °C sıcaklıkta stabilitesi.	91
Çizelge 4.10. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 fitazının 60, 70 ve 80 °C sıcaklıkta stabilitesi	92
Çizelge 4.11. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 ham fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.	93
Çizelge 4.12. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 saf fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	95
Çizelge 4.13. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 fitaz stabilitesi pH'nın etkisi	99
Çizelge 4.14. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 fitaz stabilitesi pH'nın etkisi	100
Çizelge 4.15. <i>A. tubingensis</i> HBF 202 fitaz aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi.....	101
Çizelge 4.16. <i>A.tubingensis</i> HBF 202 fitaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi	103
Çizelge 4.17. <i>A.tubingensis</i> HBF 202 fitaz aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA' nın etkisi	109
Çizelge 4.18. <i>A.tubingensis</i> fitaz aktivitesi üzerine..... inhibitörlerin ve denatürantların etkisi	113
Çizelge 4.19. Enzim aktivitesi üzerine inorganik fosfatın etkisi	115
Çizelge 4.20. <i>A.tubingensis</i> HBF 202 sıcaklık stabilitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi	119
Çizelge 4.21. <i>A.tubingensis</i> HBF 202 fitazının stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisi.....	121
Çizelge 4.22. <i>A.tubingensis</i> HBF 202 substrat spesifikliği	124

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler, biyokimyasal reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan, tüm canlı sistemler için gerekli, işlevsel protein yapısında olan moleküllerdir (Wolfson vd., 2008). Biyolojik katalizörler olarak da tanımlanan enzimler, hücre içinde üretilmelerine rağmen, hücre dışında da etki gösterebilirler. Bu özelliklerinden dolayı endüstride önemli kullanım alanına sahiptirler.

1.2. Enzimlerin Yapısal Özellikleri

Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç bütün enzimler proteindirler. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonlarının bütünlüğüne bağlıdır; bir enzim denatüre edilirse veya alt ünitelerine ayrıştırılırsa katalitik aktivitesi genellikle kaybolur; bir enzim amino asit bileşenlerine yıkılırsa katalitik aktivitesi bozulur. Bu nedenle; enzim proteinlerinin primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıları, katalitik aktiviteleri için esastır. Enzimler, diğer proteinler gibi 12.000'den 1.000.000 üzerine kadar değişen moleküler ağırlığa sahiptirler (Nelson ve Cox, 2004).

Bazı enzimler yalnız proteinden oluşmasına karşılık çoğu enzimler yapı ve görev bakımından iki farklı gruptan oluşmaktadır. Bunlar: “Apoenzim” ve “Koenzim/Kofaktör”dür. Apoenzim, enzimin yalnız belirli reaksiyonları katalizlemesini sağlayan yani enzimin spesifikliğini belirleyen kısmıdır. Bu grup protein yapısında olduğundan dolayı ısı ile kolayca denatüre (proteinin doğal özelliğinin kaybolması) olabilmektedir. Bazı enzimler aktivite için, protein yapıyı oluşturan amino asit rezidülerinden başka kimyasal bileşene ihtiyaç duymazlar. Bazı enzimler ise kofaktör diye adlandırılan bir ek kimyasal bileşene ihtiyaç duyarlar. Kofaktör, ya Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon ya da koenzim diye adlandırılan organik veya metalloorganik kompleks bir moleküldür. Koenzim organik ve inorganik maddelerden meydana gelmiş enzimin yardımcı ve etkin biçimi olup apoenzim varlığında etkinlik göstermektedir. Apoenzim gibi koenzim de tek başına etkin değildir. Koenzimlerin enzim

proteinine çok sıkı bir şekilde, kovalent olarak bağlı olup diyalizle enzim proteininden ayrılmayanları “prostetik grup” olarak adlandırılırlar. Koenzim (prostetik grup) ve apoenzim birlikteliğine “Holoenzim” (aktif enzim) denir (Pandey ve Ramachandran, 2006).

Enzimin etki ettiği bileşiğe substrat denir. Reaksiyon sonunda meydana gelen maddeye ise ürün adı verilir. Enzim ile substratın birbirine bağlanması ile ilgili 2 model ileri sürülmüştür. 1894’te Emil Fischer tarafından ileri sürülen anahtar-kilit modelinde, substratın enzimin aktif bölgesine bağlanırken yapısal olarak uygun şekilde anahtar kilit gibi birbirine bağlandığı kabul edilir. 1958’de Daniel Koshland tarafından ileri sürülen indüklenmiş-uyum modelinde ise; enzim substratı olmadığında serbest halde bulunur. Substrat varlığında enzim, substratını katalize uygun biçimde bağlayacak biçimsel değişikliğe uğrar. Enzimin bağlandığı substrat, ürüne veya ürünlere dönüşür ve reaksiyon tamamlandığında enzim değişmeden ayrılır. Bundan dolayı enzimler tekrar tekrar kullanılabilir. Enzimler genellikle çift yönlü çalışır yani geri dönüşümlüdür (Açıkel vd., 2006).

Enzimler, spesifik kimyasal reaksiyonları hızlandırırlar; substratları için yüksek derecede spesifiteye sahiptirler; sulu çözeltilerde çok ılımlı sıcaklık ve pH’larda fonksiyon gösterirler. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü düzenlemekle beraber hücre dışında da etkinliklerini korurlar. Enzimlerin spesifikliğı veya özgülüğü, katalize ettikleri belirli reaksiyonlar ile ilgili özellikleridir. Enzimler için çeşitli spesifiklikler (özgüllükler) tanımlanmıştır;

a) Mutlak spesifiklik: Bir enzimin, yalnızca spesifik bir substratın spesifik bir reaksiyonunu katalize etme özelliğidir.

b) Grup spesifikliğı: Bir enzimin, amino, fosfat ve metil grupları gibi benzer fonksiyonel grupları içeren substratı katalizleme özelliğidir.

c) Bağ spesifikliğı: Bir enzimin proteinlerin peptid bağı gibi belli bağ tipleri üzerine etkili olması özelliğidir.

d) Stereokimyasal spesifiklik: Bir enzimin bir bileşiğin sadece bir stereokimyasal şekli üzerine etkili olması özelliğidir. Örneğin; arjinaz enzimi, L-arjinini etkilerken D-arjinini etkilemez (Açıkel vd., 2006).

1.3. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Numaralandırılması

Enzimlerin belirlenmesine yönelik çalışmaların ilk yıllarında, bulunan enzimlere herhangi bir ayrıntılı sistematik kural olmaksızın verilen isimler, sayılarının azlığı nedeniyle yirminci yüzyılın ortalarına kadar önemli bir problem oluşturmamıştır. Ancak 1950'lerin sonlarına doğru enzimolojik araştırmaların hızla gelişmesi neticesinde, bulunan enzimlerin sayısındaki artış aynı bir enzime farklı araştırmacılar tarafından değişik isimlerin verilmesi sonucunu doğurmuştur. Enzimlere verilen isimlerin çoğu zaman o enzimin katalizlediği reaksiyonla hiçbir ilgisinin olmaması önemli karışıklıklara yol açmıştır. Bundan dolayı enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması için Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından önerilen sistematik adlandırmada enzimler altı ana sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar:

Enzim sınıfı 1: Oksidoredüktazlar

Oksidoredüktazlar, oksidasyon (yükseltgenme) ve redüksiyon (indirgenme) reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Yükseltgenme; moleküle oksijen eklemekle veya molekülden hidrojen ayrılmakla, böylece + değer artmasıyla olur. İndirgenme ise; molekülden oksijen ayrılmakla veya moleküle hidrojen eklemekle, yani + değer azalmasıyla olur. Bu tepkimeleri düzenleyen enzimler 2 gruba ayrılmıştır.

a) Dehidrogenaz: Hidrojen taşıyan ve aktaran enzimlerdir.

b) Oksidazlar: Elektron kaybeden ve aktaran enzimlerdir.

Enzim sınıfı 2: Transferazlar

Transferazlar, molekülden H^+ dışında, başka grupların (C, N ve fosfor taşıyan gruplar) bir molekülden diğerine transferini katalizleyen enzimlerdir.

Enzim sınıfı 3: Hidrolazlar

Hidrolazlar, su katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Enzim sınıfı 4: Liyazlar

Liyazlar, C-C, C-O, C-N ve C-S bağlarını yükseltgenme ve hidroliz dışında bir mekanizma ile kıran enzimlerdir.

Enzim sınıfı 5: İzomerazlar

İzomerazlar, optik ve geometrik izomerlerin rasemizasyonunu katalizleyen diğer bir deyişle molekül içinde değişiklik yaparak onun uzayda dizilişini değiştiren enzimlerdir.

Enzim sınıfı 6: Ligazlar

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

Sistemik adlandırma sisteminde her enzime enzim komisyonu (EC) tarafından verilen dört rakamlı kod numarası ve katalizlediği reaksiyonu tanıtan sistemik ad verilmektedir. Örneğin; ATP:glukoz fosfotransferaz enzimi, bir fosfat grubunun ATP'den glukoz transferini katalizlediğini belirtir. ATP:glukoz fosfotransferazın kod numarası (EC numarası) 2.7.1.1 dir. Burada birinci rakam, tepkimenin tipi veya sınıf adını (2; transferaz); ikinci rakam, donörün ilgili grubunu belirten alt sınıfı (7; fosfotransferaz); üçüncü rakam, akseptörün ilgili grubunu (1; -CH-OH); dördüncü rakam akseptör olan substratı (1; glukoz) ifade eder (Nelson ve Cox, 2004).

1.4. Mikrobiyal Enzimler

Azalan doğal kaynaklar nedeniyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için potansiyel olarak görülmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımı artmıştır (Demain ve Solomon, 1981). Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman, 1987). Mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmektedir (Demain ve Solomon, 1981).

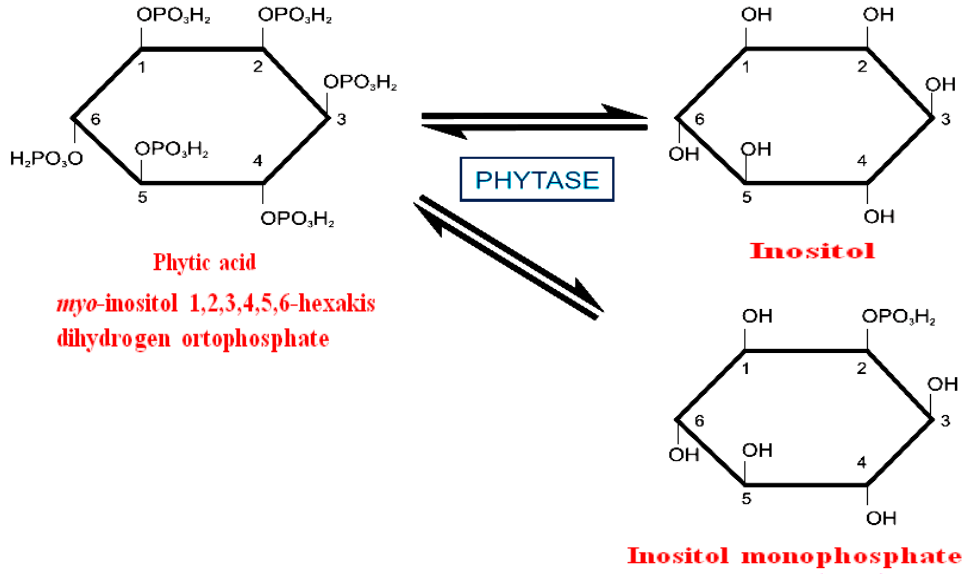
Mikroorganizmalar tarafından salgılanan enzimler ekstraselüler ve intraselüler enzimler olarak 2 gruba ayrılmaktadır. İntraselüler enzimler; sitoplazmaya dağılmış olarak bulunan ribozomlarda sentezlenirler ve bu enzimlerin substratları şekerler, amino asitler, karboksilik asit gibi küçük molekül ağırlığına sahip, hücre zarından geçebilme yeteneğinde olan moleküllerdir. Ekstraselüler enzimler ise; besiyeri ve hücre yapılarının dış kısmı ile bağlantı halinde olan enzimler olup, ortamda bulunan yüksek molekül ağırlıklı besin maddelerini hidroliz ederek mikroorganizma tarafından alınabilir forma dönüştürürler. Bu enzimlere genel olarak hidrolazlar denir (Madsen vd., 1973; John ve Sons, 1998). İntraselüler enzimlerin aksine ekstraselüler enzimlerin stabilitesi yüksek olup, çevre koşullarında aktivitelerini uzun süre koruyabilirler (John, 1987; Furlan ve Pant, 2006).

Teknolojideki yeniliklerle beraber mikrobiyal kaynakların kullanımına bağlı, endüstriyel enzimlerin gelişimide hız kazanmıştır. Endüstriyel enzim pazarı 2000 yılında 2 milyar dolara ulaşırken, günümüzde ise bu pazar gittikçe büyümektedir (Barredo, 2005).

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

Fitazlar son 15 yıldır biyoteknoloji, çevresel koruma, besin alanlarında hem bilim adamları hem de girişimcilerin ilgisini çekmektedir (Lei ve Stahl, 2001). Fitazlar; hububat, baklagiller ve yağlı tohumlarda bulunan fosfatın temel depo formu olan fitatın inositol çekirdeğinden, ortofosfat gruplarını ayırarak *myo*-inositol fosfatlar, *myo*-inositol ve inorganik fosfata hidrolizini katalizleyen enzimlerdir (Şekil 1.1) (Harland ve Morris, 1995; Van Etten, 1982; ; Lei vd., 2007).

Enzimlerin fosfomonoesterazlar sınıfına ait olan fitazlar, fitik asitten adım adım fosfatın ayrılmasını ya da fitatın indirgenmiş inositol fosfat esterlere ve inorganik fosfata hidrolizini katalize etmektedir (Lei ve Porres, 2003; Konietzny ve Greiner, 2004). Fosfatazlar, birçok organo-fosfat bileşiklerindeki monofosfoester bağlarının parçalanmasını katalizleyen geniş bir enzim sınıfı olup bu enzimler fitik asit içindeki monofosfoester bağlarını hidrolize edemezler. Fitik asidin monofosfoester bağlarını hidrolizleyen enzimlerin fitaz olarak adlandırılan özel bir sınıfa ait olduğu bildirilmiştir (Kerovuo, 2000).



Şekil 1.1. Fitatın fitaz ile hidrolizi (Baruah vd., 2007)

İlk olarak fitaz aktivitesi 1907 yılında Suzuki, Yoshimura ve Takaishi tarafından pirinç kepeğinde keşfedildi. Daha sonraki yıllarda bitki, maya, bakteri, fungus ve bazı hayvan dokularında da varlığı saptanmıştır (Konietzny ve Greiner, 2002).

Fitaz enzimi; bitki orjinli hayvan yemlerinin değerini arttırmak için hayvan yemi katkısı olarak kullanılmaktadır. İlk ticari fitaz enzimi olan Natuphos, toprak fungusu *Aspergillus niger*'den izole edilmiş olup, 10 N-glikolizasyon bölgeleri ile 80 kDa moleküler ağırlığa sahip ve 1.4 kb DNA fragmenti tarafından kodlanmış, *Aspergillus niger* PhyA'dır (Van Hartingsveld vd., 1993; Han ve Lei, 1999) ve 1991'de piyasaya çıkmıştır.

Fitazın moleküler ağırlığının organizma türlerine bağlı olarak 35-700 kDa arasında değiştiği saptanmıştır (Liu vd., 1998). Fitazlar, 45-60 °C aralığındaki sıcaklıklarda aktif ve geniş pH aralığında termostabildir. Genel olarak fitazlar, pH 2.2-8.0 arasında değişen optimum aktiviteye sahiptirler. Mikrobiyal fitazların çoğu özellikle fungal kökenli olup, 4.5-5.6 arasında optimum pH'ya sahiptir. Bazı bakteri fitazları, özellikle *Bacillus* suşlarından elde edilen fitazlar, 6.5-7.5 arasında optimum pH'ya sahiptir. Bitki tohumlarından elde edilen fitazların optimum pH'sı ise 4.0-7.5 aralığındadır (Dvorakova, 1998).

Günümüzde fitaz araştırmaların başlıca amaçları, tek mideli hayvanların (kanatlı hayvan ve balık yetiştiriciliğinde) besinlerindeki fitata bağlı fosforun kullanımını arttırarak, gbrelerinde çevreye fosfor atılımını azaltmak ve insan beslenmesinin iyileştirilmesi için, insan sağlığına faydalı özel inositol fosfatların oluşumunu sağlamaktır (Silva vd., 2005; Yoo vd., 2005).

1.6. Fitazların Sınıflandırılması

1.6.1. Fitazların Katalitik zelliklerine Göre Sınıflandırılması

Bitkiler leminde fitatın yaygın bulunuşu bitkiler, mikroorganizmalar ve bazı hayvanlar için bu bileşiği hidroliz etme ihtiyaını da beraberinde getirir. Birçok fitatı hidroliz eden enzim saptanmış ve çalışılmıştır. Ancak bu enzimler ne yapısal olarak ne de fitattan fosfat gruplarının ayrılma mekanizması olarak benzerdir. Bu enzimlerde gözlemlenen çeşitli katalitik özellikler ve de gereksinimler, organizmalarda *myo*-inositol fosfatlar üretmek için fitatı hidroliz eden mekanizmalarda farklılıklara neden olmaktadır. Fitazlar, katalitik merkezlerine göre dört farklı sınıfa ayrılmıştır. Bunlar: Histidin Asit Fosfataz (HAP), β -Propellar Fitaz (BPPHy), Purple Asit Fosfataz (PAP) ve Sistidin fosfataz (CP)'dir (Mullaney ve Ullah, 2005).

1.6.1.1. Histidin asit fosfataz (HAP)

Bugün fitik asidi hidrolizleyebilen dört fosfataz enzimi arasında en yaygın çalışılmış ve en çok bilinen HAP'dır (EC 3.1.3.8) (Edward vd., 2003). HAP'ın tüm yeleri ortak bir katalitik mekanizma ve spesifik bir aktif bölge bileşenine sahiptir. N-terminal aktif bölge bileşenini RHGXRXRP ve C-terminal bileşenini HD'dir (Wodzinski ve Ullah, 1996). Polipeptid zincirinin bu uzak dizileri uygun bir şekilde katlandığında, iki aşamalı reaksiyon olan fosfomonoesterlerin hidrolizini başlatan, tek katalitik merkezi oluşturacak şekilde birleşir (Van Etten vd., 1991).

Son araştırmalar enzimin substrat spesifikliği için bağlanma bölgesinin hayati bir rol oynadığını kanıtlamaktadır (Kostrewa vd., 1999). Fitatın oldukça negatif yüklü bir substrat olması nedeniyle, enzimin aktif bölgesi katalitik mekanizma için substratın bu zelline uyum sağlayabilmelidir. Bu nedenle, hem ökaryot hemde prokaryotlarda, fitatı etkin bir şekilde hidrolizleyen HAP'ların aktif bölgesi

substratın bağlanmasını kolaylaştırmak için, asidik pH'larda ağırlıklı olarak pozitif yüklüdür.

Histidin asit fitaz (HAPhy) terimi, fitatı hidrolizleyebilen HAP'ları etkin bir şekilde belirlemek için önerilmiştir (Oh vd., 2004). Hem prokaryotik hem de ökaryotik HAPhy'ların bilinen ve korunmuş aktif bölge bileşeni dışında çok az bir sekans benzerliği vardır. *E.coli*'ye ait HAPhy'ı, prokaryotik fitazlar arasında en çok çalışılan ve en iyi karakterize edilendir (Greiner vd., 1993). Ökaryotlarda en çok çalışılan HAPhy'ları ise *A. niger* ve *A. fumigatus*'tur (Mullaney vd., 2000).

Glikozilasyon, HAPhy'lerin yapısının belirlenmesinde ve stabilize edilmesinde en önemli faktördür. Proteinlere polisakkarit eklenen bu işlem enzime kararlılık kazandırır ve enzimin doğru katlanmasına yardımcı olur. Bugüne kadar karakterize edilmiş ekstraselüler fungus fitazların çoğu glikoprotein yapısındadırlar. HAPhy'lerde diğer önemli yapısal bileşen, fitazlarda katalitik aktiviteye olanak sağlayan, uygun 3 boyutlu yapının kazandırılmasında önemli rol oynayan disülfid köprüleridir (Wang vd., 2004; Mullaney, 2005; Kostrewa vd., 1997).

Mikrobiyal HAPhy'lar, substrat spesifikliğine dayanarak iki sınıfa ayrılır (Wyss vd., 1999a). İlk sınıfın substrat spesifikliği geniş, fakat fitat için düşük substrat spesifikliğine sahiptir. İkinci sınıf ise, substrat spesifikliği daha sınırlı iken, fitata karşı oldukça spesifiktir.

HAPhy'ların substrat spesifik bölgesinde (SSS), farklı substratlar ile etkileşimini kolaylaştıran, optimum pH ve substrat özgüllüğünü belirlenmesinde rol oynayan çeşitli amino asit kalıntıları tanımlanmıştır. *A. niger* NRRL 3135'in substrat spesifik bölgesinde iki asidik ve dört bazik amino asit kalıntıları (E228, D262, K91, K94, K300 ve K301) saptanmıştır (Mullaney vd., 2000). *A. niger*'den izole edilen PhyA ve PhyB HAP'ların aktif bölge özellikleri ile benzerlik gösterirken, SSS'leri farklıdır. PhyA molekülünde enzimin aktif bölgesini çevreleyen ve "gatekeeper" olarak görev alan SSS'de çeşitli amino asit kalıntıları tanımlanmıştır. PhyB'nin SSS'nin ise sadece iki asidik amino asitten (D75 ve E272) oluştuğunu saptanmıştır (Kostrewa vd., 1999). *A. niger* SSS'de pH 2.5'de dört bazik amino asitin (K91, K94, K300 ve K301) hepsi pozitif yüklüdür ve fitat molekülüne bağlanmaktadır. SSS'nin bölgesel elektrostatik alanı pH 5.0'e yükseldiğinde bile

fitaz için uygundur. Oysa PhyB'nin optimum pH'sı 2.5 olup, Phy A'nın aksine pH 5'de fitatı hidrolizleyemez.

1.6.1.2. β -Propeller fitazı (BPPHy)

β -Propeller fitazı (BPPHy) diğer fosfotazlardan çok farklı olması nedeniyle, yeni bir sınıf olarak kabul edilmiştir (Kerovuo vd., 1998; Ha vd., 2000). HAP fitaz yapısından farklı olarak da β -propeller fitaz, pervane gibi yerleştirilmiş 6 tane β -tabakadan oluşur (Ha vd., 2000; Shin vd., 2001). BPPHy, bilinen dört fosfotaz sınıfı içinde nötr ve alkalın pH da fitaz aktivite sergileyen tek sınıftır (Cheng ve Lim, 2005; Greiner vd., 2007).

BPPHy'ların *Caulobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Shewanella* sp., (Chan, 2004), *Bacillus subtilis* (natto) N-77 (Shimizu, 1992), *Bacillus subtilis* strain VTT E-68013 (Kerovuo vd., 1998), *Bacillus amyloliquefaciens* DS11 (Kim vd., 1998), *Bacillus subtilis* 168 ve *Bacillus licheniformis* (Tye vd., 2002) türlerinde olduğu bildirilmiştir.

Yapılan çalışmalarda BPPHy'ların hem katalitik faaliyetleri hem de termostabilitesi için Ca^{2+} 'a gerek duyduğu bildirilmiştir. BPPHy'ler dört ayrı kalsiyum bağlama bölgeleri ile metalloenzimlerdir (Shin vd., 2001). β -Propeller fitaz ailesinin bir üyesi olan 168 PhyA, geniş optimum pH aralığına ve yüksek termostabiliteye sahiptir (Chan, 2004). BPPHy'lar fitik asit için yüksek bir bağlanma affinitesine sahiptir (Kerovuo, 1998; Kim vd., 1998; Shin vd., 2001).

1.6.1.3. Purple asit fosfataz (PAP)

Hayvanlar, bitkiler, funguslar ve bakterilerde saptanan PAP'lar metalofosfoesteraz ailesinin bir üyesidir (Oh vd., 2004). PAP'lar aktif bölgesinde DXG..GDXXY.GNH(E,D)..VXXH..GHXH dizisine sahip olup, 7 tane metal bağlayan amino asit kalıntısı (D, D, Y, N, H, H, H) içerir. PAP fitazlarının fitatı hidrolizleme yetenekleri diğer fitazlarla karşılaştırıldıklarında oldukça düşüktür (Lei vd., 2007).

Çimlenmekte olan soya fasulyesi kotiledonlarından izole edilen Purple asit fosfataz, metalloenzimlerin geniş sınıfı ile ilişkili katalitik mekanizma içerir (Hegeman ve Grabau, 2001). GenBank'a PAP olarak kaydedilen sadece soya fasulyesi ve pirinç fitazları mevcuttur.

1.6.1.4. Sistidin fosfataz (CP)

Kısa zaman önce, anerobik rumen bakterisi *Selenomonas ruminantium*'dan fitazın diğer sınıfı olan Sistidin fosfataz (CP) saptanmıştır (Mullaney ve Ullah, 2005). Saptanan bu fitaz ile diğer mikrobiyal fitazlar arasında hiçbir dizi homolojisi ve yapısal benzerlik gözlenmemiştir. Ancak enzim, sistein fosfataz süper ailesinin üyelerinin katalitik alanı ve amino asit sekansının aktif bölge bileşeni ile önemli bir benzerlik göstermektedir (Chu vd., 2004). CP'nin aktif bölgesi HCXXGXXR(T/S) amino asit kalıntıları içermektedir (Denu ve Dixon, 1998).

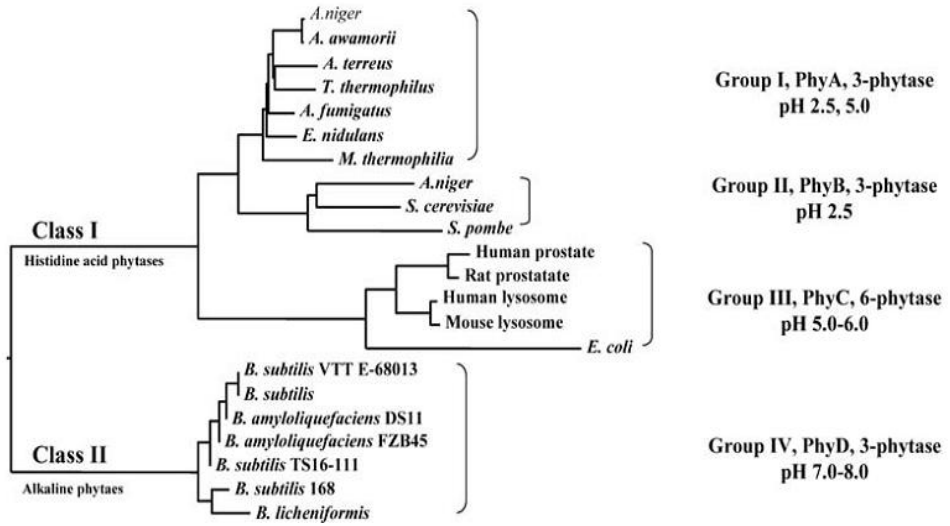
Sistidin fosfataz (CP) monomerik bir enzim olup, 46 kDa molekül ağırlığında, pH 4.0-5.5 ve sıcaklık 50–55 °C aktif olan bir enzimdir (Cheng vd., 1999). Kurşun katyonları, CP'nin aktivitesini artırdığı, Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının ise aktiviteyi inhibe ettiği saptanmıştır (Yanke vd., 1999).

1.6.2. Fitazların Optimum pH ve Amino Asit Dizilerine Göre Sınıflandırılması

Son zamanlarda çeşitli türlerden birçok alkali fitaz ve HAP genleri klonlanmış ve dizilenmiştir. Çeşitli fitazların amino asit dizilerinden oluşan bu filogenetik analiz, fitazları biyokimyasal ve katalitik özelliklerine göre dört alt gruba (PhyA, B, C, D) iki ana sınıfa (HAP'ler ve alkalın fitazlar) ayırmıştır (Oh vd., 2004) (Şekil 1.2).

Histidin asit fosfataz sınıfı geniş bir substrat spesifikliği gösterdiği asidik pH aralıklarında, metal içermeyen fitatı hidrolizlediği ve hidroliz sonucu son ürün olarak *myo*-inositol monofosfat oluşturduğu bildirilmiştir (Van Etten vd., 1991). Histidin asit fosfataz sınıfının bütün üyeleri aktif bölgelerinde korunan RHGXRXR motiflerine sahiptirler. Bu sınıf, spesifik katalitik merkezi ve optimum pH gibi amino asit dizi homolojisi ve biyokimyasal özelliklerine göre 3 farklı alt gruba (PhyA, PhyB, PhyC) ayrılmaktadır. Grup I (PhyA), 465-469 amino asitten oluşur ve *A. niger* (Van Hartingsveldt vd., 1993), *A. niger* (*awamori*) (Piddington vd., 1993), *A. fumigatus* (Pasamontes vd., 1997), *Emericella nidulans* (Pasamontes vd., 1997), *Myceliophthora thermophila* (Mitchell vd., 1997) ve *Talaromyces thermophilus* (Pasamontes vd., 1997) ekstraselüler HAP'ların PhyA alt grubunu içermektedirler. Bu fitazlar iki optimum pH değeri (2.5, 5.5) ve 55-60°C optimum sıcaklığa sahiptir. Grup II (PhyB), 453-479 amino asitten oluşur ve *A. niger* (Ehrlich vd., 1993), *Saccharomyces cerevisiae* (Bajwa vd., 1984),

Schizosaccharomyces pombe (Elliott vd., 1986) ekstraselüler HAP'ların PhyB alt grubunu içermektedirler. Bu grup, tek bir optimum pH değere (pH 2.5) ve 55-60°C optimum sıcaklığa sahiptir. Grup III (PhyC), 354-439 amino asitten oluşur. *E. coli*'nin (Dossa vd., 1990) asit fitazları, rat ve insanların lizozomal ve prostatik asit fosfatazları (Van Etten vd.,1991) PhyC alt grubuna dahildir. PhyC tek bir optimum pH değere (~ 5.0-6.0) ve 45-60 °C optimum sıcaklığa sahiptir.



Şekil 1.2. Fitazların optimum pH ve amino asit dizilerine göre sınıflandırılması (Oh vd., 2004)

Histidin asit fitazlara göre, substrat spesifikliğı daha az olan alkalın fitazlar (Sınıf II), kalsiyum fitata karşı oldukça spesifiktir ve hidroliz sonucu son ürün olarak *myo*-inositol trifosfatları oluşturmaktadır. Bu biyokimyasal farklılıklar ve filogenetik verilere dayanarak, *Bacillus* ve bazı bitki tohumlarında bulunan alkali fitazlar başka bir grup olarak sınıflandırılabilir: PhyD. *Bacillus* (Powar ve Jagannathan, 1982; Shimizu, 1992; Kerovuo vd., 1998; Kim vd., 1998; Choi vd., 2001; Idriss vd., 2002) ve bazı bitki tohumları, *Typha latifolia* L. polleni (Hara vd., 1985) ve *Lilium longiflorum* poleninden (Scott ve Loewus, 1986) elde edilen alkalın fitaz enzimleri 6.5-8.0 aralığında optimum pH'ya sahiptir.

1.7. Fitaz Enziminin Kaynakları

1.7.1. Mikrobiyal Fitazlar

Fitik asit üzerine doğrudan hidrolitik etki gösteren enzimler çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilirler (Dvorakova, 1998). Bu enzimlerin çoğu, histidin asit fosfotaz ya da alkali fitazın alt familyasına aittir (Lei vd., 2007). Fitaz enzimi bitkilerde, mikroorganizmalarda ve bazı hayvansal dokularda bulunmasına rağmen yapılan son araştırmalar, mikrobiyal fitazların biyoteknolojik uygulamalar için en ümit verici olduğunu göstermiştir (Pandey vd., 2001; Vohra ve Satyanarayana, 2003).

1.7.1.1. Bakteriyel Fitazlar

Bakterilerden izole edilen fitazlar glikolizasyona uğramayan histidin asit fosfataz ya da β -propeller yapılı alkali fitazlardır (Lei vd., 2007). *Escherichia coli* (Greiner vd., 1993), *Bacillus subtilis* (Greiner vd., 1997), *Klebsiella terrigena*, *Lactobacillus* sp. ve *Pseudomonas* spp (Kerovuo vd., 1998), *Pseudomonas* sp. (Irving ve Cosgrave, 1971), *Bacillus subtilis* (Powar ve Jagannathan, 1982), *Klebsiella* sp. (Shah ve Parekh, 1990), *Bacillus subtilis* (natto) N-77 (Shimizu, 1992), *Klebsiella aerogenes* (Tambe vd., 1994), *Enterobacter* sp. (Yoon vd., 1996) ve *Bacillus* sp. DS11 (Kim vd., 1998) gibi birçok bakteri türünde fitaz aktivitesi tespit edilmiştir.

Klebsiella terrigena (Greiner vd., 1997) ve *B. subtilis* (natto) N-77 (Shimizu, 1992) bakterilerinden elde edilen fitazlar monomerik enzimlerdir ve izole edildikleri kaynaklara bağlı olarak moleküler ağırlığı 35-700 kDa arasında değişmektedir. Bunun dışında *Klebsiella aerogenes*'den izole edilen fitaz enzimi diğer fitazlardan farklı olarak, 10-13 kDa olup kısa bir peptitden oluşmaktadır (Liu vd., 1998).

Genel olarak funguslardan üretilen fitazlar ekstraselüler olmasına rağmen bakteriler tarafından üretilen fitazlar çoğunlukla sitoplasmik membran ile ilişkilidir (intarsellüler). Bakteriyel fitazların ortalama olarak moleküler ağırlığı (40-55 kDa) glukolizasyon farkı olduğu için fungal fitazlardan (80-120 kDa) daha küçüktür (Choi vd., 2001; Golovan vd., 2000; Han ve Lei, 1999; Kerovuo vd., 1998). İzole edilen fitazların çoğunun pH optimumu 4.5-6.0 arasında yer

almaktadır. Ancak, *Bacillus* sp.'ye ait nötral veya alkali fitazlar da bulunmaktadır (Choi vd., 2001; Kim vd., 1998).

E. coli ve *Citrobacter braakii* fitazı, ticari olarak kullanılan *Aspergillus niger* fitazına kıyasla pepsin ve pankreatine daha dirençlidir (Kim vd., 2003; Rodriquez vd., 2000). Ayrıca *C. braakii* fitazı tripsine de dirençlidir. *E. coli* fitazı, *Bacillus* fitazı ile karşılaştırıldığında, pankreatine benzer hassasiyet gösterirken pepsine karşı daha hassastır (Simon ve Igbasan 2002). *E. coli* ve *C. braakii* fitazları yem katkısı olarak uygun özelliklere sahiptirler (Greiner vd., 1993).

1.7.1.2. Fungus ve Maya Fitazları

Mikrobiyal fitaz aktivitesi en çok funguslarda, özellikle de *Aspergillus* türlerinde belirlenmiştir. Shieh ve Ware (1968) fitaz üretimi için topraktan ikibinden fazla mikroorganizma izole etmişlerdir. Çoğu fitaz pozitiflerin sadece intraselüler fitaz ürettiği gözlenmiştir. Az sayıda görülen ekstraselüler fitaz üreticilerin filamentöz funguslar olduğu gözlenmiştir. Bunların büyük çoğunluğu *Aspergillus* cinsine ait organizmalar, ayrıca az bir kısmı da *Penicillium* ve *Mucor* cinsine ait organizmalardır. Diğer çalışmalarda, en iyi ekstraselüler fitaz üreticilerinin *Aspergillus niger* türleri olduğu gösterilmiştir (Howson ve Davis; 1983; Volfava vd., 1994). Fungus ve mayalardan izole edilen fitazların çoğu histidin asit fosfatazlardır, genelde 3-fitaz olarak sınıflandırılırlar, glikozillenmiş ve çeşitli substratlara karşı aktiftir enzimlerdir (Wyss vd., 1999b). *Aspergillus niger* PhyA, iyi karakterize edilmiş ve ticarileştirilmiş ilk fitaz olup 1.4 kb'lık bir DNA parçası tarafından kodlanmış bir enzimdir. Monomerik bir enzim olup, 80 kDa molekül ağırlığında, pH 2.5-5.5 ve sıcaklık 55-60 °C aktif olan bir enzimdir (Han vd., 1999).

Mikrobiyal fitazların çoğunun optimum sıcaklığı 45-60 °C arasında yer almaktadır. Ancak Pasamontes vd., (1997) *A. fumigatus*'a ait sıcaklığa dirençli fitazın 100 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda 20 dakikalık inkübasyonlarda sadece % 10'luk kayıpla aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir. *Peniophora lycii* PhyA mikroorganizmasından elde edilen fitaz enzimi de ticarileştirilmiştir. *Peniophora lycii* PhyA 6-fitaz enziminin optimum pH'sı 4.0-4.5 ve optimum sıcaklığı 50-55 °C'dir ve dimerik konformasyona sahiptir (Lassen vd., 2001). Isı uygulamaları ve proteazlar ya da düşük pH'ya duyarlı olduğu saptanmıştır (Simon ve Igbasan, 2002). Termofilik bir fungus olan *Rhizomucor pusillus*'dan izole edilen fitaz

kısmen saflaştırılmış ve 70 °C ve pH 5.4 de aktive gösterdiği saptanmıştır (Chadha vd., 2004). Quan vd., (2004) hava ile taşınan *Cladosporium* sp. FP-1 fungusundan düşük molekül ağırlıklı (32.6 kDa), glikozillenmemiş, optimum pH'sı 3.5, optimum sıcaklığı 40 °C ve son ürün olarak inositol 3- fosfat üreten fitaz enzimi izole etmişlerdir. *Myceliophthora thermophila* ve *Talaromyces thermophilus* termofilik funguslarından izole edilen fitazlar (Mitchell vd., 1997; Pasamontes vd., 1997), diğer *A. niger*, *A. terreus* ve *A. fumigatus* fungal fitazları amino asit dizilimleri açısından yüksek derecede dizi homolojisi göstermektedir. Berka vd., (1998) *Thermomyces lanuginosus* termofilik fungusundan izole edilen fitaz enziminin, *A. niger* fitazlarından daha iyi termostabilite ve katalitik verimliliğe sahip olduğunu saptamışlardır. Chadha vd., (2004) *Mucor pusillus* termofilik fungusu tarafından üretilen fitazın, geniş pH aralığında (3.0-7.8) oldukça aktif olduğunu bildirmişlerdir.

Saccharomyces cerevisiae, *Candida tropicalis*, *Torulopsis candida*, *Debaryomyces castelli*, *Kluyveromyces fragilis* ve *Schwanniomyces castelli* gibi mayaların da fitaz ürettikleri görülmüştür (Nayini ve Markasis, 1984).

1.7.2. Bitkisel Fitazlar

Fitaz enzimi, birçok bitkisel kaynaktan izole edilip tanımlanmıştır. Bu kaynaklardan bazıları; pirinç (Hayakawa vd., 1989), kolza tohumu (Houde vd., 1990), soya fasulyesi, mısır (Maugenest vd., 1999), buğday (Nakano vd., 1999) ve çavdardır (Weremko vd., 1997). Bu bitkilerin yanında beyaz hardal, patates, marul, ıspanak, turp, çimen ve zambak poleninden de fitaz elde edilmiştir (Dvorakova, 1998). Ayrıca çavdar ve tritikale (buğday×çavdar melezi) gibi bitkisel kaynaklar asit fosfataz aktivitesine sahiptir (Viveros vd., 2000). Bu tahılların ve ürünlerinin bitkisel fitaz kaynağı olarak kullanımı, hayvan beslenme çalışmalarında denenmiştir (Han vd., 1997).

Buğday, çavdar, tritikale ve arpada yüksek düzeylerde fitaz enzimi bulunmaktadır ve enzim özellikle tanenin kepek kısmında yoğunlaşmıştır (Selle ve Ravindran, 2007). Bu bitkilerin tanelerinin çeşitli varyetelerinde fitaz etkinliği geniş ölçüde çeşitlilik göstermektedir. Mısır, pamuk tohumu ve soya fasulyesi küspesinde ise fitaz etkinliği düşük düzeyde olup, mikrobiyal fitazlar kadar etkili değildirler (Woyengo ve Nyachoti, 2011). Bitki fitazlarının zayıf performans sebeplerinden biride pH aralıklarının dar olmasıdır (Greiner ve Konietzny, 2006).

Bitkilerden elde edilen fitazların çoğunun moleküler ağırlıkları 47-76 kDa olup, optimum pH'sı 4.5-6.0 ve optimum sıcaklığı 38-55 °C aralığındadır. Bitki fitazlarının kinetik özelliklerinde büyük farklılıklar bulunmaktadır (K_m 30–300 μ M; K_{cat} 43-704 s^{-1} ve spesifik aktivite 43-636 U/mg protein) (Lei vd., 2007).

Bitkisel fitazlar histidin asit fosfataz ailesine ait olup, genellikle 6-fitaz olarak kabul edilir. Ancak, yapılan çalışmalarda bitkisel fitazların bazılarının (Lupin LP11 ve LP12) ortofosfatı hidrolizlemeye, inositol halkasının D-3 pozisyonundan başladığı belirlenmiştir (Greiner vd., 2002). Bazı bitkisel fitazların alkalın fosfataz ya da purple asit fosfataz olduğu saptanmıştır. Çimlenmiş soya fasulyesinden izole edilen fitaz geninin, histidin asit fosfataza hiçbir benzerlik göstermediğini, fakat iki çekirdekli Fe(III)-Me(II) merkezini içermesi ile purple asit fosfatazlara yüksek oranda benzerlik gösterdiğini bildirilmiştir (Hegeman, 2001). Zambak poleni fitazının optimum pH'sının 8.0 ve sıcaklığının ise, 55 °C olduğu bildirilmiştir (Jog vd., 2005). Enzimin kalsiyum tarafından aktive olduğu, EDTA tarafından inhibisyona uğradığı ve son ürün olarak *D-myo*-Ins-1,2,3-trifosfat açığa çıktığı ve dar bir substrat spesifikliğine sahip olduğu bildirilmiştir. Enzimin optimum pH'sının 4.5-5.0 ve optimum sıcaklığının 58 °C olduğu belirlenmiştir.

1.7.3. Hayvansal Fitazlar

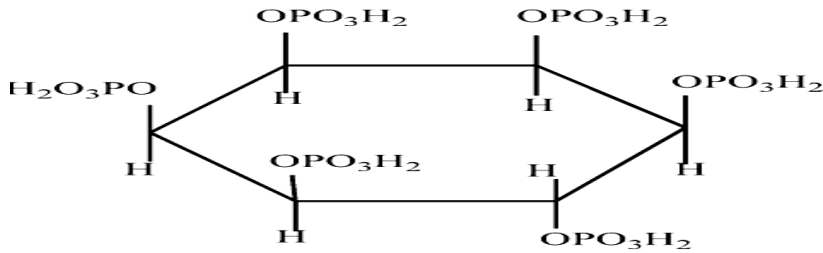
İlk hayvansal fitaz, buzağuların karaciğer ve kanında saptanmıştır. Hayvansal fitazların araştırılması, mikrobiyal ve bitki fitazları ile karşılaştırıldığında oldukça sınırlıdır. İnsan, rat, tavuk ve buzağuların bağırsak mukozalarında fitaz aktivitesi gözlemlenmiştir (Liu vd., 1998). İnsan ve rat ince bağırsak fitaz aktivitesi karşılaştırıldığında ise, insan ince bağırsağındaki fitaz aktivitesinin daha düşük olduğu saptanmıştır (Iqbal vd.,1994). Domuz yavrularının (7-10 günlük) tükürük salgılarında fitaz aktivesi (6000 U/mg) saptanmıştır. Saptanan bu fitaz aktivitesin domuz yavrularının büyümeleriyle orantılı olarak azaldığı gözlemlenmiştir (Golovan vd., 2001).

Bağırsak epitel hücre membranından fitazlar izole edilmiş olsa da (Maenz ve Classen, 1998; Ellestad vd., 2002), tek mideli hayvanlarda besinsel fitat fosforunun kullanılabilirliğini arttırmada yeterli değildir (Wise ve Gilbert, 1982). Günümüzde hayvan yemlerine düşük maliyetli ekzojen fitazın ilave edilmesi alternatif bir yol olup, hayvansal fitazın araştırılmasını gölgede bırakmıştır (Yanke vd., 1998).

1.8. Fitat ve Yapısı

Fitatların bulunuşu 1855-1856 yıllarında Hartig'in birçok bitki tohumundan nişastasız küçük tanecikleri izole etmesiyle başlar. Hartig bu küçük partikülleri tohumun çimlenmesi ve bitkinin büyümesi için temel olan maddelerin kaynağı olarak düşünür. Daha sonra 1872 de Pfeffer, Hartig tarafından izole edilen bu partiküllerin nişasta içermediğini ancak Ca, Mg ve P içerdiğini bulmuştur. Ayrıca bu partiküller içinde organik maddeler de gözlemlenmiş ve fosfatın karbonhidrat ile birleştiği tahmin edilmiştir ve inosite-fosforik asit olarak adlandırılmıştır. Pek çok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda, bu bileşik için çeşitli kimyasal yapılar gösterilmiştir. Fitik asidin konformasyonel yapısı X-ray analizi ve ^{31}P -NMR içeren modern kimyasal analizlerle artık bilinmektedir. Fitik asidin günümüzde kabul edilen adı; *Myo*-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6 hexakis fosfattır ve fitik asit tuzları genelde fitatlar olarak adlandırılır (Bilgin, 2007).

Fitazın substratı olan fitik asitin, (myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis fosfat) (Şekil 1.3) önemli bir miktarı tahıl ve baklagiller tohumlarının olgunlaşması sırasında birikmekte olup, bu tohumların çoğunda ve yan ürünlerinde % 1-2 fitik asit bulunmaktadır ve bu oran tohumlardaki toplam fosforun % 60'dan fazlasını oluşturmaktadır. Bununla birlikte birçok bitki türünün köklerinde, yumrularında, spor ve polenlerinde de daha düşük miktarlarda bulunabilmektedir. Fitik asit; myo-inositol halkası ve buna bağlı inorganik fosfattan oluşan bir ester asidi olup tahıl, baklagiller ve yağlı tohumlarda fosforun ana depo formudur. Kimyasal formülü myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hekzadihidrojen fosfat'tır. Moleküler formülü, $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$ ve moleküler ağırlığı $660.04 \text{ g mol}^{-1}$ 'dir (Sümengen, 2011).



Şekil 1.3. Fitik asit (*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexafosfat)

1.8.1. Fitik Asitin Anti-Besinsel Etkisi

Fitik asit; Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ve Fe^{2+} gibi divalent minerallerin güçlü bir şelatörüdür. Fitik asidin bu mineralleri şelatlama özelliğinden dolayı fitik asit, insan ve hayvanların beslenmesini etkileyen önemli bir moleküldür. İnsanlar ve hayvanlarda yapılan *invivo* ve *invitro* çalışmalar göstermiştir ki; fitatlar bu minerallerle kompleksler oluşturarak, bu minerallerin biyolojik kullanımını azaltmaktadır. Birçok fitat-mineral kompleksi çözülemez ve dolayısıyla normal fizyolojik şartlarda absorpsiyonu sağlanamayabilir. Fitatlar, doğada iyonik halde oldukları için, proteinlerin yüklü olan gruplarıyla direkt olarak ya da Ca^{2+} gibi pozitif yüklü iyonlar vasıtasıyla proteinlerin negatif olan gruplarıyla indirekt olarak reaksiyona girebilirler. Fitat-protein ve fitat-mineral-protein kompleksi oluşumu, proteinin parçalanmasını ve biyolojik kullanımını da olumsuz bir şekilde etkileyebilir (Ekren, 2013).

Fitatlar aynı zamanda proteinler ve nişasta ile bileşikler oluşturabilmektedir. Proteinler fitat molekülüne düşük pH'da doğrudan elektrostatik bölgelere veya yüksek pH'da tuz köprüleri oluşturarak bağlanabilmektedir. Nişasta ise fitat molekülüne hidrojen bağları ile bağlanmaktadır. Fitat ile oluşan bu bileşikler protein ve nişasta sindirimi üzerine olumsuz etki yapmaktadır. Proteinler yalnız fitata bağlı form olarak kalmayıp, proteaz etkinliğine de daha az duyarlı hale gelebilmektedir. Daha az duyarlı fitat-enzim bileşiklerinin oluşması mineral şelasyonu ile şekillenebilmekte ve sonuçta en uygun enzim etkinliği için gerekli kofaktörler ortadan kalkmaktadır. Dahası protein ve nişastayla oluşan bu bileşikler fitatın iyonizasyon düzeyini artırmakta ve fitat-mineral bileşiklerinin oluşabilme kapasitesinin artmasına yol açmakta, bu da farklı fitazların potansiyel etkinliğinin değişmesine neden olmaktadır (Maenz, 2001).

1.8.2. Fitik Asitin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Yapılan son çalışmalarda diyetle alınan fitik asitin faydalı etkilerinin de olabileceğine ilişkin veriler elde edilmiştir. Fitik asitin kolon kanserinin ve böbrek taşlarının oluşumunu azalttığı, kan kolesterolünü düşürdüğü literatürde bildirilmiştir (Bayraktar ve Akbulut, 2013). Ayrıca fitik asitin kemoterapide oldukça etkili olduğu ve lipaz aktivitesinde önemli azalmaya sebep olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar, fitik asitin deoksi hemoglobine çok sıkı bağlanması

nedeniyle, fitatın hemoglobin oksijen affinitesini düşüren en etkili kimyasallardan biri olduğunu bulmuşlardır (Bilgiçli, 2002).

1.9. Fitaz Enziminin Endüstride Kullanım Alanları

1.9.1. Fitaz Enziminin Yemlerde Kullanılması

Fitat, tohumların çimlenmesi sırasında enerji ve fosfor kaynağı olarak görev alsa da, bağlı fosfor tek mideli hayvanlarca çok az miktarda kullanılabilmektedir. Bu nedenle inorganik fosfor; yenilenemez ve pahalı bir mineral olup kanatlı, domuz ve balık rasyonlarında fosfor kaynağı olarak ilave edilmektedir. Bitkisel fosfor kaynaklarındaki kullanılmayan fitat fosforu zaman içerisinde birikmekte ve entansif olarak hayvan yetiştiriciliği yapılan alanlarda çevre kirliliğine neden olmaktadır. Topraktaki aşırı fosfor deniz ve göllere akmakta ve burada yaşayan canlılarda birikerek insanlarda da nörotoksik etki oluşturmaktadır (Aşan, 2007).

Fitat ve fitata bağlı fosfor tüm kanatlı rasyonlarında bulunmakta ve fitat fosforunun da kısmen kullanıldığı bilinmektedir. İlk olarak Warden ve Schaible 1962 yılında broylerde, ekzogen olarak verilen fitazın, fitat fosforunun kullanımını ve kemikteki mineralizasyonu artırdığını bildirmişlerdir. Ancak bundan yaklaşık 30 yıl sonra, yem katkısı olarak, fitata bağlı fosforu serbest bırakacak ve fosfor atığını azaltacak *Aspergillus niger* fitazının ticari olarak kullanımı başlamıştır. Günümüzde tek mideli hayvanlarda yem katkısı olarak fitaz kullanımı oldukça yaygınlaşmış olup hatta nişasta yapısında olmayan polisakkaritleri parçalayan enzimlerden daha fazla kullanılmaktadır (Aşan, 2007).

Hayvan yemlerine fitaz eklenmesi fosfatın yem malzemesi içine geçmesini sağlar ve gübredeki fosfat miktarını azaltır. Hayvanları, fitazlı yemle beslemenin kirlilik üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Eğer fitaz Amerika Birleşik Devletleri'nde yetiştirilen tüm monogastrik hayvanların yemlerinde kullanılsaydı 168 milyon dolar değerinde fosfor açığa çıkardı ve 8.23×10^4 ton fosfat çevreye geçmezdi (Wodzinski ve Ulah, 1996). Domuz besinine Finaz® fitazı eklenerek kullanılmayan fosfatın yaklaşık 1/3'ü kullanılabılır forma dönüştürülmüştür (Cromwell vd., 1993).

Birçok farklı kaynaktan elde edilen mikrobiyal fitaz ürünleri günümüzde ticari olarak kullanılmaktadır. Bunlar arasında yem katkısı olarak en yaygın

kullanılanları *A. niger*, *Peniophora lycii* ve *Escherichia coli* fitazlarıdır. Kanatlı rasyonlarına fitaz, granül veya sıvı formda eklenmektedir. Bazende yüksek peletleme sıcaklığındaki (>80 °C) enzim denatürasyonu probleminden kaçınmak için peletleme sonrasında uygulanabilmektedir (Aşan, 2007).

Su ürünleri üretiminde, soya küspesi ve diğer bitki kökenli küspeler kullanılarak birçok çalışma yürütülmüştür. Pahalı protein kaynakları yerine daha düşük fiyatlı bitkisel protein kaynakları kullanıldığında masraflarda önemli derecelerde azalmaların olabildiği bildirilmektedir. Balık üretim masraflarının % 70'ini yem giderleri oluşturmaktadır. Kanatlı ve domuzlarda olduğu gibi balıklarda yem maddeleri içerisindeki fitin fosforundan yararlanacak sindirim enzimine sahip olmadığından suda fosfor birikimi meydana gelmektedir. Bu nedenle fitaz su ürünleri üretiminde, hem düşük fiyatlı bitkisel kökenli maddelerin kullanımını artırmak hem de suda fosforu kabul edilebilir seviyede tutabilmek amaçları ile kullanılmaktadır. Balık beslemesinde, yüksek seviyelerde bitkisel kökenli maddeler içeren yemlerde fitaz enziminin kullanılması ile ilgili birçok çalışma yürütülmektedir (Aşan, 2007).

1.9.2. Fitaz Enziminin Gıda Endüstrisinde Kullanılması

Besinlerdeki fitat, gelişmekte olan ülkelerdeki insanların temel besini olan baklagiller ve tahıllar gibi bitkiden türetilmiş gıdaların ortak bileşenidir. Genellikle baklagiller kaynaklı gıdalar, tahıl kaynaklı gıdalardan daha fazla miktarda fitat içermektedir (Greiner ve Konietzny, 2006). Tahıl, baklagiller ve soya proteinlerince zengin beslenme, fitat alımında artışa neden olmaktadır. Vejeteryanlar, yüksek oranda tahıl yiyen, dengesiz beslenen insanlar, gelişmemiş ülkelerde mayasız ekmek yiyen insanlar fazla oranda fitat almaktadır (Simell vd., 1989). Diyetlerdeki bitki kökenli gıdaların miktarına ve gıdaların işlenme derecelerine bağlı olarak günlük fitat tüketimi en fazla 4500 mg'a kadar yükselmelidir. Ortalama olarak vejeteryen diyetlerinde ve gelişmekte olan ülkelerde kırsal kesimlerde günlük fitat tüketimi yaklaşık 2000-2600 mg olup bu değer karışık diyetlerde 150-1400 mg'dır (Aşan, 2007).

Diyetlerde fitatın varlığı ile ilgilenilmesinin nedeni mineral alımındaki negatif etkisidir. Bu mineraller çinko, demir, kalsiyum, magnezyum, mangan ve bakırdır. Fizyolojik pH değerlerinde çözünmez mineral-fitat komplekslerinin oluşumu düşük mineral emiliminin temel nedeni olarak bildirilmektedir. Çünkü bu

kompleksler aslında insan sindirim sisteminde absorbe olmamaktadır. Ayrıca sindirim sisteminin üst kısmında sınırlı miktarda mikrobiyal popülasyonun olması ve içsel fitatı hidrolize edici enzimlerin olmaması nedenleri ile ince bağırsakta, fitat çok sınırlı miktarda hidroliz olabilmektedir (Aşan, 2007).

Fitat, asidik ve alkali pH'da proteinlerle kompleks oluşturmaktadır. Bu interaksiyon proteinin yapısında değişiklikler meydana getirmekte ve bunun sonucunda enzimatik aktivitede, proteinin çözünürlüğünde ve proteolitik parçalanmada azalmalar meydana gelebilmektedir (Aşan, 2007).

Fitaz enzimi yem katkısı olarak kullanılmasının yanı sıra gıda sanayinde de büyük bir potansiyele sahiptir. Ancak şimdiye kadar marketlerde fitaz enzimi kullanılmış gıdalar bulunmamaktaydı. Bu alandaki çalışmalar, gıda işlemede teknik geliştirmenin yanı sıra bitki kökenli gıdaların besleyici değerlerinin artırılması üzerine yoğunlaşmıştır. Fitat içeriği yüksek diyetler mineral maddelerin absorpsiyonunu oldukça azaltmakta ve gıdaların işlenmeleri sırasında fitatın defosforilasyonu, sadece kısmen fosforile olmuş myo-inositol fosfat esterlerinin oluşmasına neden olmaktadır (Aşan, 2007).

Çimlendirme, pişirme, hidrotermal muamele, fermentasyon ve ıslatma gibi bazı gıda işleme yöntemleri ile baklagillerdeki fitatın az da olsa hidrolize edilebildiği gözlemlenmiştir (Rehms ve Barz 1995). Gıda sanayinde gıdaların işlenmesi sırasında fitaz ilavesi ekmek yapımı (Haros vd., 2005), bitkisel protein izolatlarının üretimi (Wang vd., 2004) ve tahıl kepeklerinin parçalanmasında kullanılmaktadır (Kvist vd., 2005).

1.9.3. Fitaz Enziminin Myo-İnositol Eldesindeki Önemi

Myo-inositol fosfatların astım gibi solunum hastalıklarını engellediği düşünülmektedir. Ayrıca spesifik inositol-trifosfatların ağrı kesici olarak kullanılması da önerilmiştir (Siren, 1995). İlginç olarak inositol-trifosfat esterlerinin HIV'ı da içine alan retroviral enfeksiyonlara karşı inhibitör etkisinin olduğu gösterilmiştir (Siren, 1998). Bu tip etkilerinden dolayı spesifik *myo*-inositol fosfatların kullanılmasına olan ilgi artmıştır.

Myo-inositol fosfatların kimyasal sentezi oldukça zordur ve oldukça ekstrem basınç ve sıcaklıkların uygulanması gerekmektedir (Billington, 1993). Fitazlar, *myo*-inositol hexafosfatın sıralı hidrolizini sağladığı için, *myo*-inositol fosfat

türevleri ve serbest *myo*-inositolün fitaz kullanılarak üretilmesi kimyasal senteze potansiyel bir alternatiftir.

Saccharomyces cerevisiae fitazının, fitik asidi hidroliz etmesiyle; D-*myo*-inositol 1, 2, 6-trifosfat, D- *myo*-inositol 1, 2, 5-trifosfat ve *myo*-inositol 1, 2, 3- trifosfatın elde edilebileceği gösterilmiştir. Ayrıca *E. coli* fitazı kullanılarak inositol 1,2,3,4,5-pentakisfosfat, inositol 2,4,5-trifosfat ve inositol 2,5-bifosfat da hazırlanmaktadır. İnositol fosfat türevleri enzim stabilizatörü, enzim inhibitörü, biyokimyasal ve metabolik araştırmalarda enzim substratı ve ilaç olarak da kullanılmaktadır. İnositol fosfat karışımları eklem iltihabı ve astım gibi solunum hastalıklarına karşı kullanıldığı ve spesifik inositol trifosfatların ağrı kesici olarak önerildiği de bildirilmiştir (Aşan, 2007).

Myo-inositolün farklı çok düşük fosfat esterlerinin bazı izomerleri, özellikle I(1,4,5)P₃ ve I(1,3,4,5)P₄ gibi hücre içi ikincil haberci görevinde önemli rol oynayan fosfotidilinositol siklusunda bulunur. Son zamanlarda elde edilen veriler, fitatın antikanser etkilerinin sinyal iletim yollarında, hücre döngüsü düzenleyici genlerinde, farklılaşmış genlerde, onkogenler ve belki de tümör baskılayıcı genlerde önemli rol oynadığını düşündürmektedir (Shamsuddin, 2002).

İnositol veya inositol fosfatların endüstriyel üretiminde, fitik asitten *myo*-inositol fosfat türevleri, serbest *myo*-inositoller ve inorganik fosfat eldesinde fitaz enzimi kullanımı önerilmektedir. Bu enzimatik hidrolizin avantajı fitaz enziminin spesifitesi ve reaksiyon koşullarına uygun olmasıdır (Aşan, 2007).

1.9.4. Kâğıt Hamuru ve Kâğıt Endüstrisi

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

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Fitazların Saflaştırılması

Öncelikle saflaştırılacak enzimin ne için gerekli olduğuna karar verilmelidir. Genel olarak analitik çalışmaları için ve sanayide kullanım için saflaştırma istenir. Analitik çalışmaları için az enzim ama saflık derecesi mümkün olduğu kadar yüksek; sanayideki kullanımı için ise çok enzim ama saflık derecesi fazla olmayan enzim istenir. Aktivite, yapı, yapı-işlev ilişkileri için % 80-90'lık saflık derecesi gerekmektedir. Hatta yapısal çalışmalar için bu oran % 95'den fazla olmalıdır. Aksi takdirde hatalı sonuçların normal sınırları geçmesi kaçınılmaz olacaktır.

Saflaştırma stratejisi belirlenirken dikkate alınması gereken hususlardan birisi de enzim kaynağıdır. Yani enzimin hangi canlıdan elde edileceğine karar verilmelidir. Bunlar bakteri, mantar, bitki, hayvan vs. olabilir. Hatta daha derinlemesine canlının belirli bir kısmı da enzim kaynağı olarak belirlenebilir. (Örneğin, fare karaciğeri, insan kanı). Olmazsa olmaz şartlarından birisi de maliyet ve zamandır. Bu tür çalışmalarda kullanılan araç-gereçler ve kimyasal maddeler çok pahalıdır. Bunların seçimi çok iyi planlanıp eldeki imkânlarla göre yapılmaya çalışılmalıdır. Kullanılabilecek alternatif yollar, araçlar ve kimyasal maddeler belirlenmelidir. Yapılacak çalışmaların çok uzun süreler alacağı hesap edilerek buna göre de gerekli tedbirler alınmalıdır. Belirli yerlerde yapılacak hatalar çok miktarda zaman kaybına neden olacaktır. Bu aynı zamanda maliyetin de artması anlamına gelir ki bu da hataların en aza indirilmesi için gerekli önlemlerin mutlaka alınması gerektiğini düşündürmektedir.

Powar ve Jagannathan (1982) *Bacillus subtilis*'den hücre içi sentezlenen fitaz enzimini sırasıyla etanol çöktürmesi, aseton çöktürmesi ve iki farklı iyon değişim kromatografisi ile % 32 geri kazanım ile 39 kat saflaştırmışlardır. Enzimin moleküler ağırlığı ultrasantrifüj ile sedimentasyon yöntemi kullanılarak 3.5 kDa olarak saptamışlardır.

Aspergillus ficuum NRRL 3135 (SRRC 265) fungusundan izole edilen fitaz enzimi sırasıyla iyon değişim kromatografisi, afinite kromatografisi ve tekrar iyon değişim kromatografisi ile 6.2 kat ve % 54 verimle saflaştırmıştır (Ullah A. H. J.,1988).

Greiner ve ark. (1997), *Klebsiella terrigena*'daki sitoplazmik fitazı sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, art arda uygulanan üç farklı iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi ile % 28 geri kazanım ile 410 kat saflaştırmışlardır. Saflaştırılan bu enzimin yaklaşık 40 kDa moleküler ağırlığında, monomerik bir protein olduğunu da tespit etmişlerdir.

Bacillus subtilis VTT E-6813 tarafından üretilen fitaz enzimi % 22 geri kazanımla etanol çöktürmesi, amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografisi adımlarının ardından 3.7 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan fitaz enziminin SDS-PAGE ile 43 kDa moleküler ağırlığına sahip olduğu saptanmıştır (Kerovu vd., 1998).

Kim ve ark., (1998), *Bacillus* sp. DS 11'den ekstraselüler fitazı; aseton çöktürmesi, hidrofobik etkileşim, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi ile % 10 verimle 77 kat saf olarak elde etmişlerdir. SDS-PAGE ile de enzimin moleküler ağırlığının 44 kDa olduğunu saptamışlardır.

Tseng ve ark., (2000) *Penicillium simplicissimum* tarafından sentezlenen fitazı ultrafiltrasyon, iki farklı iyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim ve jel filtrasyon kromatografisi ile 38.2 kat saflaştırmışlardır. Enzimin moleküler ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile 65-67 kDa, denatüre proteinin moleküler ağırlığı ise SDS-PAGE ile 65 kDa olarak saptamışlardır.

Lactobacillus sanfranciscensis CB1'den fitaz enzimi sırasıyla iyon değişim, jel filtrasyon ve tekrar farklı bir iyon değişim kromatografisi uygulanarak % 18 verimle 160 kat saflaştırılmış ve denatüre enzimin moleküler ağırlığı 50 kDa olarak bulunmuştur. (Angelis vd., 2003).

Deniz suyundan izole edilen *Citrobacter braakii* YH-15'dan fitazı amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik etkileşim kromatografisi, art arda üç farklı iyon değişim kromatografisi uygulanarak % 28 verimle, 12800 kat saflaştırılmıştır (Kim vd., 2003).

Cladosporium sp. FP-1 tarafından üretilen fitaz enzimi sırasıyla ultrafiltrasyon, etanol çöktürmesi, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi uygulanarak % 22.9 geri kazanımla 6.3 kat, saflaştırılmıştır (Quan vd., 2004).

Debaryomyces castellii CBS 2923 mayası tarafından sentezlenen fitaz enzimi hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulanarak % 59 verimle, 13.6 kat saflaştırılmış ve denatüre enzimin moleküler ağırlığı 77 kDa olarak bulunmuştur. (Ragon vd., 2008).

Aspergillus ficuum NTG-23 fungusundan SDS-PAGE ile 65.5 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu saptanan fitaz enzimi, sırasıyla iki farklı iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi ile % 23.8 geri kazanımla, 71.5 kat saflaştırılmıştır. (Zhang vd., 2010).

Flammulina velutipes fungusu tarafından üretilen fitaz enzimi, sırasıyla iyon değişim kromatografileri (DEAE-selüloz, CM-selüloz), afinite kromatografisi (Affi-gel blue gel), hızlı protein likit kromatografisi (Superdex 75) uygulanarak 30 kat, % 19 verimle saflaştırılmıştır. Monomerik olan enzimin moleküler ağırlığı, jel filtrasyonu ve SDS-PAGE ile 14 kDa olarak saptanmıştır (Zhu, vd., 2011).

Aspergillus tamari tarafından hücre dışı sentezlenen fitaz enzimi üzerine yapılan çalışmada, enzim sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi (% 0-90), iyon değişim kromatografileri (DEAE-Sefaroz CL6B, CM-Sefaroz CL6B) ve jel filtrasyon kromatografileri (Sephacryl S-200HR, MonoS HR5/5) uygulanarak 51 kat, % 20.3 verimle saflaştırılmıştır. Monomerik olan enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 85 kDa olarak saptanmıştır (Shah ve Trivedi, 2012).

Klebsiella pneumoniae 9-3B tarafından üretilen fitaz enzimi sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, iki farklı iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi uygulanarak 2077 kat, % 15.8 verimle saflaştırılmıştır. Monomerik olan enzimin moleküler ağırlığı, SDS-PAGE ile 45 kDa olarak belirlenmiştir (Escobin-Mopera vd., 2012).

Rhizopus oligosporus MTCC5556 tarafından üretilen fitaz enzimi sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi uygulanarak 5.8 kat, % 35.2 verimle saflaştırılmıştır. Monomerik olan enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 88 kDa olarak saptanmıştır (Surya vd., 2013).

Bacillus subtilis ATCC 6051 tarafından üretilen ekstrasellüler fitaz enzimi, aseton çöktürmesi, katyon ve anyon değişim kromatografileri uygulanarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı ise SDS-PAGE ile 43 kDa olarak saptanmıştır (Soma vd., 2013).

Bacillus nealsonii ZJ0702 tarafından sentezlenen nötral ve ısıya dayanıklı fitaz enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi uygulanarak 44 kat, % 5.7 verimle saflaştırılmıştır. Monomerik olan enzimin moleküler ağırlığı, SDS-PAGE ile 43 kDa olarak belirlenmiştir (Yu ve Chen, 2013).

Bacillus licheniformis PFBL-03 tarafından sentezlenen ekstrasellüler fitaz enzimi üzerine yapılan çalışmada, enzim sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi ile 39 kat, % 10 verimle saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 36 kD olarak belirlenmiştir (Feyisola vd., 2014).

Schizophyllum commune tarafından sentezlenen fitaz enzimi, polietilen glikol (% 22) / sodyum sitrat (% 14) sulu iki-fazlı bir sistem (ATPS) kullanılarak 5.43 kat, % 367 verimle (üst faz da) kısmi olarak saflaştırılmıştır (Salmon vd., 2014).

2.2. Fitazların Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi

Fitaz aktivitesi, genellikle belli pH ve sıcaklık koşulları altında seçilmiş substrattan dakika başına serbest kalan inorganik fosfat miktarını ölçmektedir. Diğer enzimler gibi fitaz aktivitesi de enzimin doğal özelliklerinden ve ortam koşullarından etkilenmektedir.

Enterobacter sp.4. fitazının optimum koşulları pH 7.0-7.5 ve 50-60 °C'dir. Enzim 40 °C'de 20 saatlik inkübasyonun ardından aktivitesinin % 15'ni kaybederken 70 ve 80 °C'lerde ise aktivitesinin tamamını kaybetmiştir (Yoon vd., 1996).

Bacillus sp. DS 11'den izole edilen ekstrasellüler fitazın optimum koşulları pH 7.0-8.0 ve 70 °C'dir. 5 mM CaCl₂ varlığında, 90 °C'de 10 dakika inkübasyondan sonra enzim aktivitesinin % 50'sini koruyabilmiştir (Kim ve ark., 1998).

Kerovuo ve ark. (1998), *Bacillus subtilis* VTT-E- 68013'den izole ettikleri fitazın maksimum aktivitesinin pH 7.0 ve 55 °C'de olduğunu tespit etmişlerdir.

Aspergillus niger NCIM 563 mikroorganizmasından elde edilen ham fitazın optimum koşulları pH 5.0 ve 50 °C'dir. Enzim 55 °C'de 1 saat inkübasyonun ardından orijinal aktivitesinin % 75'ni koruduğu saptanmıştır (Mandviwala ve Khire, 2000).

Optimum sıcaklığı 60 °C olan *Pichia anomala* fitazının 80 °C’de optimum aktivitesinin % 85’ini, 100 °C’de ise optimum aktivitesinin sadece % 7’sini koruyabildiği saptanmıştır. Enzimin optimum pH’ı ise 4.0 olarak belirlenmiştir. Enzim 70 °C’de 30 saat stabildir ve yarılanma ömrü 48 saat olarak saptanmıştır. (Vohra ve Satyanarayana 2002).

Aspergillus niger ATCC 9142 fitazının optimum koşulları pH 5.0 ve 65 °C’dir. Geniş pH aralığında aktivite gösteren enzimin pH 3.0’de 12 saat stabil olduğu saptanmıştır. Enzim 80 °C’de 3 saat inkübasyonun ardından aktivitesinin % 22’sini koruyabilmiştir (Casey ve Walsh 2003).

Mucor indicus MTCC 6333 fitazının optimum aktivitesini pH 6.0 ve 70 °C’de gösterdiği saptanmıştır. Farklı sıcaklıklarda (50-70 °C) 4 saat inkübe edilen enzimin 60 °C’de 1.5 saat stabil olduğu saptanmıştır (Gulati vd., 2007b).

Optimum sıcaklığı 65 °C olan *Kodamaea ohmeri* BG3 fitazının 60 °C’ye kadar sıcaklıklarda 1 saat stabil olduğu saptanmıştır. Optimum pH’ı 5.0 olan enzim, 3.0-9.0 pH aralığında 4 °C’de 6 saat boyunca aktivitesini koruduğu bildirilmiştir (Li vd., 2008).

Aspergillus niger 11T53A9 tarafından ekstraselüler olarak üretilen fitaz enziminin optimum aktivitesinin 55 °C’de gösterdiği bulunmuştur. Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen enzim, 55 °C’ye kadar 10 dakika süresince aktivitesinin tamamını korurken, 70 °C de ise 10 dakika sonra aktivitesinin % 45’ini koruyabilmiştir. Optimum pH’sı 5.0 olan enzim, düşük pH değerlerinde ise stabildir (Greiner vd., 2009).

Bacillus licheniformis tarafından üretilen termostabil β -propeller fitazın optimum koşulları pH 6.0-8.0 ve 55 °C ’dir. Enzim, 80 °C’de 1 mM CaCl₂ varlığında 10 dakika inkübasyon sonucunda aktivitesinin % 57.36’sını koruyabilmiştir. β -propeller fitazı pH 6.0-8.0 aralıkların da 1 mM CaCl₂ varlığında 55 °C de 1 saat inkübasyon sonrası aktivitesinin % 60’ından fazlasını korumuştur (Wang vd., 2013).

Aspergillus niger UA-D’den izole edilen fitazın optimum koşulları pH 3.0 ve 70 °C’dir. Enzim 60 °C’de 3 saatte aktivitesinin % 90’ını, 70 °C’de 1 saatte aktivitesinin % 80’ini koruyabildiği saptanmıştır (Ekren, 2013).

Bacillus licheniformis PFBL-03 tarafından ekstraselüler olarak üretilen fitazın optimum koşulları pH 6.0 ve 55 °C'dir. Enzim pH 4.0-7.5 aralığında 5 saat inkübasyon sonucunda aktivitesinin % 90'dan fazlasını korumuştur. Enzim 80 °C'de 90 dakikalık inkübasyonun ardından aktivitesinin % 55'ini korumuştur (Fasimoye vd., 2014).

2.3. Fitazların Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin Etkisi

Reaksiyon mekanizmalarının aydınlatılmasında en önemli adım enzim aktif merkezinde yer alan amino asitlerin saptanması ve konumlarının belirlenmesidir. Bu amino asitler bağlanma merkezi ve katalitik merkez olarak görev alırlar. X-ışını yöntemleri bu iki grup amino asidi belirlemede çok yararlıdır.

Bacillus subtilis (natto) N-77 fitazının 5 mM sodyum azid (NaN_3), fenilmetilsülfonil florür (PMSF) ve p-kloromerküri benzoat (pCMB) varlığında inhibe olmadığı bildirilmiştir (Shimizu, 1992).

Hordeum vulgare (Arpa) fitazı 10^{-4} ve 10^{-3} M siyanür, azid, spesifik sülfidril inhibitörü 2-merkaptotanol ve iyodoasetat ve serin inhibitörü olan fenilmetilsülfonil florür (PMSF) varlığında 37 °C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra enzim aktivitesi üzerinde önemli bir inhibisyon gözlenmemiştir. Fitaz inhibitörü olan florür, hidroliz ürünü olan fosfatın yapısal analogu olan molibdat ve vanadatın enzimi kuvvetle inhibe ettiği bildirilmiştir (Greiner vd., 1998).

Pichia anomala fitazının % 1 veya 1 mM sodyum azid, β -merkaptotanol, PMSF, gliserol, toluen, DTT, iyodoasetat ve N-bromosüksinamid (NBS) tarafından inhibe edilmediği bildirilmiştir. Enzim % 0.1'lik SDS (anyonik deterjan) tarafından kuvvetle inhibe edildiği fakat % 0.1'lik Triton X-100, Tween 80 ve Tween 20 (noniyonik deterjanlar) tarafından % 30 aktivite kaybı ile hafif bir inhibisyona uğradı saptanmıştır (Vohra ve Satyanarayana, 2002).

Angelis vd., (2003) *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1 fitazın 2 mM NEM, iodoasetamid, PMSF, DL-penisilamin, DTT varlığında 45 °C'de 30 dakika inkübasyonunun ardından, serin inhibitörü olan PMSF tarafından kuvvetle inhibe edildiği ve diğer inhibitörlerin ise enzim aktivitesi üzerinde önemli bir inhibisyona yol açmadıklarını bildirmişlerdir.

Aspergillus niger van Teighem fitazı, β -merkoptoetanol, iyodoasetat, PSMF, pHMB ve fosfomisin 2 mM'a kadar olan konsantrasyonlarında bir inhibisyona neden olmadığı saptanmıştır (Vats ve Banerjee, 2005).

Kodamaea ohmeri BG3 tarafından sentezlenen fitaz enziminin serin inhibitörü olan PSMF ve iyodoasetat varlığında önemli bir inhibisyona neden olmadığı saptanmıştır. Enzimin histidin asit fosfatazın spesifik inhibitörü olan fenilgliyoksal tarafından kuvvetli bir şekilde inhibe olduğu belirtilmiştir (Li vd., 2008).

Aspergillus niger 11T53A9 fitazının 10^{-4} ve 10^{-3} M florür, molibdat, wolfram ve vanadat, varlığında 37 °C'de 15 dakika inkübasyonun ardından, fitaz inhibitörü olan florür, hidroliz ürünü olan fosfatın yapısal analogu olan molibdat, wolfram ve vanadat tarafından kuvvetli bir şekilde inhibe edildiği bildirilmiştir (Greiner vd., 2009).

Bacillus licheniformis termostabil β -propeller fitazı, 1 mM ve 5 mM PMSF ve DTT varlığında oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra enzim aktivitesi önemli bir inhibisyona uğramamıştır (Wang vd., 2013).

2.4. Fitazların Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi

Metal iyonları katalitik işleme farklı yollarla yardımcı olurlar. Ya substrata bağlanarak reaksiyon için onun doğru yönelimini sağlarlar, ya oksidasyon sayılarındaki dönüşümlü değişimlerle redoks reaksiyonlarına katılırlar ya da substratın negatif yükünü elektrostatik olarak kararlı hale getirirler. Divalent iyonların şelatlayıcı ajanı olan EDTA, metalloproteinlerin ve aktivasyonları için divalent katyonlara ihtiyaç duyan enzimlerin bir inhibitörüdür (Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 2001).

Bacillus sp. DS11 fitazının aktivitesi üzerinde 5 mM Mn^{2+} , Cd^{2+} iyonları ve EDTA ciddi bir inhibisyona neden olurken, Mg^{2+} , Hg^{2+} , Ba^{2+} ve Cu^{2+} iyonları varlığında ise enzim aktivitesinin yaklaşık % 50'sinin korunduğu saptanmıştır (Kim vd. 1998).

Yanke vd. (1999) *Selenomonas ruminantium* JY35 fitazının 5 mM Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} ve Zn^{2+} iyonları varlığında enzim aktivitesi üzerinde ciddi bir inhibisyona neden olduğunu saptamışlardır.

Aspergillus niger NCIM 563 fitazı 1 mM Zn^{2+} varlığında aktivitesinin % 55'ini korurken diğer katyonların (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} ve Fe^{2+}) varlığında ise herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir (Mandviwala ve Khire, 2000).

Candida krusei WZ-001 fitazı Ba^{2+} ve Pb^{2+} katyonları, EDTA ve oksalat gibi şelatlayıcı ajanların aktivite üzerinde önemli inhibisyon etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Enzim 1 mM Fe^{2+} varlığında orijinal aktivitesinin % 30'unu kaybederken, Fe^{2+} 'nin 5 mM'a kadar artan konsantrasyonlarında ise, orijinal aktivitesine ulaştığı saptanmıştır (Quan vd., 2002).

Citrobacter braakii fitazının metal iyonları ile 37 °C'de 2 saat inkübasyonun ardından, Fe^{3+} , Zn^{2+} ve Cu^{2+} katyonlarının çok düşük konsantrasyonlarda bile enzimi güçlü bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur (Kim vd., 2003).

Klebsiella pneumoniae subsp. *pneumoniae* XY-5 fitazın 5 mM EDTA tarafından aktive edildiği ve muhtemelen eser miktardaki ağır metalleri ortamdan uzaklaştırarak enzim aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. (Wang vd., 2004).

Aspergillus oryzae AK9 fungusundan elde edilen ham fitaz enzimi, 1 ve 100 mM EDTA, Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} ve Zn^{2+} varlığında, 37°C'de 1 saat inkübasyonun ardından, enzimin EDTA ve Zn^{2+} dışındaki bütün iyonlara karşı stabil olduğu belirlenmiştir. EDTA ve Zn^{2+} 'nin ise aktivite üzerinde ciddi bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Fe^{2+} katyonunun varlığında ise, enzim aktivitesinde orijinal aktiviteye göre yaklaşık % 50'lik bir artış gözlenmiştir (Chantasartrasamee vd., 2005).

Bacillus licheniformis tarafından üretilen termostabil β -propeller fitazın aktivitesi üzerinde 1 ve 5 mM Cd^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} ve Ba^{2+} katyonlarının ve EDTA'nın inhibe edici etkisi olduğu gözlemlenmiştir (Wang vd., 2013).

Rhizopus oligosporus tarafından üretilen fitaz aktivitesi üzerine 5 mM da Mn^{2+} , Zn^{2+} Mg^{2+} ve Ca^{2+} katyonlarının etkisi çalışılmıştır. Bunlar içerisinde fitaz

aktivitesini artıran 5 mM Mg^{2+} katyonu olmuştur. Diğer katyonların ise aktivite üzerinde önemli bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir (Surya vd., 2013).

Lactobacillus plantarum fitazı, 1 ve 5 mM $CaCl_2$ (% 62, % 63), $HgCl_2$ (% 68, % 67), $MgCl_2$ (% 72, % 62), $MnCl_2$ (% 65, % 66), $ZnCl_2$ (% 62, % 56), $NiCl_2$ (% 61, % 66), $CuCl_2$ (% 67, % 63), $CoCl_2$ (% 74, % 68) ve $FeCl_2$ (% 74, % 67) varlığında 37 °C’de 1 saat inkübasyondan sonra, enzim aktivitesi üzerinde farklı düzeylerde inhibisyona neden olduğu belirlenmiştir (Sümengen vd., 2013)

Bacillus licheniformis PFBL-03 fitazın aktivitesi üzerine 2 mM da Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} ve Hg^{2+} ve Zn^{2+} katyonlarının ve EDTA’nın etkisi çalışılmıştır. Bunlar içerisinde fitaz aktivitesini artıran Ca^{2+} (2 mM) katyonu olmuştur. Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} ve Hg^{2+} ve Zn^{2+} katyonlarının ise enzim aktivitesi üzerinde güçlü bir inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir. Mg^{2+} katyonu ve EDTA’nın ise aktivite üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır (Fasimoye vd., 2014).

Aspergillus japonicus Saito URM 5633 tarafından üretilen fitaz aktivitesi üzerine 10 mM ve 100 mM konsantrasyonlarında Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Ag^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} ve Ca^{2+} katyonlarının ve EDTA’nın etkisi çalışılmıştır. Bunlar içerisinde fitaz aktivitesini önemli derecede artıran Fe^{2+} katyonu (10 mM ve 100 mM) olmuştur. Diğer katyonların ve EDTA’nın ise aktivite üzerinde önemli bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir (Moreira vd., 2014).

2.5. Fitazların Substrat Spesifitesi

Aspergillus niger SK-57 fungusundan saflaştırılmış fitazın pH 5.5 ve 37 °C’de fitik asit substratı ile K_m değeri 18.7 μM ve spesifik aktivitesi 158 U/mg olarak hesaplanmıştır. Fitik aside oldukça spesifik olan bu enzimin, diğer fosforillenmiş bileşikleri hidrolizleme hızının, fitatın ancak % 2’si kadar olabildiği saptanmıştır (Nagashima vd., 1999).

Pseudomonas syringae MOK1 mikroorganizmasından saflaştırılmış fitazın optimum koşullar altında fitik asit substratı ile K_m değeri 0.38 mM ve spesifik aktivitesi 769 U/mg olarak hesaplanmıştır. Fitik aside oldukça spesifik olan bu enzimin; p-nitrofenil fosfat, glukoz-1-fosfat, fruktoz-6-fosfat, gliserofosfat, sodyum pirofosfat, α -naftil fosfat ve ATP gibi çeşitli fosfat içeren konjugatları hidrolizleme hızının oldukça düşük (% 5) olduğu bildirilmiştir (Cho vd., 2003).

Wang vd., (2004) *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* XY-5 fitazının fitik asite spesifik aktivitesinin 318 U mg^{-1} olduğu saptanmışlardır. p-Nitrofenil fosfat, tripolifosfat, disodyum pirofosfat, β -gliserofosfat, DL- α -gliserofosfat ve D-glukoz-6-fosfata karşı ise, fitik aside oranla daha düşük spesifik aktiviteye ($23\text{-}43 \text{ U mg}^{-1}$) sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Fitik aside karşı oldukça spesifik olan *Aspergillus niger* 307 fitazının, ADP, ATP, p-NPP, D-glukoz-6-fosfat, D-fruktoz-6-fosfat gibi çeşitli fosfat içeren konjugatları hidrolizleme hızının oldukça düşük olduğu saptanmıştır. Fitazın fitat için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla $0.929 \text{ }\mu\text{M}$ ve 52.36 nkat/cm^3 olarak hesaplanmıştır (Sariyska vd., 2005).

Aspergillus ficuum NTG-23 fitazı ATP, D-glukoz-6-fosfat, D-fruktoz-6-fosfat substratlarını sodyum fitata göre iki katı daha fazla hızda hidrolizlediği bildirilmiştir. Enzim, optimum koşullar altında fitik asit substratı ile K_m değeri 0.295 mM ve spesifik aktivitesi 55.9 nmol olarak hesaplanmıştır (Zhang vd., 2010).

Fitik aside karşı oldukça spesifik olan *Shigella sp.* CD2 fitazının ADP, ATP, p-NPP, D-glukoz-6-fosfat, D-fruktoz-6-fosfat gibi çeşitli fosfat içeren konjugatları hidrolizleme hızının oldukça düşük olduğu saptanmıştır. Optimum koşullar altında fitik asit substratı ile K_m değeri 0.25 mM ve spesifik aktivitesi 780 U/mg olarak hesaplanmıştır (Roy vd., 2012).

Aspergillus niger UA-D fungusundan saflaştırılmış fitazın çok geniş bir substrat aralığında aktivite gösterdiği saptandı. Saf enzimin pH 3.0 ve $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de fitik asit substratı ile K_m değeri $180 \text{ }\mu\text{M}$ ve spesifik aktivitesi 54.35 U/mL olarak hesaplanmıştır (Ekren, 2013).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Kimyasallar

Coomassie Brilliant Blue G-250, 4-nitrofenil-fosfat, 5-brom-4-klor-3-indol fosfat, $AlCl_3$, amonyum vanadat, borik asit, cron step liquar, DEAE-sefaroze CL-6B, Fenil sefaroze CL-4B, Sefakril 200HR, D-fruktoz-1,6-bisfosfat, D-fruktoz-6-fosfat, D-glukoz-1-fosfat, D-glukoz-6-fosfat, etilasetat, glukoz, glutatyon, $MnSO_4 \cdot H_2O$, N,N'-metilen bis-akrilamid, NaF, sığır serum albumini, sodyum fitat, standart protein karışımı [Domuz miyosini, 200 kDa), β -Galaktozidaz (*E.coli*, 116 kDa), Fosforilaz B (tavşan kası, 97 kDa), Albumin (sığır albumini, 66 kDa), Albumin (yumurta 45 kDa), Karbonik anhidraz (sığır eritrosit, 29 kDa)], sukroz, Tween 80, α -gliserofosfat, α -naftil fosfat, β -gliserofosfat ve β -naftil fosfat Sigma firmasından; Agar-agar, akrilamid, amonyum molibdat, amonyum persülfat, amonyum sülfat, aseton, $BaCl_2$, brom fenol mavisi, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $CoCl_2$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, etanol, etilen diamin tetra asetik asit ($EDTA-C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, gliserol, glisin, HCl, hekzan, Hg_2Cl_2 , izopropanol, KCl, maleik asit, metanol, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnCl_2 \cdot 2H_2O$, NaOH, n-bütanol, NH_4Cl , $NiCl_2$, sitrik asit, sodyum dodesil sülfat (SDS), sülfürik asit (H_2SO_4), TEMED, trikloroasetik asit, Tris baz, Triton X-100, üre, yeast ekstrakt (maya özütü), $ZnCl_2$, β -merkaptotanol, Merck firmasından; 1,4- dithiothreitol (DTT), 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), fenil metil sülfonil florür (PMSF), iodoasetamid (İAA), metil-p-toluen-sulfonat (CMC), N-bromo suksinamit (NBS), o-fosforik asit, sikloheksil-N-(2-morfolinoetil)-karboimid ve tripton Fluka firmasından; 1,4-dioksan, dimetil sülfoksit (DMSO), etilen glikol, sodyum asetat, Panreac firmasından; asetonitril SDS firmasından; askorbik asit Calbiochem firmasından; LiCl Avokado firmasından; KH_2PO_4 , NaCl ve sodyum sitrat Carlo Erba firmasından; asetik asit, benzen, dietileter, propanol ve tolüen Riedel-de Haën firmasından; malt ekstrakt agar Lab M firmasından; sorbitol Acros firmasından; AFBA Oxoid firmasından sağlandı.

3.1.2. Mikroorganizma

Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı Mikrobiyoloji laboratuvarı fungus stoklarında bulunan,

fitaz ürettiği daha önceden kalitatif olarak saptanmış (Ekren, 2013) olan *Aspergillus* sp. suşu, enzim üretimi için seçildi.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Fungusdan Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için taze kültürler kullanıldı. Agar yüzeyindeki misellerden steril bistüri yardımı ile yaklaşık 1 cm²'lik alan kesildi. Miseller steril Eppendorf içine alınarak, -20 °C'de bir saat bekletildi. Daha sonra miseller 55 °C'lik su banyosunda 15-20 dk bekletilerek çözündürüldü. Dondurma-çözdürme işlemi en az 2 kez tekrarlandı. En son -20 °C'de dondurulan miseller steril pestil yardımı ile ezildi. Misellerin üzerine 600 µL STE, 25 µL proteinaz K (25 mg/ml) ve 75 µL SDS (%10) eklenerek 2 saat 55 °C'lik su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkubasyon sonra tüplere 1:1 fenol-kloroform izoamil alkol eklenerek 5 dk alt üst edildi ve daha sonra 13.200 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Örneklerin üst fazı steril Eppendorf içine alınarak üzerlerine 1 mL % 96'lık etanol eklendi ve 2-3 kez alt üst edildi. Daha sonra 20 dk, -20 °C'de bekletilen örnekler 13.200 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra 37 °C'lik etüvde bekletilip etanol uzaklaştırıldı. Son olarak Eppendorflara 100 µL steril distile su eklenerek bir gece 37 °C'lik etüvde bekletildi (Tran-Dinh vd., 1999).

3.2.2. İzole Edilen Fungusların Moleküler Tanılanması

Tanılama işlemi için internal transcribed spacer (ITS), PCR ile çoğaltıldı. Kullanılan PCR karışımı Çizelge 3.1.'de verildi. Primer olarak ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-3') tercih edilmiştir. PCR koşulları; 94 °C'de 3 dk ön denaturasyon sonrasında, 35 döngülük 94 °C'de 1 dk denaturasyon, 60 °C'de 1 dk primer bağlanma, 72 °C'de 1 dk uzamayı içermektedir. Son adım 72 °C'de 5 dakikalık final uzamayı içermektedir (Tran-Dinh vd., 1999).

Çizelge 3.1. ITS bölgesini çoğaltmak için kullanılan PCR karışımı

Reaktifler (konsantrasyon)	Hacim
PCR buffer 10X	5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 µL
dNTP (10 mM)	1 µL
Primer R (10 p/Mol)	2 µL
Primer F (10 p/Mol)	2 µL
Taq Polimeraz (5U/µL)	0.4 µL
DNA (100 ng/µL)	1 µL
Distile su	34.6 µL
Toplam hacim	50 µL

PCR ürünlerinden 3 µL, yükleme tamponundan da 3 µL alınarak % 5 safe view içeren % 1,5'luk agaroz jele yüklendi. DNA büyüklük standardı; 1 kb'lık (Fermentas Gene Ruler TM) kullanıldı. Jel elektroforezi 75 V, 45 dk yapıldı. PCR ürünleri sekans için Macrogen (Güney Kore) firmasına gönderildi. Sekans her örnek için revers ve forward olarak yapıldı. Öncelikle Clustal W programı kullanılarak hizalandı, ardından BLAST programı kullanılarak tanısı yapıldı.

3.3. Aflatoksin Testi

Aspergillus sp. suşun aflatoksin üretilip üretilmediği Glukoz Yeast Ekstrakt, Hg Czapek Dox Agar, ve AFPA besiyerleri kullanılarak saptandı.

Glukoz Yeast Ekstrakt; 4 g glukoz, 1 g yeast ve 4 g agar 200 mL ultra saf su içerisinde çözülerek hazırlandı (Yabe vd., 1987).

Hg Czapek Dox Agar; 9.08 g Czapek-Dox agar, 0.0272 g HgCl₂, 2 g NH₄H₂PO₄ ve 0.1 mL Corn step likor 200 mL ultra saf su içerisinde çözülerek hazırlandı (Hara vd.,1974).

AFPA (*Aspergillus flavus-parasiticus* Agar); 9.1 g AFPA 200 mL ultra saf su içerisinde çözülerek hazırlandı (Pitt vd., 1983).

Hazırlanan bu ortamlara malt ekstrakt agarda spor oluşumu sağlanan stoklardan tek nokta ekimi yapıldı ve 30 °C'de 5 gün inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kültürler UV ışığı altında incelenerek ışımaya yapan türlerin aflatoksin ürettiği kabul edildi.

3.4. Fitaz Aktivitesinin Kantitatif Tayini

Fitaz aktivitesinin kantitatif tayini için sodyum fitatın substrat olarak kullanıldığı kolorimetrik yöntem kullanıldı (Kim ve Lei 2005). Aktivite tayini Çizelge 3.2’de belirtilen standart deney koşullarında gerçekleştirildi. Enzimin substratla inkübasyon sonunda, reaksiyon 0.4 mL % 15 (g/mL) trikloroasetik asit ile enzimin denatürasyonu sonucu durduruldu. Karışım 2000 x g’de 10 dakika santrifüjlendi. Oluşan inorganik fosfat (Pi) tayini ise, süpernatantdan 0.2 mL örnek alınarak 1.8 mL ultrasaf su ile karıştırıldı. Karışıma 2 mL renk reaktifi ilave edilerek (3:1:1, 1M sülfirik asit: % 2.5 amonyum molibdat: % 10 askorbik asit) 50 °C’de 15 dakika inkübe edildi ve örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra 820 nm’de köre karşı absorbansları spektrofotometrede (Shimadzu UV-1700, Japan) ölçüldü.

Çizelge 3.2. Fitaz aktivite tayini için standart deney bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 2.5, 60 °C)	350µL	350 µL
Enzim çözeltisi	20 µL	20 µL
60 °C’de 5 dk ön inkübasyon		
% 15 TCA	400 µL	-
100 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	-	30 µL
60 °C’de 20 dk inkübasyon		
% 15 TCA	-	400 µL
100 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	30 µL	-
2000 x g’de 10 dk santrifüj		
0.2 mL süpernatant + 1.8 mL ultrasaf su + 2 mL renk çözeltisi		
50 °C’de 15 dk inkübasyon		
820 nm’de spektrofotometrede absorbans ölçümü		

Enzim ünitesi: Belirli koşullarda dakikada sodyum fitatdan 1 µmol inorganik fosfatın serbestlenmesini sağlayan enzim miktarı olarak ifade edildi.

Fitaz aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Hacimsel Aktivite} = \frac{\text{Pi } (\mu\text{M}) \times \text{V}_T \text{ (mL)}}{\text{t (dk)} \times \text{V}_E \text{ (mL)}} = \text{U/mL}$$

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

Pi : İnorganik fosfat konsantrasyonu

V_T : Total reaksiyon hacmi

T : İnkübasyon süresi

V_E : Reaksiyon karışımındaki enzim miktarı

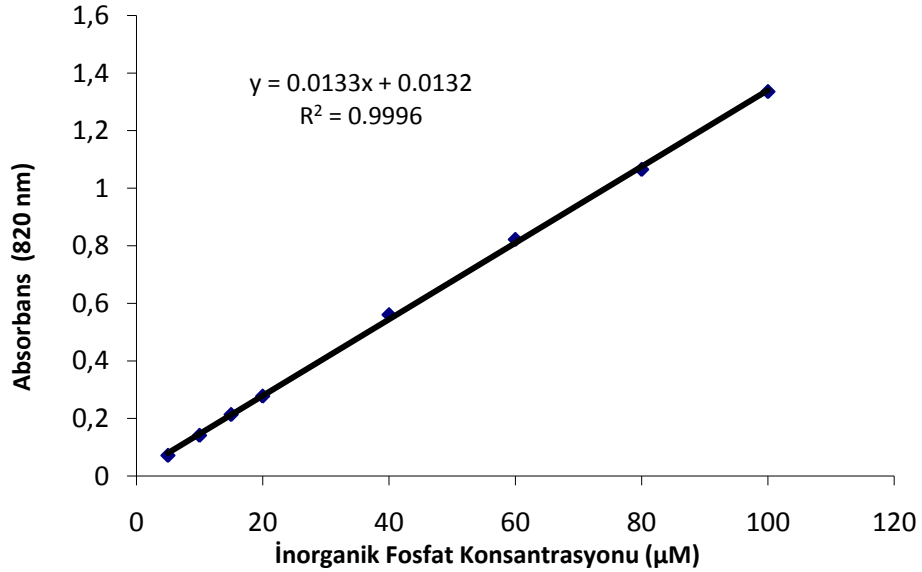
3.5. İnorganik Fosfat Standart Grafiği ve Hazırlanışı

Fitazın sodyum fitatı hidrolizlemesi sonucu açığa çıkan inorganik fosfatı (Pi) belirlemek amacıyla askorbik asit metodu kullanıldı (Kim ve Lei, 2005). İnorganik fosforu belirlemek için kullanılan renk reaktifi, 3:1:1 oranında sırasıyla 1 M H₂SO₄, % 2.5 amonyum molibdat, % 10 askorbik asit karıştırılarak hazırlandı. Reaktif her deneme için taze olarak hazırlandı. Bu metoda göre, inorganik fosfor amonyum molibdat ile reaksiyona girerek, 12-molibdofosforik asidi oluşturur. Oluşan 12-molibdofosforik asit H₂SO₄'in sağladığı asidik koşullarda, askorbik asit ile reaksiyona girerek, 820 nm'de maksimum absorbands veren molibden mavisi meydana getirir.

İnorganik fosfat standart grafiği oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100 µM) standart KH₂PO₄ çözeltileri hazırlandı. İnorganik fosfor miktarı, askorbik asit metodu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü (Çizelge 3.3). Konsantrasyona karşı absorbands grafiği linear regresyon analiziyle çizilerek, konsantrasyonu bilinmeyen örneğin inorganik fosfat konsantrasyonu (Pi), standart grafiğinden elde edilen doğru denkleminin formülünden hesaplandı (Şekil 3.1). Doğrunun denklemi $y = 0.0133x + 0.0132$, regresyon katsayısı $R^2 = 0.9996$ 'dır.

Çizelge 3.3. İnorganik fosfat miktarının ölçümü

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Kör
Standart çözeltisi	2 mL	-
Ultra saf su	-	2 mL
Renk Çözeltisi	2 mL	2 mL
Karıştırılır		
50 °C’de 15 dakika inkübe edilir		
Oda sıcaklığına getirilir		
820 nm’de spektrofotometrede ölçüm		



Şekil 3.1. İnorganik fosfat standart grafiği

3.6. Protein Tayini

Çalışma boyunca protein tayinleri Bradford yöntemi kullanılarak yapıldı (Bradford, M. M., 1976). Bradford yöntemi Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturması esasına dayanır. Coomassie Brilliant Blue G-250 negatif yüklüdür, bu durumda kırmızı renklidir ve 470 nm’de maksimum absorbans verir. Boya proteindeki pozitif yüklü gruplara bağlandığında mavi renk alır ve 590 nm’de maksimum absorbans verir. Bu yöntemde renk oluşumu 2 dakika sonra gerçekleşir ve 1 saat stabil kalır. Bradford yöntemine göre protein tayini yapılırken kullanılan çözeltiler ve standartlar aşağıda verildiği gibi hazırlandı.

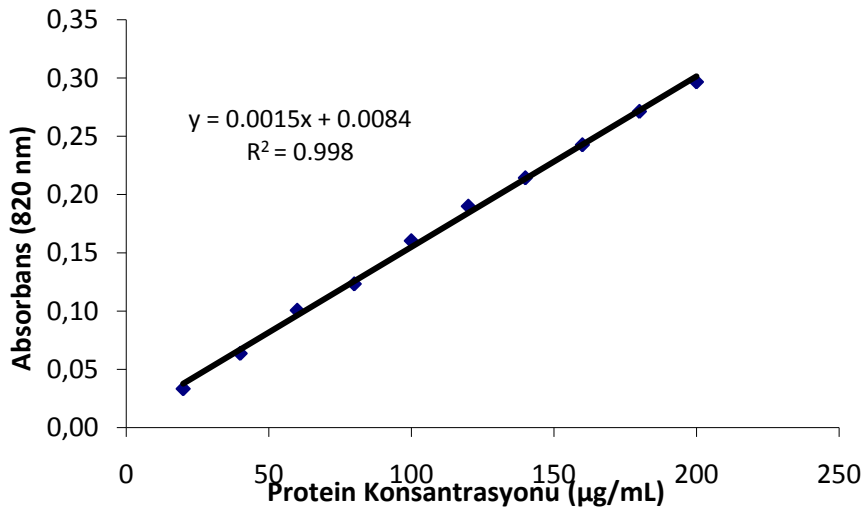
3.6.1. Coomassie Brilliant Blue G-250 Çözeltisinin Hazırlanışı

Coomassie Brilliant Blue G-250'nin 100 mg'ı, 50 mL % 95'lik etil alkolde çözüldü. Çözelti 100 mL % 85'lik fosforik asitle karıştırıldı ve hacmi ultra saf su ile 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan boya çözeltisi çözünmeyen boya kalıntılarını uzaklaştırmak için filtre kâğıdından süzüldü.

3.6.2. Protein Standart Grafiğinin Hazırlanışı

Protein standardı olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. BSA'nın 1 mg/mL'lik standart çözeltisi kullanıldı. Standart çözeltiler bu stoktan 20-200 µg/mL olacak şekilde, % 0.9 NaCl çözeltisi ile seyreltilerek hazırlandı.

Hazırlanan standart çözeltilerden tüplere 100'er µL aktarıldı, köre ise 100 µL ultra saf su eklendi. Bütün tüplere 5'er mL hazırlanan Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden eklendi ve karıştırıldı. İki dakika sonra standartlar 595 nm dalga boyunda köre karşı okundu ve protein standart grafiği konsantrasyona karşı absorbans grafiği, linear regresyon analiziyle çizildi (Şekil 3.2). Bilinmeyen örneğin protein konsantrasyonu, bu standart grafiğin çiziminden elde edilen denklemin formülünden hesaplandı. Grafiğin formülü $y = 0.0015x + 0.0084$, regresyon katsayısı $R^2 = 0.998$ 'dir.



Şekil 3.2. Protein standart grafiği

3.7. Sporulasyon Ortamının Hazırlanışı

Aspergillus tubingensis HBF 202'yi üretmek için önce sporulasyon ortamında spor oluşumu sağlandı. Sporulasyon ortamı olarak malt ekstrakt agar kullanıldı. Malt ekstrakt agar 250 mL'lik erlene 50 mL % 2.4 olacak şekilde eklenerek ısı yardımı ile agarın iyice çözünmesi sağlandı, Hazırlanan malt ekstrat agar 121 °C'de, 10 dakika otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan sonra yüzey alanını arttırmak amacıyla erlen, 45° eğimle katılaşmaya bırakıldı. *A. tubingensis* HBF 202'nin stok kültüründen yatık malt agara üç nokta ekimi yapıldı. Kültür 30 °C'de etüvde 5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda sporulasyon ortamına % 0.1'lik steril Tween 80 ve cam bilye ilave edilerek sporların çözeltiye geçmesi için 5 dakika yavaşça karıştırıldı. Sıvı ortama geçen süspansiyonun 1 mL'si, 9 mL steril fizyolojik tuzlu suya (% 0.9 NaCl) ilave edildi. Uygun inokulum miktarını belirleyebilmek için ilk seyreltme (10^{-1}) kullanılarak 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} olacak şekilde seyreltme işlemi yapıldı. Her seyreltmede Thoma lamı ile mililitredeki spor sayımı yapıldı. Spor sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{Mililitredeki spor sayısı} = A \times SF \times 10^4$$

A = 0.1 mm³ hacimde sayılan spor

SF = Seyreltme faktörü

10⁴ = Mililitreye çevirme çarpanı

Her seyreltmedeki spor sayısı yukarıdaki formüle göre hesaplanarak inokülasyon için uygun spor sayısını içeren seyreltme belirlendi.

3.8. *Aspergillus tubingensis* HBF 202'nin Fitaz Üretim Ortamı

Aspergillus tubingensis HBF 202 fitaz üretim için yapılan tüm denemelerde Çizelge 3.4 de verilen ortam içeriği kullanıldı. Başlangıç pH'sı 5.5'a ayarlandı.

Çizelge 3.4. *Aspergillus tubingensis* HBF 202 fitaz üretim ortamının içeriği

Kimyasal Madde	Miktarı (g/L)
Sukroz	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
Trypton	3
Yeast ekstrakt	2
KCl	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	1
MnSO ₄ .H ₂ O	0.007
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.02
Triton X-100	1

3.9. *Aspergillus tubingensis* HBF 202'nin Fitaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi

3.9.1. Fitaz Üretimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi

İnokulum miktarının enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek için, 100 mL fitaz üretim ortamı (Çizelge 3.4) içeren 500 mL'lik erlenlere, uygun seyreltmelerden 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ ve 10⁹ spor/mL olacak şekilde inokule edildi. Kültür ortamları 30 °C'de, 110 rpm'de, 7-12 gün boyunca çalkalamalı inkübatörde (New Brunswick Scientific Excella E24, New Jersey, USA) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon boyunca kültür ortamından aseptik koşullar altında her gün örnek alınarak enzim aktivite ölçümleri yapıldı. İnkübasyon sonunda kültür ortamı buhner hunisinde önceden darası alınan filtre kâğıdı (Munktell, Germany) kullanılarak vakum altında süzüldü. Üstte kalan pelletler cam petriye alınarak 80 °C'de, 24 saat bekletildi, elde edilen kuru ağırlıkların tartımı yapıldı.

3.9.2. Fitaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

A. tubingensis HBF 202'in en iyi fitaz üretimini gerçekleştirdiği sıcaklığı belirlemek için, 100 mL fitaz üretim ortamı 500 mL'lik erlenlere pH 5.5 olacak şekilde eklendi. Hazırlanan bu besi ortamlarına *A. tubingensis* HBF 202 spor solusyonundan 10⁸ spor/mL olacak şekilde inokule edildi. Kültür ortamları farklı sıcaklıklarda (20, 30, 40 ve 50 °C), 110 rpm'de, 10-20 gün inkübasyona bırakıldı. Kültür ortamlarından aseptik koşullar altında her gün örnek alınarak, enzim

aktivite ölçümleri yapıldı. İnkübasyon sonunda ise kuru ağırlıkları ve ortam pH'ı tayin edildi.

3.9.3. Fitaz Üretimi Üzerine Başlangıç pH'ının Etkisi

A. tubingensis HBF 202'nin en iyi fitaz ürettiği başlangıç pH'ını belirlemek için, 500 mL'lik erlenlere 30 °C'de farklı pH'larda (pH 2.0-9.0) 100 mL fitaz üretim ortamı hazırlandı. Kültür ortamlarının pH'larının hazırlanışında: pH 2.0-3.0 için 0.2 M glisin-HCl tamponu, pH 3.5-5.5 için 0.2 M sitrat tamponu, pH 6.0-7.5 için 0.2 M Tris- maleat tamponu ve pH 8.0-9.0 için Tris-HCl tamponu kullanıldı. Hazırlanan bu kültür ortamlarına *A. tubingensis* HBF 202 spor solusyonundan 10^8 spor/mL olacak şekilde inoküle edildi. Kültür ortamları 110 rpm'de, 10-15 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresince kültür ortamlarından aseptik koşullar altında her gün örnek alınarak, enzim aktivite ölçümleri yapıldı. İnkübasyon sonunda ise kuru ağırlıkları ve ortam pH'ı tayin edildi.

3.10. *Aspergillus tubingensis* HBF 202'nin Büyüme Kinetiği

Mikrobiyal büyüme kinetikleri: kesikli (batch), kesikli beslemeli (fed-batch) veya sürekli (continous) kültür yöntemleriyle yürütülmektedir. Filamentöz yapılı funguslar da büyüme kinetiği ise en iyi kesikli (batch) kültür ortamlarında saptanır (Çolakoğlu, 2001).

Büyüme kinetiği, kültür koşullarının optimize edilmesinden sonra belirlenen 30 °C ve pH 5.0'da çalışıldı. *A. tubingensis* HBF 202' nin üretimi için, 100 mL fitaz üretim ortamı, 500 mL'lik erlene (20 adet) eklendi. Bu besi ortamlarına *A. tubingensis* HBF 202 spor solusyonundan 10^8 spor/mL olacak şekilde inoküle edildi. Kültür ortamları çalkalamalı inkübatörde 30 °C de, 110 rpm, 10 gün inkübasyona bırakıldı. *A. tubingensis* HBF 202'nin büyüme kinetiğini saptamak için her gün erlenlerden iki tanesi, darası ölçülmüş filtre kâğıdı (398 nolu Filtrak, Germany) kullanılarak, Buhner hunisinde vakum altında süzüldü. Darası ölçülmüş filtre kâğıdında kalan miseller distile su ile yıkanarak, 80 °C'daki etüvde 24 saat kurutuldu. Hassas terazide (Scaltec SBA 31, Germany) tartıldı ve filtre kâğıdının darası çıkarılarak biyokütle (g/100 mL) hesaplandı. Ayrıca kültür ortamı süzüntüsünün günlük pH (Senso Direct pH 200, Germany), protein tayini ve enzim

aktivite ölçümleri yapıldı. En iyi enzim aktivitesi gösteren süzöntü, enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere -20 °C da derin dondurucuda (Bosch, Germany) saklandı.

3.11. Fitazın Saflaştırılması

A. tubingensis HBF 202 tarafından enzim üretimi için optimum sıcaklık, pH ve inkübasyon zamanı belirlendikten sonra saflaştırma işlemlerine geçildi. Optimum koşullarda (pH 5.0 ve 30 °C) enzim üretimi yapılarak belirlenen optimum günde (8. gün) kültür ortamı süzöldü ve süzöntü enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Saflaştırmada ilk adım olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı, daha sonra ise sırasıyla fenil sepharoz CL-4B (hidrofobik etkileşim), DEAE sepharoz CL-6B (iyon değişim) ve Sefakril 200HR (jel filtrasyon) kolon kromatografileri uygulandı. Aksi belirtilmedikçe tüm saflaştırma adımları 4 °C’de yapıldı.

Saflaştırma boyunca elde edilen fraksiyonlarda aktivite ve protein tayinleri belirlenen standart koşullarda yapıldı. Ham ekstrakt olan ekstraselüler sıvının saflaştırma katsayısı 1 kabul edilerek ve diğer fraksiyonların spesifik aktiviteleri ham ekstrakt spesifik aktivitesine oranlanarak saflaştırma katsayıları hesaplandı. Fraksiyonların % verimlerini belirlemek için ham ekstrat verimi 100 olarak kabul edilerek ve fraksiyonların total aktivitesi ham ekstrakt total aktivitesine oranlanarak % verimleri hesaplandı. Elde edilen veriler saflaştırma Çizelgesi oluşturularak özetlendi.

3.11.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Saflaştırmanın ilk adımlarında daha çok deriştirmeye yönelik teknikler kullanılır. Enzim saflaştırmada en çok kullanılan tekniklerden biri, yüksek tuz konsantrasyonlarında çöktürmedir. Proteinlerin su içerisindeki çözünürlükleri çok azdır. Ortama bir miktar nötral tuz (NaCl ve (NH₄)₂SO₄ gibi) ilave edildiğinde (düşük iyonik kuvvet) proteinlerin yüzeyinde veya iç kısımlarında bulunan hidrofilik grupların su ile etkileşim derecesi artar, bu durumda proteinlerin çözünürlükleri de artar. Bu olaya **salting in** denir. Protein çözeltisine çok miktarda nötral tuz ilave edildiğinde, proteinlerin genellikle iç kısımlarında yer alan hidrofobik gruplar etrafındaki su molekülleri tuz iyonları tarafından uzaklaştırılır, bu durumda hidrofobik grupların birbirleri ile olan etkileşimleri artar ve proteinler çökerler. Bu olaya ise **salting out** denir. Protein çözeltisinde hidrofobik alanları

büyük ve daha fazla olan proteinler, hidrofobik alanları küçük ve daha az olanlarınkine göre daha çabuk birbirleri ile etkileşerek çökerler. Böylece proteinlerin fraksiyonlanması sağlanmış olur (Metin vd., 2007).

Optimum koşullarda üretimi yapılan kültür ortamı (ham ekstrakt) amonyum sülfat çöktürme denemeleri için kullanıldı. Ham ekstrakta sırasıyla % 0-20, % 20-40, % 40-60, % 60-80, % 80-100 aralıklarında 4 °C’de doymuş amonyum sülfat çözeltisi eklendi. Ham ekstrakta ilk olarak % 20 amonyum sülfat eklenerek 2 saat manyetik karıştırıcıda yavaş yavaş karıştırıldı. Çözelti 20.000 x g de 30 dakika santrifüjlendi. Süpernatant ve pelletler birbirinden ayrıldı. Süpernatanta sırasıyla diğer konsantrasyonlarda doymuş amonyum sülfat eklenerek işleme devam edildi. Her bir fraksiyondaki pellet, 20 mM asetat (4°C, pH 4.5) tamponunda çözülerek aşağıda anlatıldığı gibi diyaliz yapıldı. Diyaliz sonrası aktivite ve protein tayini yapıldı. Bütün fraksiyonlar için spesifik aktivite, saflaştırma katsayısı ve % verim hesaplandı.

3.11.2. Diyaliz

Diyaliz yöntemi, iyonik olan ve olmayan tüm küçük molekülleri uzaklaştırmak için basit, ucuz ve etkin bir yöntemdir. Genellikle çözeltilerdeki tuzları ve diğer küçük molekülleri ortamdan uzaklaştırmakta kullanılır. Ayrıca biyolojik moleküllere zayıf bir şekilde bağlı olan küçük iyonları ve molekülleri de bu yöntemle ortamdan uzaklaştırmak mümkündür (Metin, 2007).

Sırasıyla % 0-20, % 20-40, % 40-60, % 60-80 ve % 80-100 amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen pelletler, uygun hacimde 20 mM asetat (pH 4.50) tamponunda geri çözüldü. Daha sonra yarı geçirgen bir membrandan oluşan diyaliz torbası (Selüloz membran, Sigma-Aldrich, MWCO-Molecular Weight Cut Off 12.000 Da, 25 mm x 16mm) uygun uzunluklarda kesildi ve tek tip gözenek büyüklüğü sağlamak ve ağır metal kontaminantları gidermek için ön işleminden geçirildi (Çizelge 3.5). Diyaliz torbalarına örnekler aktarıldı ve uçları klipsler yardımı ile bağlandı. Daha sonra pelletlerin çözündüğü aynı tampona karşı 36 saat süreyle tampon 3 defa (toplam 1500 mL) değiştirilerek diyaliz edildi. Diyaliz işlemi manyetik karıştırıcı üzerinde 4°C’de gerçekleştirildi.

Çizelge 3.5. Diyaliz torbasının ön işlemden geçirilmesi

1	% 0.3' lük sodyum sülfat çözeltisinde 80 °C' de 1 dakika bekletilir.
2	Sıcak su (60 °C) ile 2 dakika yıkanır.
3	% 0.2' lik sülfürik asitte 1 dakika bekletilir.
4	Sıcak su (60 °C) ile 2 dakika yıkanır.

3.11.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

Hidrofobik etkileşim kromatografisi protein moleküllerinin hidrofobik grupları ile durgun faz arasındaki hidrofobik etkileşime dayanır. Durgun faz hidrofilik bir polimere (dekstran veya agaroz) bağlı küçük non-polar grupları (butil, oktil veya fenil) içermektedir. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde ilgili proteinin bulunduğu fraksiyon yüksek tuz derişimi içeren tampon içerisinde (genellikle amonyum sülfat) kolona yüklenir. Bağlı proteinlerin kolondan uzaklaştırılması ise tampondaki tuz derişimi azaltılarak yapılır. Yani ters tuz gradienti oluşturularak yıkama yapılır. Bu yöntem özellikle amonyum sülfat gibi tuzlarla yapılan çöktürmeden sonra proteinlerin daha ileri saflaştırılması için idealdir (Metin vd., 2007).

Hidrofobik etkileşim kromatografisi için fenil sefaroze CL-4B (20 mL yatak hacimli, 1 x 20 cm, Biorad, USA) kolon dolgu maddesi kullanıldı. Kolon önce 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 20 mM asetat (pH 4.50, 4°C) tamponu ile yıkanarak kararlı hale (hidrofobik alanların açığa çıkması sağlandı) getirildi. % 80-100'lük amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen enzim kaynağı diyaliz işlemi uygulanmadan, fenil sefaroze CL-4B kolonuna yüklendi. Daha sonra, kolon peristaltik pompa ile (ATTA AC-2110, Japonya) sağlanan 66 mL/saat akış hızında aynı tampon ile yıkanarak kolona bağlanmayan proteinlerin kolondan uzaklaşması sağlandı. Kolondan çıkan örnekler fraksiyon kollektörü ile (Bio-Rad Model 2110, USA) 5'er mL'lik hacimlerde toplandı. Kolondan proteinlerin çıkışı spektrofotometrede 280 nm'deki absorbans ölçülerek izlendi. Kolon yıkama işlemine 280 nm'de absorbans düşene kadar devam edildi. Daha sonra kolona 1 M' dan 0 M'a kadar azalan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ters tuz gradienti uygulandı. Gradientin bitiminin hemen ardından, kolona bağlı muhtemel proteinlerin kolondan çıkması için, tuz içermeyen aynı tamponla yıkamaya devam edildi. Kolondan çıkan her fraksiyonda enzim aktivitesi ölçüldü. Aktivitesi yüksek olan fraksiyonlar

birleştirildi. Birleştirilen fraksiyonlardan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tuzunu uzaklaştırmak için 20 mM asetat (pH 4.50, 4°C) taponuna karşı 12 saat süreyle diyaliz edildi.

3.11.4. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi proteinlerin elektrik yüküne bağlı olarak ayrılmasını sağlayan ve protein saflaştırma işlemlerinde çok sık kullanılan önemli bir tekniktir. Bu metotta pozitif veya negatif yüke sahip maddelerin elde edilmesi sağlanır. Sabit faz yüzeyinde ya pozitif ya da negatif yüklü gruplar bulunur. Eğer pozitif yüklü olanların elde edilmesi isteniyorsa, numune katyon değiştiren kolona uygulanmalıdır. Bu halde nötr ve negatif yüklü olanlar mobil fazda kalırlar ve pozitif yüklü olanlar sabit faza bağlanırlar. Aksine negatif yüklü olanların elde edilmesi gerekiyorsa, bu kez bir anyon değiştiricisi kolona ilave edilir. Böylece nötr ve pozitif olanlar, hareketli fazla kolondan geçip atılırlar. Sabit faza bağlanmış olan türler, hareketli fazdaki iyon yoğunluğu artırılarak veya pH değiştirilerek kolondan ayrılırlar.

İyon değişim kromatografisi için, negatif yüklü proteinlerin saflaştırılmasında kolon dolgu maddesi olarak pozitif yüke sahip DEAE sefaroze CL-6B (35 mL yatak hacimli, 2.5x10 cm, Biorad, USA) kullanıldı. Diyaliz sonrası elde edilen diyalizat, 20 mM asetat (pH 4.50, 4°C) tamponu ile dengeye getirilen DEAE sefaroze CL-6B kolonuna yüklendi. Daha sonra, kolon peristaltik pompa ile (ATTA AC-2110, Japan) sağlanan 86 mL/saat akış hızında aynı tampon ile yıkanarak bağlanmayan proteinlerin kolondan çıkması sağlandı. Bağlanmayan proteinler kolondan uzaklaştırıldıktan sonra kolona 0 M' dan 1 M'a kadar artan NaCl linear tuz gradienti uygulanarak kolona bağlı proteinlerin çıkması sağlandı. Kolondan çıkan örnekler fraksiyon kollektörü ile (Bio-Rad Model 2110, USA) 5'er mL'lik hacimlerde toplandı. Kolondan proteinlerin çıkışı spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601, Japan) 280 nm'deki absorbans ölçülerek izlendi. Kolondan çıkan her fraksiyonda enzim aktivitesi ölçüldü. Aktivitesi yüksek olan fraksiyonlar birleştirildi ve bu fraksiyonlar bir sonraki saflaştırma adımında kullanılarak saflaştırma işlemine devam edildi. DEAE sefaroze CL-6B kolonundan çıkan aktif fraksiyonlar 10.000 MWCO ultrafiltrasyon membranı (Vivacell 250 ultrafiltrasyon, Sartoris, Almanya) ile konsantre edildi. Konsantre edilen örnekte aktivite ve protein tayini yapıldı ve bir sonraki saflaştırma adımı olan jel filtrasyon kolonuna uygulandı.

3.11.5. Jel Fitrasyon Kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisi farklı molekül büyüklüğündeki proteinlerin ayrımını sağlayan bir kromatografi şeklidir. Bu amaçla, 70 mL yatak hacmine sahip Sefakril 200HR içeren kolon (1x100 cm) kullanıldı. Kolon önce 20 mM asetat (pH 4.50, 4°C) tamponu ile dengeye getirildi. Bir önceki adımda konsantre edilen örnek peristaltik pompa yardımıyla kolona yüklendi. Kolon 15 mL/saat akış hızında 20 mM asetat (pH 4.50, 4°C) tamponu ile yıkanarak, proteinlerin çıkışı spektrofotometrede 280 nm'deki absorbans ölçülerek izlendi. Kolonda protein çıkışı olmayıncaya kadar kolonu yıkama işlemine devam edildi. Kolondan çıkan örnekler fraksiyon kollektörü ile (Bio-Rad Model 2110, USA) 5'er mL'lik hacimlerde toplandı. Kolondan çıkan her fraksiyonda enzim aktivitesi ölçüldü. Aktivitesi yüksek olan fraksiyonlar birleştirildi. Birleştirilen bu fraksiyonlar daha sonra karakterizasyon çalışmaları için kullanıldı.

3.12. Elektroforez ve Zimografi

3.12.1. Fitazının Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Saflaştırma boyunca elde edilen fraksiyonların saflığını ve enzimin moleküler ağırlığı Laemmli yöntemine (1970) göre PAGE (poliakrilamid jel elektroforezi) ve SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) ile tayin edildi. Standart olarak domuz miyozini (200.000 Da), *E. coli*'den β -galaktozidaz (116.000 Da), tavşan kasından fosforilaz B (97.400 Da), sığır albumini (66.000 Da), yumurta albumini (45.000 Da) ve sığır eritrositinden karbonik anhidraz (29.000 Da) kullanıldı. Fitazın görüntülenmesi için PAGE ve SDS-PAGE kullanılarak zimogram yapıldı. SDS-PAGE, PAGE (Laemmli, 1970) ve zimogram (Chen vd.,2004; Sung vd., 2005) aşağıda anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

3.12.1.1. PAGE ve SDS-PAGE İçin Gerekli Çözeltiler

Yüzde 30'luk akrilamid/N,N'-metilenbisakrilamid stok çözeltisi: 30 g akrilamid ve 0.8 g N,N'-metilenbisakrilamid 100 mL ultra saf suda çözüldü. Hazırlanan çözelti koyu renkli şişede ve 4 °C' de saklandı.

Ayırma tamponu (separating tamponu): 1.5 M Tris-HCl hazırlandıktan sonra, konsantre HCl kullanılarak pH'ı 8.8'e ayarlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Yoğunlaştırma tamponu (Stacking tamponu): 0.5 M Tris-HCl hazırlandıktan sonra pH'ı 6.8'e ayarlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Amonyum persülfat: % 10'luk amonyum persülfat ultra saf su içerisinde taze olarak hazırlandı.

Sodyum dodesil sülfat (SDS): % 10'luk SDS ultra saf su içerisinde yavaş yavaş karıştırılarak hazırlandı.

Örnek tamponu: 0.6 M Tris-baz (pH 6.8) 5 mL, SDS 0.5 g, sukroz 5.0 g, β -merkaptoetanol'den 0.25 mL ve % 0.5'lik stok brom fenol mavisi çözeltisinden 5 mL alınarak karıştırıldı ve hacmi ultra saf su ile 50 mL'ye tamamlandı. PAGE için hazırlanan yükleme tamponunda SDS ve β -merkaptoetanol kullanılmadı. Örnek tamponu kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında saklandı. β -merkaptoetanol'ün etkisi zamanla kaybolduğundan gerektiği zaman hazırlanan tampona aynı oranda ilave edildi.

Elektroforez tamponu (Yürütme tamponu): 3 g Tris-baz ve 14.4 g glisin ve 1 g SDS karıştırılarak hacmi ultra saf su ile 1 L'ye tamamlanarak pH'ı 8.3'e ayarlandı. PAGE için hazırlanan elektrot tamponunda SDS kullanıldı. Hazırlanan tampon kullanılıncaya kadar 4 °C'de saklandı. Tampon 2-3 kez kullanıldıktan sonra yenilendi.

Coomassie Blue G-250 Çözeltisi: Commasie blue boyadan 100 mg, önce 200 mL metanol (% 50) içinde çözüldü, daha sonra 35 mL asetik asit (% 10) ilave edilerek, ultra saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

Yıkama Çözeltisi: % 10 metanol ve % 7 asetik asit çözeltisinden oluşmaktadır.

Jelin Hazırlanışı: Protein kontaminasyonunu ve her türlü kirliliği önlemek için bütün işlemler eldiven giyilerek yapıldı. Elektroforez camları % 70'lik etanolle iyice temizlendikten sonra jelin sızmasını önlemek için standına yerleştirildi. Cam levhalar arasında sızıntı olup olmadığı kontrol edildikten sonra, hava kabarcığı kalmayacak şekilde degaze edilmiş % 8'lik ayırma jeli, TEMED ve amonyum persülfat ilave edildikten sonra karıştırıldı. Hazırlanan jel mini elektroforez (Bio-Rad, Mini-PROTEAN, U.S) camları arasına döküldü. Ayırma jelinin içeriği Çizelge 3.6' de verildi.

Jelin havayla temasını kesmek için, üzeri % 70'lik etanolle kapatıldı ve jelin polimerleşmesi için 1 saat bekletildi. Süre sonunda ayırma jelinin üzerindeki alkol kurutma kâğıdı ile jele temas etmeden yavaş yavaş alındı ve üzerine % 4'lük yoğunlaştırma jeli döküldü. Tarak, jelle arasında hava kabarcığı kalmamasına ve ayırma jeline değmemesine dikkat edilerek jele yerleştirildi ve polimerleşmesi için 1-2 saat beklendi. Yoğunlaştırma jelinin içeriği Çizelge 3.7'de verildi.

Çizelge 3.6. % 8'lik ayırma jelinin içeriği

Jelin İçeriği	Miktar (mL)
Distile su	2.59
Ayırma tamponu (pH 8.8)	1
% 30'luk akrilamid/bis akrilamid	1.33
% 10' luk SDS (SDS-PAGE için)	0.05
% 10'luk amonyum persülfat	0.025
TEMED	0.00175

Çizelge 3.7. % 4' lük yoğunlaştırma jelinin içeriği

Jelin İçeriği	Miktar (mL)
Distile su	1.875
Yoğunlaştırma tamponu (pH 8.8)	0.25
% 30'luk akrilamid/bis akrilamid	0.3375
% 10' luk SDS (SDS-PAGE için)	0.025
% 10'luk amonyum persülfat	0.0125
TEMED	0.0035

3.12.1.2. Örneklerin hazırlanışı ve jele uygulanışı

Jele uygulanacak örnekler ve standart, örnek tamponuyla uygun seyreltmeleri yapıldıktan sonra kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatıldı. (PAGE için örnekler kaynatılmadı). Tarak jele zarar vermeden çekildi ve jel elektroforez tamponu ile yıkanarak polimerleşmeyen jel uzaklaştırıldı. Daha sonra kuyucuklar elektroforez tamponu ile dolduruldu ve uygun seyreltmeleri yapılan örneklerden 15 µL yüklendi. Örnekler jele yüklendikten sonra jel tankın içine yerleştirildi ve kuyucukların üzerini örtecek şekilde elektroforez tamponu eklendi. Güç kaynağı (UVP, Germany) ile 200 V 20 mA elektrik akımı verilerek proteinlerin ayırma işlemi yapıldı.

3.12.1.3. Jelin boyanması

Cam plaklar arasından çıkarılan jelden üst jel ayrıldı. Boyanın aldığı yol elektronik kumpasla ölçüldükten sonra, protein boyaması yapıldı. Coomassie Blue G-250 çözeltisi ile 1 saat 100 rpm’de çalkalanarak boyandı. Boyamadan sonra jeldeki fazla boya yıkama çözeltisi ile 100 rpm’ de yıkanarak uzaklaştırıldı ve bantlar görünür hale geldi.

3.12.1.4. Zimografi

Zimografi için cam plaklar arasından çıkarılarak ayrılan jel, oda sıcaklığında 5 dk ultra saf su ile yıkandı. Jel % 1’lik Triton X-100 içeren 20 mM asetat (pH 4.50, 4°C) tamponunda oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Daha sonra jel bu tampondan alınarak birkaç kez ultra saf su ile yıkandı. Jel, 4 mM sodyum fitat içeren 20 mM asetat (pH 4.50, 4 °C) tamponunda (30 mL) 55 °C’de 1 saat etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda çözelti uzaklaştırıldı ve jel ultra saf su ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra jel, taze hazırlanan renk çözeltisi içinde yeşil bantlar belirginleşene kadar oda sıcaklığında 1-2 saat bekletildi. Gerekli ölçümler yapıldıktan sonra renk çözeltisi uzaklaştırıldı ve ultra saf su içerisinde 4 °C’de saklandı (Chen vd.,2004). Taze hazırlanan renk çözeltisinin içeriği Çizelge 3.8’de verildi.

Çizelge 3.8. Taze hazırlanan renk çözeltisinin içeriği

Renk çözeltisinin içeriği	Miktar (mL)
Distile su	13
2.5 N HCl	18
% 2.6’lık amonyum molibat	18
% 0.126’lık malaşit yeşili	0.025

3.12.1.5. Fitazın molekül ağırlığının hesaplanması

Elektroforez sonucunda PAGE ve SDS-PAGE sonuçları karşılaştırılarak fitaz bandı belirlendi. SDS-PAGE jeline boyanın, standartların ve enzimin kat ettikleri mesafeler elektronik kumpas (Mitutoyo, CD-15CP, U.K.) yardımı ile ölçüldü. Standartların ve enzimin Rf değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

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

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

3.13. *Aspergillus tubingensis* HBF 202 Fitazının Karakterizasyonu

3.13.1. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi hem ham enzimde hem de saflaştırılmış enzimde, 5-80 °C arasındaki sıcaklıklarda yapıldı. Sodyum fitat çözeltisi (100 mM) ham enzim için 0.2 M asetat tamponunda (pH 5.5), saf enzim için ise 0.2 M glisin-HCl (55 °C pH 2.5) tamponunda hazırlanarak, standart deney ortamına final konsantrasyonu 7.5 mM olacak şekilde konuldu. Saf enzim çözeltisi 0.2 M glisin-HCl (55 °C, pH 2.5) tamponu ile 5 kat seyreltilti. Enzim aktivitesi sadece sıcaklık parametresi değiştirilerek, standart deney koşullarında spektrofotometrik olarak tayin edildi.

3.13.2. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisinin belirlenmesi hem ham enzimde hem de saflaştırılmış enzimde yapıldı. Standart deney ortamının pH'sı 0.5 birimlik aralıklarla pH 1.5.-8.0 aralığında (sıcaklık ham enzim için 55 °C, saf enzim için ise 60 °C) ayarlandı. Tampon çözeltiler olarak pH 1.5-3.0 için 0.2 M glisin-HCl tamponu, pH 3.5-5.5 için 0.2 M sitrat tamponu ve pH 6.0-8.0 için 0.2 M Tris-maleat tamponu kullanıldı. 100 mM stok sodyum fitat çözeltisi ham enzim için 0.2 M asetat (55 °C, pH 5.5) tamponunda, saf enzim için ise, 0.2 M glisin-HCl (60 °C, pH 2.5) tamponunda hazırlanmış final konsantrasyonu 7.5 mM olacak şekilde standart deney ortamına konuldu. Enzim aktivitesi standart deney koşullarında ölçüldü.

3.13.3. Enzim Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisini incelemek için sabit substrat konsantrasyonunda (final konsantrasyon 7.5 mM), optimum pH (0.2 M glisin-HCl,

pH 2.5) ve sıcaklıkta (60°C) enzim farklı sürelerde inkübasyona bırakılarak standart deney koşullarında aktivite tayin edildi.

3.13.4. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için, saflaştırılmış enzim stabilitesinin belirleneceği sıcaklıklar olan 25 °C, 37°C, 60 °C, 70 °C ve 80 °C' de hazırlanan 0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 2.5) ile 5 kat seyreltildi. Enzim bu sıcaklıklardaki su banyosunda (Poly science 911, USA) 24 saat boyunca inkübe edildi ve belirli aralıklarda örnekler alınarak standart deney koşullarında spektrofotometrik olarak aktivite tayini yapıldı. Her bir deneme için başlangıçtaki aktivite ölçümü kontrol (100) olarak kabul edildi ve aktivite değişimi kontrol değerine göre % değer olarak belirlendi.

3.13.5. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'ın Etkisi

Enzim stabilitesi üzerine pH'ın etkisini belirlemek için, pH 1.5; 2.0; 2.5 ve 3.0 değerlerinde 0.2 M glisin-HCl tamponu, pH 4.0 ve 5.0 için 0.2 M sitrat tamponu kullanıldı. Enzim çözeltisi bu tamponlarla 5 kat seyreltildi ve 25 °C'deki su banyosunda (Poly science 911, USA) 24 saat inkübe edildi. Enzim çözeltisinden inkübasyon boyunca belirli aralıklarla örnekler alındı ve standart deney koşulları altında aktivite ölçümü yapıldı. Her bir deneme için başlangıçtaki aktivite ölçümü kontrol (100) olarak kabul edildi ve geri kalan aktiviteleri % değer olarak belirtildi.

3.13.6. Enzimin Sıcaklık Stabilitesi Üzerine Polihidrik Alkollerin Etkisi

Enzimin sıcaklık stabilitesini artırmak amacıyla çeşitli polihidrik alkollerin (etilen glikol, gliserol, sorbitol) etkisi incelendi. Polihidrik alkoller, 60 °C'de, pH'sı 2.5 olan 0.2 M glisin-HCl tamponu içerisinde 1, 2 ve 3 M konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. Saflaştırılmış enzim bu çözeltilerle 5 kat seyreltilerek, 60 °C'deki su banyosunda, 2 saat inkübe edildi. Polihidrik alkol içermeyen enzim de kontrol olarak kabul edildi ve aynı koşullarda inkübe edildi. Inkübasyon sonunda enzim aktiviteleri standart deney koşullarında tayin edildi. Her bir deneme için başlangıçtaki aktivite ölçümü kontrol (100) olarak kabul edildi ve 2 saat sonunda geri kalan aktiviteleri % değer olarak belirlendi.

3.13.7. Enzim Stabilitesi Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi

Enzim stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisini belirlemek için 1,4-dioksan, aseton, asetonitril, benzen, bütanol, dietileter, dimetilsülfoksit (DMSO), etanol, etilasetat, gliserol, hekzan, isopropanol, metanol, sikloheksan ve toluen kullanıldı. Organik çözücüler final konsantrasyonları % 0.5 ve % 1 olacak şekilde saflaştırılmış enzimle karıştırıldı ve 25 °C’deki inkübatörde 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 1 saat inkübe edildi (Çizelge 3.9 ve 3.10). İnkübasyon sonunda enzim aktiviteleri standart deney koşullarında tayin edildi. Hiçbir organik çözücü içermeyen enzim de kontrol olarak kabul edildi ve aynı koşullarda inkübe edildi. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlendi.

Çizelge 3.9. % 0.5 organik çözücü içeren deney ortamı

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 2.5, 60 °C)	348 µL	348 µL
Organik çözgen	2 µL	2 µL
Enzim çözeltisi	20 µL	20 µL
60 °C’de 5 dk ön inkübasyon		
% 15 TCA	400 µL	-
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	-	30 µL
60 °C’de 20 dk inkübasyon		
% 15 TCA	-	400 µL
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	30 µL	-
2000 x g’de 10 dk santrifüj		
0.2 mL süpernatant + 1.8 mL ultrasaf su + 2 mL renk çözeltisi		
50 °C’de 15 dk inkübasyon		
820 nm’de spektrofotometrede absorbans ölçümü		

Çizelge 3.10. % 1 organik çözücü içeren deney ortamı

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 2.5, 60 °C)	346 µL	346 µL
Organik çözücü	4 µL	4 µL
Enzim çözeltisi	20 µL	20 µL
60 °C'de 5 dk ön inkübasyon		
% 15 TCA	400 µL	-
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	-	30 µL
60 °C'de 20 dk inkübasyon		
% 15 TCA	-	400 µL
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	30 µL	-
2000 x g'de 10 dk santrifüj		
0.2 mL süpernatant + 1.8 mL ultrasaf su + 2 mL renk çözeltisi		
50 °C'de 15 dk inkübasyon		
820 nm'de spektrofotometrede absorpsiyon ölçümü		

3.13.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi optimum sıcaklık ve pH'da (60 °C ve pH 2.5), sabit inkübasyon süresinde (20 dk) ve farklı konsantrasyonlarda (100, 111, 125, 143, 167, 200, 250, 333, 500, 1000 µM sodyum fitat) substrat kullanılarak enzim aktivitesinin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlendi. Enzimin K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplandı.

3.13.9. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi

Enzimin substrat spesifitesini belirlemek amacıyla 0.2 M glisin-HCl tamponunda (optimum pH 2.5) hazırlanan 20 mM 4-nitrofenil-fosfat, 5-brom-4-klor-3-indol fosfat, D-fruktoz-1,6-bisfosfat, D-fruktoz-6-fosfat, D-glukoz-1-fosfat, D-glukoz-6-fosfat, α -gliserofosfat, β -gliserofosfat, α -naftil fosfat, β -naftil fosfatın çözeltileri substrat olarak kullanıldı. Enzim aktivitesi standart deney koşulları altında ölçüldü. Sodyum fitat için ölçülen değer kontrol olarak (100) kabul edildi ve aktivite değişimleri % değer olarak hesaplandı.

3.13.10. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin ve Denatürantların Etkisi

İnhibe edici ajanlar ve denatürantların enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla; serin spesifik inhibitörü olan fenil metil sülfonil florür (PMSF); SH-grubu (sülfidril grubu) inhibitörü olan β merkaptotanol; SH-grubu ve disülfid grubu (-S-S-) inhibitörü olan ve aynı zamanda antioksidan olan 1,4- dithiothreitol (DTT); sistein spesifik inhibitörü ve sülfidril oksidasyon ajanı olan 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB); triptofan inhibitörü olan N-bromo suksinamid (NBS); karboksil grubu inhibitörü olan sikloheksil-N-(2-morfolinoetil)-karboimid metil-p-toluen-sulfonat (CMC); sistein ve histidin alkilleyici iodoasetamid (İAA); arjinin inhibitörü olan 2,3 bütandion; kuvvetli fitaz inhibitörü olan vanadat, molibdat ve askorbik asit ve diğer bir kuvvetli inhibitör olan florür; kaotropik ajan olan borik asit, okzalat, sitrat; protein denaturantı olan üre, sodyum azid ve SDS; indirgeyici madde glutatyon kullanıldı.

PMSF, n-propanolda, DTNB ise 0.1 M NaOH de çözöldü. İnhibitörler 100 mM'lık stok çözeltilerinden, deney ortamına final konsantrasyonu 1 ve 5 mM olacak şekilde eklendi ve standart koşullarda aktiviteleri tayin edildi (Çizelge 3.11 ve 3.12). Hiçbir inhibitör veya denatürant içermeyen deney ortamı kontrol olarak kabul edildi. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değışimleri % değeri olarak belirlendi.

Çizelge 3.11. 1 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı.

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 2.5, 60 °C)	342 μ L	342 μ L
İnhibe edici ajan (100 mM)	8 μ L	8 μ L
Enzim çözeltilisi	20 μ L	20 μ L
60 °C'de 5 dk ön inkübasyon		
% 15 TCA	400 μ L	-
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	-	30 μ L
60 °C'de 20 dk inkübasyon		
% 15 TCA	-	400 μ L
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	30 μ L	-
2000 x g'de 10 dk santrifüj		
0.2 mL süpernatant + 1.8 mL ultrasaf su + 2 mL renk çözeltilisi		
50 °C'de 15 dk inkübasyon		
820 nm'de spektrofotometrede absorbands ölçümü		

Çizelge 3.12. 5 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı.

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 2.5, 60 °C)	310 µL	310 µL
İnhibe edici ajan (100 mM)	40 µL	40 µL
Enzim çözeltisi	20 µL	20 µL
60 °C'de 5 dk ön inkübasyon		
% 15 TCA	400 µL	-
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	-	30 µL
60 °C'de 30 dk inkübasyon		
% 15 TCA	-	400 µL
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	30 µL	-
2000 x g'de 10 dk santrifüj		
0.2 mL süpernatant + 1.8 mL ultrasaf su + 2 mL renk çözeltisi		
50 °C'de 15 dk inkübasyon		
820 nm'de spektrofotometrede absorbands ölçümü		

3.13.11. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini incelemek için AlCl_3 , BaCl_2 , CaCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 , FeCl_3 , KCl , LiCl , MgCl_2 , MnCl_2 , NaCl , NH_4Cl , NiCl_2 , PbCl_2 , ZnCl_2 ve EDTA kullanıldı. Metal iyonları 100 mM stok çözeltisinden final konsantrasyonu 1, 5 ve 10 mM olacak şekilde deney ortamlarına eklendi (Çizelge 3.13, 3.14 ve 3.15). Hiçbir metali içermeyen deney ortamı, kontrol olarak kabul edildi. Standart koşullarda aktivite tayini yapıldı. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlendi.

3.13.12. Enzim Aktivitesi Üzerine İnorganik Fosfatın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine inorganik fosfatın etkisini belirlemek için, hazırlanan stok KH_2PO_4 (100 mM) çözeltiden, final konsantrasyonu 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 ve 10.0 mM olacak şekilde deney ortamına ilave edilerek, standart deney koşullarında aktivite ölçümleri yapıldı. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlendi.

Çizelge 3.13. 1 mM metal iyonu içeren deney ortamı

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 2.5, 60 °C)	346 µL	346 µL
Metal İyonları	4 µL	4 µL
Enzim çözeltisi	20 µL	20 µL
60 °C'de 5 dk ön inkübasyon		
% 15 TCA	400 µL	-
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	-	30 µL
60 °C'de 20 dk inkübasyon		
% 15 TCA	-	400 µL
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	30 µL	-
2000 x g'de 10 dk santrifüj		
0.2 mL süpernatant + 1.8 mL ultrasaf su + 2 mL renk çözeltisi		
50 °C'de 15 dk inkübasyon		
820 nm'de spektrofotometrede absorbands ölçümü		

Çizelge 3.14. 5 mM metal iyonu içeren deney ortamı

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 2.5, 60 °C)	330 µL	330 µL
Metal İyonları	20 µL	20 µL
Enzim çözeltisi	20 µL	20 µL
60 °C'de 5 dk ön inkübasyon		
% 15 TCA	400 µL	-
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	-	30 µL
60 °C'de 30 dk inkübasyon		
% 15 TCA	-	400 µL
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	30 µL	-
2000 x g'de 10 dk santrifüj		
0.2 mL süpernatant + 1.8 mL ultrasaf su + 2 mL renk çözeltisi		
50 °C'de 15 dk inkübasyon		
820 nm'de spektrofotometrede absorbands ölçümü		

Çizelge 3.15. 10 mM metal iyonu içeren deney ortamı

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 2.5, 60 °C)	310 µL	310 µL
Metal İyonları	40 µL	40 µL
Enzim çözeltisi	20 µL	20 µL
60 °C'de 5 dk ön inkübasyon		
% 15 TCA	400 µL	-
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	-	30 µL
60 °C'de 20 dk inkübasyon		
% 15 TCA	-	400 µL
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	30 µL	-
2000 x g'de 10 dk santrifüj		
0.2 mL süpernatant + 1.8 mL ultrasaf su + 2 mL renk çözeltisi		
50 °C'de 15 dk inkübasyon		
820 nm'de spektrofotometrede absorbands ölçümü		

3.13.13. Verilerin Değerlendirilmesi

Protein derişimi, fosfor standardı, V_{max} ve K_m değerleri lineer regresyon analizi ile saptandı (STATISTICA 7.0). Her deney üç tekrar üzerinden yapıldı. Gruplar arasındaki farkın ve bu farkın hangi gruptan kaynaklandığının belirlenmesi için tek yönlü varyans analizi (Tukey ve Duncan Testi) yapıldı. (STATISTICA 7.0) Kontrol grubu ile deney grubu arasındaki farkın belirlenmesinde eşlenmiş örneklerde t-testi uygulandı (STATISTICA 7.0).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Fungusun Moleküler Tanısı

Morfolojik olarak *A. tubingensis* HBF 202 olarak teşhis edilen izolatin, ITS gen bölgesi PCR ile çoğaltıldı. PCR ürünleri, sekans için Macrogen (Güney Kore) firmasına gönderildi. Gelen sekans sonucu, Clustal W programı kullanılarak hizalandı. Hizalanan sekans dizisi www.pubmed.com adresinde yer alan nükleotid blast programı aracılığıyla veri tabanında yer alan ITS dizileri ile karşılaştırıldı. Veritabanında kayıtlı ve tür tanısı yapılmış olan funguslar arasında en yüksek benzerlik oranı (% 99) *Aspergillus tubingensis* olarak saptandı. Nükleotid blast programında elde edilen diziler ile neighbor joining ağacı elde edildi (MEGA 6) (Şekil 4.1). Buna göre HBF 202 izolatomuz *A. tubingensis*'in de içinde bulunduğu grupta yer alıp daha önce yapılan morfolojik tanıyı destekledi. *A. tubingensis* HBF 202 izolatının sekansı için <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/submit.html> adresinde bulunan Sequin programı kullanılarak Genbank'tan **KM285407** kayıt numarası alındı.

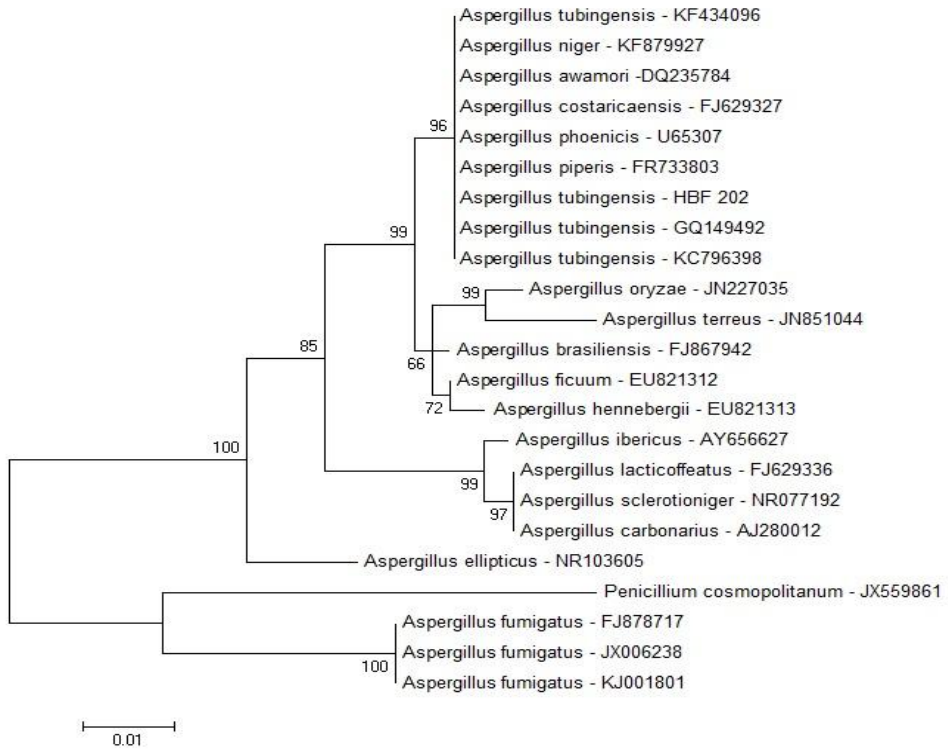
4.2. Aflatoksin

A. tubingensis HBF 202 fungusunun aflatoksin üretilip üretilmediği Hg Czapek Dox Agar, Glukoz Yeast Ekstrakt ve AFPA besiyerleri kullanılarak saptandı. Hazırlanan bu ortamlara malt ekstrakt agarda spor oluşumu sağlanan stokdan tek nokta ekimi yapıldı ve 30 °C'de 5 gün inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kültürler UV ışığı altında incelenerek ışıma yapıp yapmadığına bakıldı. *A. tubingensis* HBF 202'nin UV ışığı altında ışıma vermemesi dolayısıyla aflatoksin üretilmediği saptandı. Bu sonuç, çalıştığımız fungusun endüstriyel çalışmalarda güvenli bir şekilde kullanılabileceğini gösterdi.

4.3. *Aspergillus tubingensis* HBF 202'nin Fitaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi

Mikroorganizmaların geliştirilmesinde enzim üretme kapasitelerinin taranması, besiyeri formülasyonu ve kültür koşullarının değerlendirilmesi önemli bir adımdır

(Singh ve Satyanarayana, 2008). Kültür koşullarının optimizasyonunda amaç, sadece mikroorganizmanın en iyi gelişiminin ve enzim üretiminin gerçekleştiği sıcaklık ve pH'ın belirlenmesi değil; aynı zamanda enzimin ortama salındıktan sonra stabil olduğu sıcaklık ve pH'ın belirlenmesidir.



Şekil 4.1. *A. tubingensis* HBF 202 ITS gen bölgesinin dizileri ile en yüksek homoloji gösteren GENBANK'daki dizilerle elde edilmiş neighbor joining ağacı.

4.3.1. Enzim Üretimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi

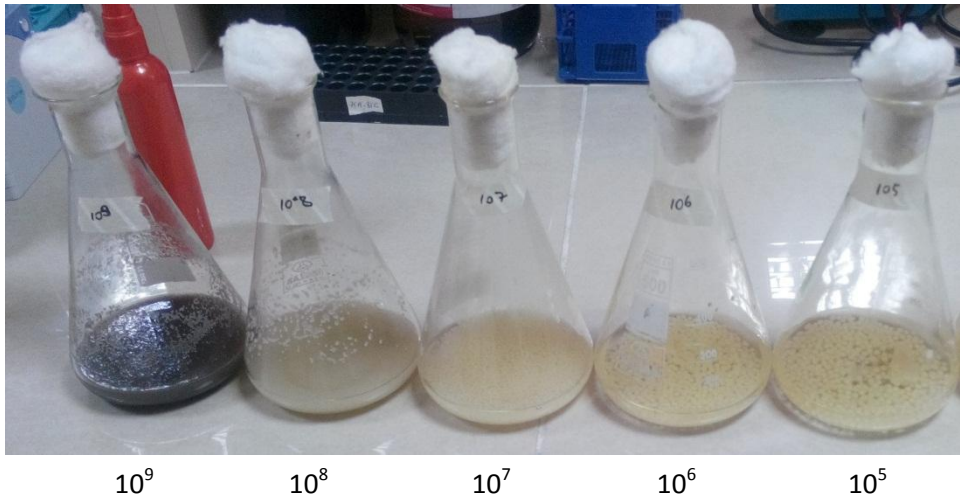
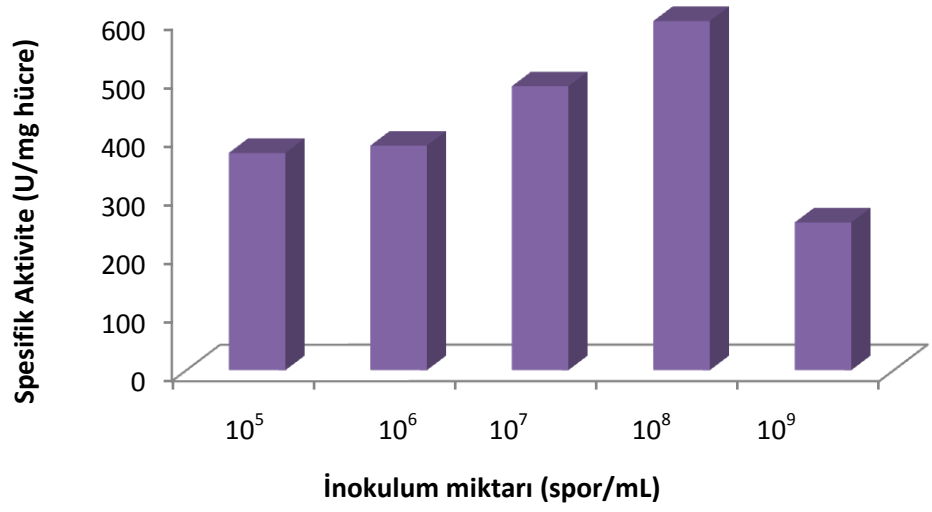
İnokulum miktarının enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek için, 100 mL fitaz üretim ortamı içeren 500 mL'lik erlenlere, uygun seyreltmelerden 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 ve 10^9 spor/mL olacak şekilde inokule edildi. İnkübasyon sonunda kültürlerin kuru ağırlıkları, ortamın pH'sı ve fitaz aktiviteleri tayin edildi, sonuçlar Çizelge 4.1'de sunuldu. *A. tubingensis* HBF 202 fungusunda fitaz üretimi için en uygun

inokulum miktarın en yüksek spesifik aktiviteye sahip olmasından dolayı 10^8 spor/mL olarak belirlendi (Şekil 4.2).

Çalışmamızda, inokulasyon miktarının artmasıyla birlikte hücre gelişiminde azalma gözlenirken, inokulasyon miktarı 10^5 den 10^8 e kadar arttıkça spesifik aktivite değerinde artış saptandı ve 10^8 spor/mL ile diğer inokulasyon miktarları aralarındaki fark karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) bulundu. İnokulasyon miktarı 10^9 spor/mL olduğu durumda ise, hücre gelişimi oldukça azdır. İnoküle edilen spor miktarı çok fazla olmasından dolayı, kültür ortamındaki besinlerin yetersiz gelmesi sonucu tam bir gelişmenin sağlanamadığı ve spor formunu koruduğu düşünülmektedir (Şekil 4.2). İnokulasyon miktarının 10^6 , 10^7 ve 10^8 spor/mL olduğu koşullarda sonuçlar hacimsel aktivite açısından aralarındaki fark karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemsiz bulundu. Fakat 10^8 spor/mL inokulasyon miktarında hem 596.43 U/mg hücre ile en yüksek spesifik aktiviteye hem de 179.50 U/mL ile en yüksek hacimsel aktiviteye sahip olmasından dolayı, en uygun inokulasyon miktarı olarak belirlendi.

Batık kültür ortamlarına inoküle edilen mikroorganizma miktarı, metabolitlerin üretiminde önemli bir rol oynamaktadır (Mittal vd., 2012). Batık kültür ortamlarına yüksek miktarda inoküle edilen mikroorganizma, üretim ortamında hızlı besin tüketimine sebep olmaktadır. Kültür ortamında ki yetersiz besin ise, mikroorganizmanın metabolik aktivitesinde azalmaya sebep olabilir. Eğer batık kültür ortamına inoküle edilen mikroorganizma az gelirse, bu seferde mikroorganizma metabolit (özellikle seconder metabolit) üretimini gerçekleştiremez (Sunitha vd., 2000).

Rhizopus oligoporus (Sabu vd., 2002), *Mucor indicus* MTCC 6333 (Gulati vd. 2007b) ve *Klebsiella* sp.DB-3FJ711774.1 (Mittal vd., 2012) funguslarıyla yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar, bizim çalışma sonuçlarımıza benzer şekilde olup; en düşük ve en yüksek inokulasyon değerlerinde oldukça düşük fitaz aktivitesi elde edilmiştir.



Şekil 4.2. Enzim üretimi üzerine inokulum miktarının etkisi

Çizelge 4.1. Enzim üretimi üzerine inokulum miktarının etkisi

İnokulasyon Miktarı (spor/mL)	Hacimsel Aktivite (U/ml) (ORT.±S.H.)	x	Kuru Ağırlık (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mghücre) (ORT. ± S.H.)	x	pH	İnkübasyon Süresi (Gün)
10 ⁵	137.60 ± 5.28	a	0.3707	371.19 ± 5.28	a	4.21	12
10 ⁶	127.05 ± 3.14	a	0.3312	383.61 ± 3.14	a	4.09	12
10 ⁷	131.40 ± 3.44	a	0.2709	485.05 ± 3.44	b	4.36	12
10⁸	179.50 ± 2.33	b	0.3009	596.43 ± 2.33	c	4.09	10
10 ⁹	75.20 ± 5.21	c	0.2979	252.43 ± 5.21	d	4.98	7

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.3.2. Fitaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

A. tubingensis HBF 202'nin en iyi fitaz üretimini gerçekleştirdiği sıcaklığı belirlemek için, 500 mL'lik erlene 100 mL 20, 30, 40 ve 50 °C'de pH'ı 5.5 olacak şekilde hazırlanan fitaz üretim ortamı eklendi. *A. tubingensis* HBF 202 spor solusyonundan 10^8 spor/mL olacak şekilde kültür ortamına inoküle edildi ve 110 rpm'de, 10-20 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kültürlerin kuru ağırlıkları, ortamın pH'sı ve fitaz aktiviteleri tayin edildi (Çizelge 4.2). *A. tubingensis* HBF 202 en iyi gelişimini ve enzim üretimini gerçekleştirdiği sıcaklık 30 °C olarak belirlendi. *A. tubingensis* HBF 202 fungusu 50 °C'de gelişmedi (Şekil 4.3).

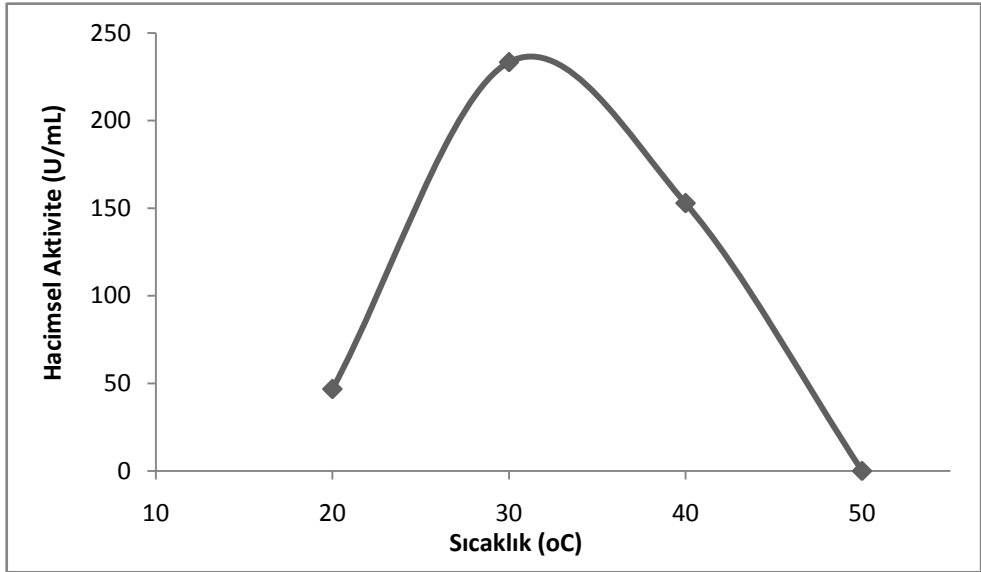
A. tubingensis HBF 202'nin 20, 30, 40 ve 50 °C'lerdeki inkübasyonlarında meydana gelen değişimler karşılaştırıldığında aralarındaki farklar istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) bulundu. En iyi hücre gelişiminin gerçekleştiği 30 °C'de 595.04 U/mg ile en iyi enzim üretimi gerçekleşti. En iyi enzim aktivitesi de 233.32 U/mL ile 30 °C'de elde edildi. Fungusumuzun geliştiği sıcaklık aralığı değerlendirildiğinde mezofilik bir karakterde olduğu saptandı.

A. tubingensis HBF 202'nin 20 °C'deki inkübasyonu 30 °C'ye göre daha fazla sürdü. Fungusun 20 °C'de ki en yüksek enzim aktivitesi gösterdiği gün 17. gün olup inkübasyonun sona erdiği gün 20. gün olarak saptandı. Çünkü düşük sıcaklıklarda büyüme yavaş meydana gelir, enzimler daha az verimle çalışır ve lipidlerin katılaşma eğiliminden dolayı membran akışkanlığını kaybeder. *A. tubingensis* HBF 202, 50 °C'de gelişme göstermedi bu da fungusumuzun termofilik bir karakterde olmadığını göstermektedir.

Sıcaklık bir organizmanın büyüme miktarı ve derecesini tayin eden önemli bir faktördür. Sıcaklığın özellikle enzim aktivitesi ve kimyasal reaksiyonlar açısından etkisinin büyük olduğu, sıcaklığın her 1°C artışında birçok enzim aktivitesinin 2 kat, kimyasal reaksiyonların ise 10 kat artırdığı bilinmektedir (Kaşık, 2010).

Mikroorganizmaların vücut ısılarını kontrol eden mekanizmaları yoktur. Yani kendi hücre ısılarını kontrol etmeleri veya kontrol altında tutmaları mümkün değildir. Mikroorganizmaların bulundukları ortamın ısısı ne derece ise, hücre ısıları da aynı derecede olur. Dolayısıyla mikroorganizmaların bulundukları

ortamın ısısı, mikroorganizma üzerinde rol oynayan en önemli faktörlerin başında gelir. Mikroorganizmaların dayanabildikleri sıcaklık aralıkları türlere göre farklılıklar gösterir (Şakar, 2004). Mantarların çoğunun ısı istekleri 22-40°C arasında değişir. Bundan dolayı mantarların çoğu mezofilik karakterdedir. Mezofilik mantarların optimum gelişme sıcaklığı 25-30°C arasındadır. Bazı mantarlar ise termofilik olup 45-60°C aralığında optimum gelişme gösterirler (Kaşık, 2010). Fitaz üreten çoğu mikroorganizmanın en iyi enzim üretimini gerçekleştirdiği optimum kültür sıcaklığının 25 ve 37 °C aralığında olduğu bildirilmiştir (Choi vd., 1999). Çalışmamıza benzer olarak, *A. niger* var Teigham (Vats ve Banerjee, 2005) ve *Aspergillus niger* UA-D (Ekren, 2013) fitaz üretiminde fungusun en iyi geliştiği ve maksimum enzim üretiminin gerçekleştiği sıcaklık 30 °C olarak bildirilmiştir. *Aspergillus* sp. L117 fungusu ile yapılan çalışmadaki bulgulara sonuçlarımıza benzerlik göstermektedir. Fungus 25, 28, 30 ve 32 °C’de gelişim göstermiş, 35 ve 40 °C’de ise gelişimi azalmaya başlamış, maksimum fitaz üretimi ve en iyi gelişimise 30 °C’de elde edilmiştir (Lee vd., 2005). Ama çalışmamızdan farklı olarak, *Pichia anomala*’nın en iyi gelişim sıcaklığı 30 °C iken en iyi fitaz üretimini 20 °C’de gerçekleştirmiştir (Vohra ve Satyanarayana, 2001). Bu çalışmaya benzer şekilde *Arxula adeninivorans*’ın da en iyi gelişim sıcaklığı 28 °C olarak belirlenmiş, en iyi fitaz üretimini ise 44 °C’de gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Sano vd., 1999).



Şekil 4.3. Fitaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi

Çizelge 4.2. Fitaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kuru Ağırlık (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg hücre) (ORT. ± S.H.)	x	pH	İnkübasyon Süresi (Gün)
20	46.73 ± 0.79	a	0.2210	211.45 ± 0.79	a	4.10	20
30	233.32 ± 0.91	b	0.3921	595.04 ± 0.91	b	4.21	10
40	152.83 ± 0.58	c	0.4187	121.41 ± 0.58	c	4.02	12
50	00.00 ± 0.00	d	0.0000	00.00 ± 0.00	d	5.50	-

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.3.3. Fitaz Üretimi Üzerine Başlangıç pH'sının Etkisi

A. tubingensis HBF 202'nin maksimum fitaz enzimi ürettiği başlangıç pH'sını belirlemek için, 500 mL'lik erlene 30 °C'de farklı pH'larda (pH 2.0- 8.0) 100 mL fitaz üretim ortamı eklenip, inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültürlerin kuru ağırlıkları, ortamın pH'sı ve fitaz aktiviteleri tayin edilip, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3 ve Şekil 4.4'de görülmektedir. *A. tubingensis* HBF 202 fungusu en iyi enzim üretimini pH 5.0'deki kültür ortamında gerçekleştirdiği saptandı. Fungus, pH 6.5 üzerinde olan kültür ortamlarında ise gelişmedi.

Mikroorganizmaların gelişimini ve aktivitesini belirleyen önemli faktörlerden biri de pH' dır. Her mikroorganizmanın sevdiği ve yaşadığı belli bir pH aralığı vardır. Bu pH aralıklarında mikroorganizmalar maksimum hızla büyüme göstermektedir (Şakar, 2004). Uygun olmayan pH koşullarında, hücre geçirgenliği ve enzim aktiviteleri olumsuz etkilenir, protein sentezi durur, hücreler toksik maddelere karşı daha duyarlı hale gelir, mikroorganizma da morfolojik değişikliklere neden olur, bazı iyonların çözünürlüğü ve mikroorganizmaların bunlardan yararlanmasını etkiler (kalsiyum iyonları alkali ortamlarda çözünemez ve kullanılamaz) ve lag (gecikme) fazları uzar (Gürsoy, 2011).

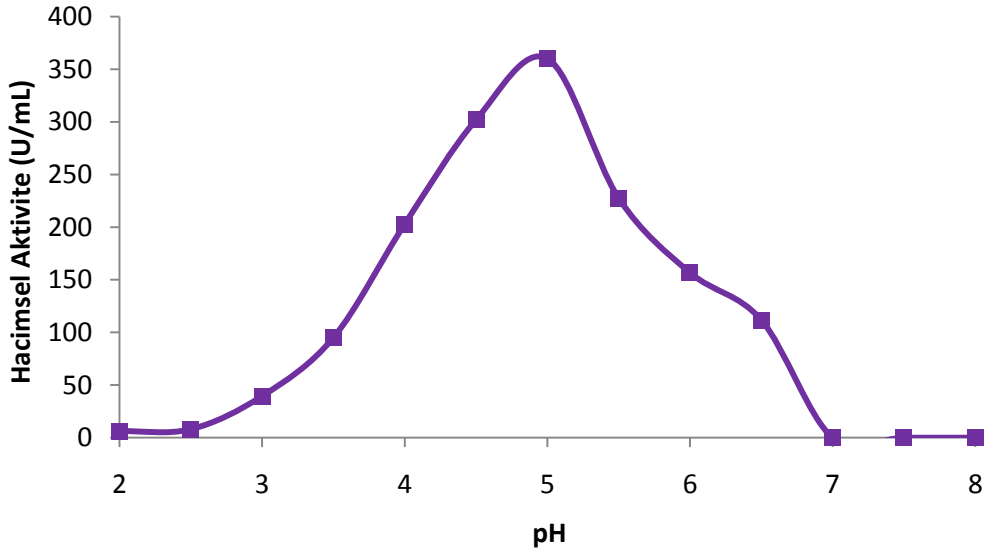
Funguslarda pH derecesi çok geniş bir varyasyon gösterir. Genel olarak pH istekleri 5.0-6.5 arasında olduğu bilinmektedir. Funguslar asit ortamları bazik ortamlara tercih ederler. Hücre dışı pH konsantrasyonu hücre içi pH derecesini de etkilemektedir. Bu da enzim aktivitesi üzerinde etkili olmaktadır (Kaşık, 2010).

A. tubingensis HBF 202 en az gelişimi pH 2.0, 2.5 ve 3.0'de gösterdi. *A. tubingensis* HBF 202 pH 6.5 üzerinde ise gelişim göstermedi. Fungusun gelişimi pH 2.0-5.0 aralığında pH'daki artış ile paralel olarak artarken, pH 5.0'den sonraki değerlerde ise pH'daki artış fungus gelişiminde azalmaya neden oldu. Fungus pH'sı 5.0 olan kültür ortamında geliştirildiğinde 1180.37 U/mg ile en iyi enzim üretimi elde edildi Maksimum enzim üretimi ve fungus gelişimi pH 5.0'de (360.13 U/mL) saptandı.

Aspergillus sp. 307 (Gargova ve Sariyska, 2003) ve *Aspergillus niger* UA-D (Ekren, 2013) fitazı ile yapılan çalışmalar, sonuçlarımıza benzerlik göstermektedir. Fungus, kültür başlangıç pH'sının 3.0-5.0 aralığında olduğu koşullarda hücre

gelişimi ve enzim üretimi paralellik göstermiştir. Maksimum fitaz üretiminin ise başlangıç pH'sının 5.0 olduğu koşullarda elde edilmiştir.

Çalışmamızdan farklı olarak, fitaz üretimi için kültür ortamının en uygun başlangıç pH'sının *Aspergillus niger* var Teigham için pH 6.5 (Vats ve Banerjee, 2002), *Aspergillus* sp. 5990 için pH 6.0 ve 7.0 (Kim vd., 1999), *Pichia anomala* için pH 7.0 (Vohra ve Satyanarayana, 2001) ve *Aspergillus niger* için pH 3.0 (Volfova vd., 1994) olarak bildirilmiştir.



Şekil 4.4. Fitaz üretimi üzerine başlangıç pH'sının etkisi

Çizelge 4.3. Fitaz üretimi üzerine başlangıç pH'sının etkisi

pH	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kuru Ağırlık (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg hücre) (ORT. ± S.H.)	Final pH	x	İnkübasyon Süresi (Gün)
2.00	6.15 ± 0.08	a	0.2212	27.82 ± 0.08	3.27	a	6
2.50	8.00 ± 4.21	a	0.2249	61.54 ± 4.21	4.12	b	6
3.00	39.51 ± 6.54	b	0.2209	178.86 ± 6.54	3.88	c	7
3.50	95.19 ± 5.18	c	0.2319	410.51 ± 5.18	4.17	d	7
4.00	202.90 ± 6.12	d	0.2355	861.60 ± 6.12	4.50	e	8
4.50	302.00 ± 7.78	e	0.3224	936.68 ± 7.78	3.84	f	8
5.00	360.13 ± 2.21	f	0.3051	1180.37 ± 2.21	3.90	g	10
5.50	227.50 ± 4.44	d	0.2665	853.54 ± 4.44	5.69	h	10
6.00	156.68 ± 3.37	g	0.2213	707.97 ± 3.37	5.44	ı	8
6.50	111.70 ± 2.06	h	0.2256	495.15 ± 2.06	4.77	j	8
7.00	0.00 ± 0.00	ı	0.00	0.00 ± 0.00	5.66	k	-
7.50	0.00 ± 0.00	ı	0.00	0.00 ± 0.00	6.78	k	-
8.00	0.00 ± 0.00	ı	0.00	0.00 ± 0.00	8.00	k	-

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.4. *Aspergillus tubingensis* HBF 202'nin Büyüme Kinetiği

A. tubingensis HBF 202'nin zamana bağlı gelişimini ve en iyi fitaz üretim zamanını saptamak için, (optimum pH ve sıcaklıkta) 10 gün boyunca 24 saatlik periyotlar ile biyokütle, pH ve enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı, elde edilen değerler Çizelge 4.4'de verildi.

A. tubingensis HBF 202 belirlenen optimum pH ve sıcaklıkta geliştirildiğinde; hücre gelişimi 1. günde en düşük seviyede olup, süreye bağlı olarak biyomas miktarı artmaya devam etti, 6. ve 8. günler arasında sabit bir değere ulaştı. Sekizinci günden sonra süreye bağlı olarak biyomas miktarı azalmaya devam etti ve 10. günde hücreler parçalandı (Şekil 4.5).

Enzim aktivitesinde ilk 4 günde görülen artışlar arasındaki fark, istatistiksel olarak önemsiz bulundu. İnkübasyonun 4. gününden itibaren enzim aktivitesi artarak 8. günde maksimum değere ulaştı ve ölçülen diğer değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu (Şekil 4.5). Maksimum değere ulaştığı 8. günden sonra enzim aktivitesinde bir düşüş gözlemlendi. Ancak 7. ve 8. günler için elde edilen değerlerin istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edildi. Bu aktivite kaybının ortamdaki proteazların aktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı zamanda enzimin ortama salındıktan sonra aktivitesinin büyük bir kısmını koruyabilmesinin, inkübasyon ortamının pH'sında stabil olması ve ortamdaki proteazlara karşı direncinin yüksek olması ile açıklanabilir.

Başlangıç pH'ı 5.0 olan kültür ortamının 1. günden itibaren pH'ında bir azalma gözlemlendi. Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu 8. güne kadar pH 2.83-4.07 arasında olduğu belirlendi. Enzim üretiminin maksimum olduğu 8. günde ise, pH 4.64 olarak saptandı (Şekil 4.6).

Aspergillus tubingensis HBF 202'nin zamana bağlı gelişimi incelendiğinde hücrenin ortama uyum zamanı olan 1. günde lag fazında olup biyokütle ve enzim üretimi en düşük seviyededir. Hücrenin gelişimi ve gerekli metabolitleri meydana getirmesi için kendini hazırladığı bu evre, inokulasyon miktarına bağlıdır. Fungusun büyüme kinetiğindeki log fazı 2. günde başlayıp 5. günde sona erdi. Log fazında, fungusun gelişimine paralel olarak hacimsel aktivitede de artış gözlemlendi. İnkübasyonun 6-8. günlerinde ise hücresel büyümenin durduğu

saptandı (Şekil 4.5). Sekizinci günün ardından kültür ortamındaki besin kaynaklarının azalmasına bağlı olarak, hücrelerin ölüm fazına geçerek lizise uğradıkları gözlemlendi (Şekil 4.7).

Kültür ortamının pH'sı lag fazında başlangıç pH'ına yakın değerdedir. Fakat enzim aktivitesinin maksimum olduğu güne kadar biyokütle arttıkça, kültür ortamının pH'ında düşüş saptandı. Çünkü mikroorganizmalar kendi faaliyetleri sonucunda bulundukları ortamın pH değerini değiştirebilmektedir.

Benzer sonuçlar Ekren, (2013) tarafından *Aspergillus niger* UA-D suşunun inkübasyonu sonucu elde edilmiştir. Bu suşun 5 gün inkübasyonu boyunca kültür ortamının pH'ının 2.84'e kadar düştüğü bildirilmiş, pH değerlerindeki bu düşüşün hücrelerin gelişimi süresince üretilen organik asitten kaynaklandığı belirtilmiştir.

Aspergillus tubingensis HBF 202'nin enzim aktivitesi hücre gelişiminin azalmaya başladığı, enerji ve besinin sınırlı olduğu durgunluk fazının son safhasında, maksimum seviyeye ulaştığı görüldü. Fitaz enziminin logaritmik fazda sentezlenmemesi hücrenin gelişimi sırasında fitaz enzimine ihtiyaç duymadığını göstermektedir (Choi vd., 2001).

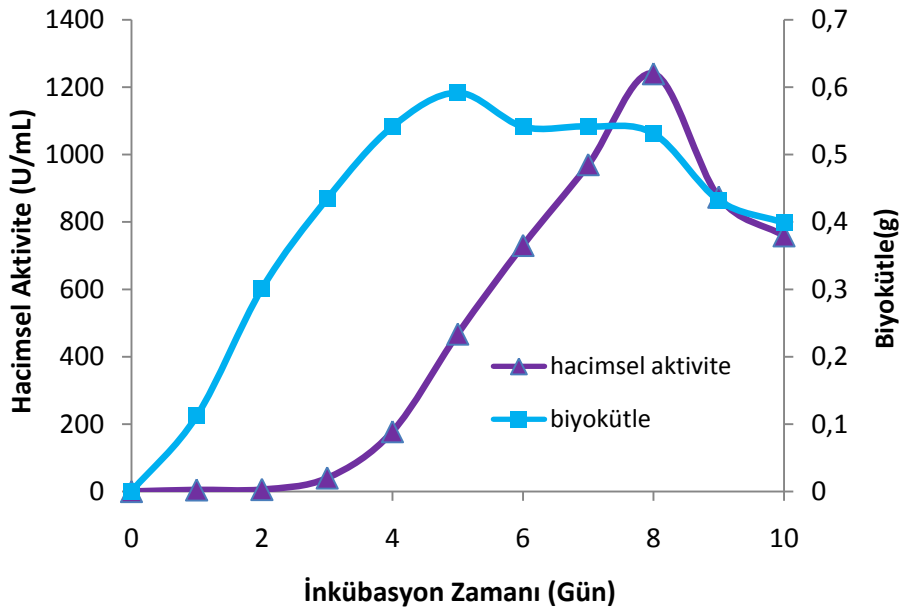
Çalışmamızda elde edilen sonuçlara benzer şekilde *Aspergillus niger* UA-D inkübasyondan 7 gün sonra (Ekren, 2013), *Candida Krusei* inkübasyonundan 24 saat sonra (Quan vd., 2001) ve *Bacillus* sp. KHU-10 inkübasyondan 5 gün sonra (Choi vd., 2001), durgun fazda fitaz enzimi maksimum aktiviteye ulaşmıştır. Ancak çalışmamızdan farklı olarak; *B. subtilis* (natto) (Shimizu, 1992) geç logaritmik fazda, *Sporotrichum thermophile* (Singh ve Satyanarayana, 2009) logaritmik fazda fitaz enzimini üretmişlerdir.

Çizelge 4.4. *Aspergillus tubingensis* HBF 202'nin büyüme kinetiği

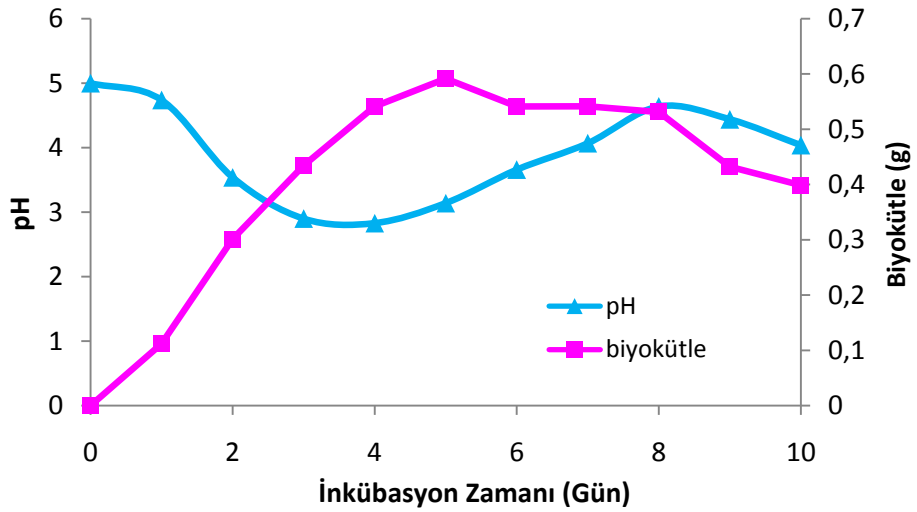
İnkübasyon Süresi (gün)	Biyokütle (mg/mL)	Hacimsel Aktivite (U/ mL) (ORT. ±S.H.)	Final pH	X
1	0.112	4.78 ± 1.35	4.74	a
2	0.301	5.87 ± 0.44	3.54	a
3	0.435	40.13 ± 2.25	2.90	a
4	0.541	177.65 ± 4.28	2.83	a
5	0.592	467.31 ± 3.88	3.14	b
6	0.541	730.43 ± 1.17	3.66	c
7	0.542	970.04 ± 22.69	4.07	d
8	0.531	1239.94 ± 6.85	4.64	d
9	0.432	873.43 ± 9.33	4.44	e
10	0.399	758.43 ± 11.63	4.04	e

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

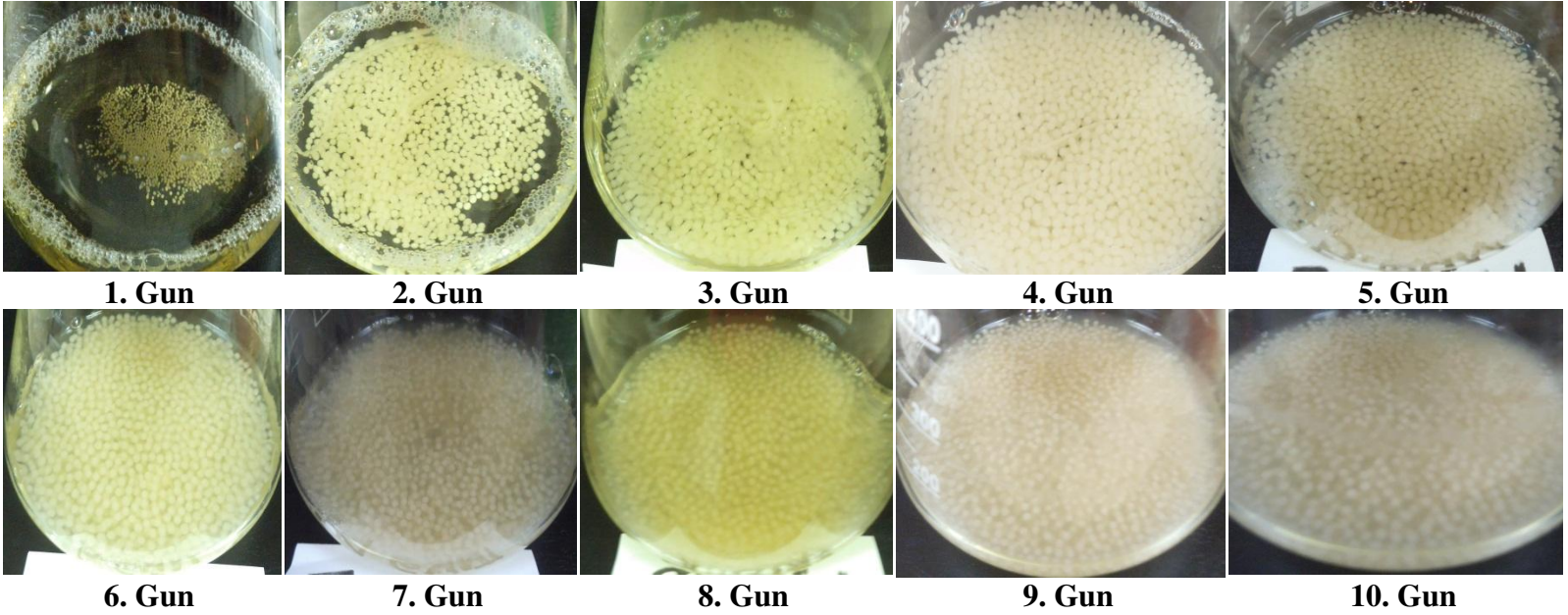
x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).



Şekil 4.5. *Aspergillus tubingensis* HBF 202'nin gelişime bağlı hacimsel aktivite ve biyokütle değişimi



Şekil 4.6. *Aspergillus tubingensis* HBF 202'nin gelişime bağlı pH ve biyokütle değişimi



Şekil 4.7. *Aspergillus tubingensis* HBF 202'nin kültür ortamındaki zamana bağlı gelişimi

4.5. Fitazın Saflaştırılması

Enzimin saflaştırma işlemine geçilmeden önce *Aspergillus tubingensis* HBF 202 suşu optimum üretim koşullarında geliştirildi. Hücre dışı enzim olduğu için, kültür ortamı süzöldükten sonra elde edilen süzöntü “Ham ekstrakt” olarak adlandırıldı. Ham ekstrakt sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik etkileşim, diyaliz, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi işlemlerinden geçirilerek saflaştırıldı. Saflaştırma adımlarında elde edilen fraksiyonların aktivite ve protein tayinleri standart koşullar altında gerçekleştirildi. Saflaştırma basamaklarında elde edilen fraksiyonlar, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) ile zimografi yapılarak görüntülendi ve standart proteinler kullanılarak enzimin molekül ağırlığı belirlendi.

Genellikle saflaştırma işlemlerinin ilk basamağında çöktürme işlemi uygulanmakta olup, bu amaç için en çok amonyum sülfat tuzu kullanılmaktadır. Saflaştırma işlemlerinde çöktürme ile deriştirmenin ardından kromatografi adımlarına geçilir. Bu amaçla en çok iyon değişim, jel filtrasyon ve hidrofobik etkileşim kromatografileri kullanılmaktadır.

4.5.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Optimum koşullarda üretimi yapılan *A. tubingensis* HBF 202'nin fitaz kültür ortamı süzölerek enzim kaynağı (ham ekstrakt) olarak kullanıldı. Elde edilen ham ekstrakt amonyum sülfat çöktürme denemeleri için kullanıldı. Ham ekstrakt için ayrı ayrı % 0-20, % 20-40, % 40-60, % 60-80, % 80-100 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapıldı (Çizelge 4.5). Buna göre % 80-100'lik çöktürmeden elde edilen enzimin saflaştırma katsayısı 2.2, spesifik aktivitesi 13544 U/mg protein ve % verimi 49.59 olarak bulunmuştur. Diğer konsantrasyonlara göre spesifik aktivitesi yüksek olduğu için, bundan sonraki aşamalarda % 80-100'lük amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı.

Çizelge 4.5. Amonyum sülfat çöktürme basamakları

Fraksiyonlar	Total Hacim (mL)	Total Aktivite (U/mL) (ORT. $\pm$ S.H.)	Total Protein (mg/mL) (ORT. $\pm$ S.H.)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma katsayısı	Verim (%)
Ham enzim	150.00	23130.43 $\pm$ 116.50	3.78 $\pm$ 1.10	6111	1	100
% 20 (% 0-20)	2.10	42.00 $\pm$ 10.54	0.18 $\pm$ 0.19	223	0.04	0.18
% 40 (% 20-40)	4.40	154.00 $\pm$ 16.32	0.19 $\pm$ 0.12	797	0.13	0.67
% 60 (% 40-60)	5.00	200.00 $\pm$ 55.78	0.16 $\pm$ 0.06	1214	0.20	0.86
% 80 (% 60-80)	5.20	200.84 $\pm$ 69.41	0.15 $\pm$ 0.54	1318	0.22	0.87
%100 (% 80-100)	7.50	11471.01 $\pm$ 89.54	0.84 $\pm$ 0.34	13544	2.22	49.59

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.5.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile ilgili sonuçlar Şekil 4.8’de ve Çizelge 4.6’da özetlendi. Kolon dolgu maddesi olarak fenil sefaroz CL-4B kullanıldı. Kolon önce 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 20 mM asetat (pH 4.50, 4°C) tamponu ile yıkanarak kararlı hale (hidrofobik alanların açığa çıkması sağlandı) getirildi. % 80-100’lük amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen enzim kaynağı hidrofobik grupların etkili olabilmesi için direk olarak diyaliz işlemi uygulanmadan, fenil sefaroz CL-4B kolonuna yüklendi. Kolon önce bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması için 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren tamponla yıkandı. Şekil 4.8’de görüldüğü gibi bağlanmayan proteinlerin çok büyük bir kısmı kolonun amonyum sülfatlı tamponla yıkanması esnasında çıktı. Bu fraksiyonlarda enzim aktivitesi saptanmadı. Bu durum enzimin tamamen kolona bağlandığını göstermektedir. Daha sonra kolona bağlanan proteinlerin kolondan çıkarılması için tuz derişimi azaltılarak $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1-0M) ile ters tuz gradienti yapıldı. Gradientin 0.60-0.40 M derişimlerine karşılık gelen 61.-65. fraksiyonlarda enzim aktivitesinin çok yüksek olduğu belirlendi. Bu yüksek fraksiyonlar birleştirilerek enzim aktivitesi ölçüldüğünde kolondan enzimin % 12.79 verimle, 52 kat saflaştırılarak elde edildiği saptandı.

4.5.3. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi ile ilgili sonuçlar Şekil 4.9’de ve Çizelge 4.6 da özetlendi. Kolon dolgu maddesi olarak DEAE sefaroz CL-6B kullanıldı. Kolon önce 20 mM asetat tamponu (pH 4.5, 4 °C) ile yıkanak tampon ile dengeye getirildi. Fenil sefaroz CL-4B kolonundan elde edilen aktif fraksiyonlardaki tuzu diyaliz işlemi ile uzaklaştırdıktan sonra kolona uygulandı. Kolonda bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması için, 20 mM asetat tamponu (pH 4.5, 4°C) ile yıkandı. Daha sonra kolona bağlanan proteinlerin kolondan çıkarılması için, iyon şiddeti artırılarak NaCl (0-1 M) ile linear gradient yapıldı. Tuz gradientinin 0.33-0.43 M derişimlerine karşılık gelen 58.-61. fraksiyonlarda protein derişim ve enzim aktivitesinin çok yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.9). Bu yüksek çıkan fraksiyonlar birleştirilerek enzim aktivitesi ölçüldüğünde enzimin % 7.25 verimle, 55 kat saflaştırılarak elde edildi.

4.5.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi

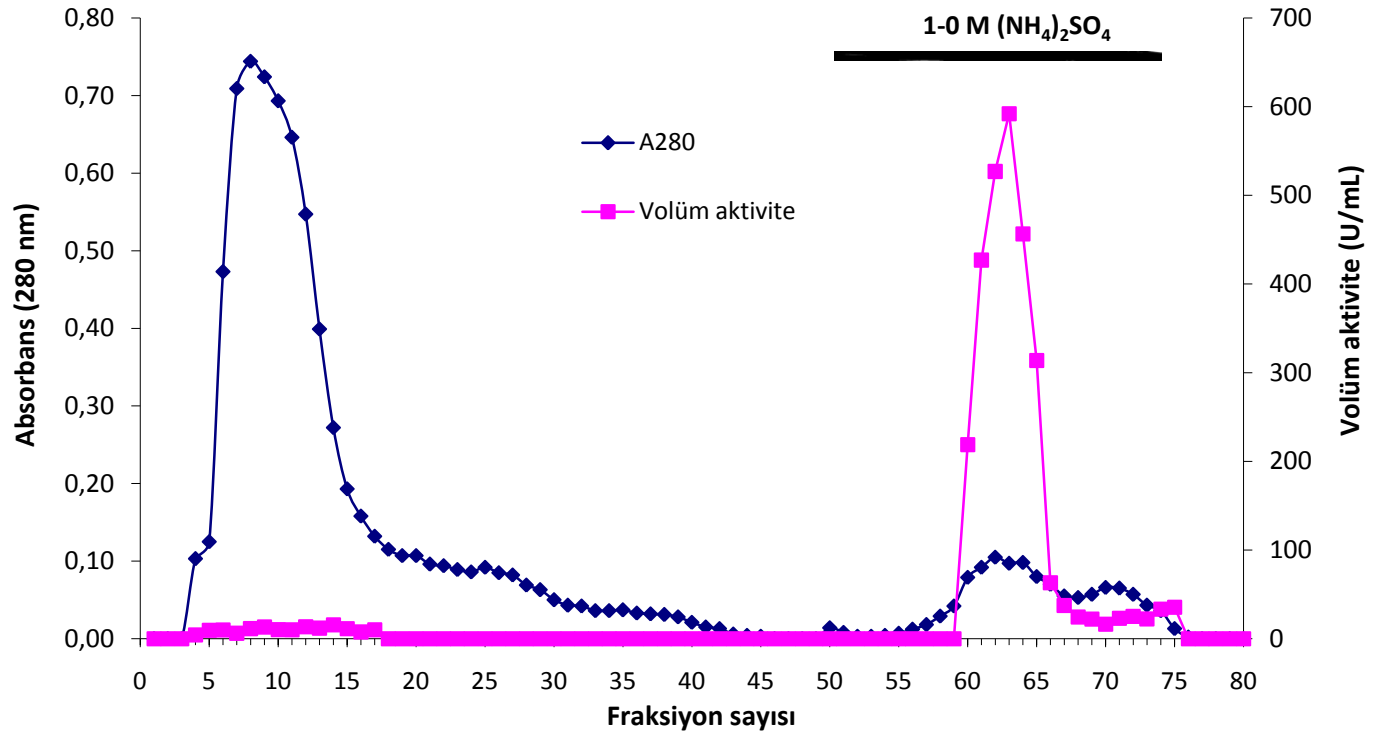
İyon değişim kromatografisi ile ilgili sonuçlar Şekil 4.10'da ve Çizelge 4.6 da özetlendi. Jel filtrasyon kromatografisinde kolon dolgu maddesi olarak Sefakril 200HR kullanıldı. Kolon önce 20 mM asetat (pH 4.50, 4 °C) tamponu ile dengeye getirildi. DEAE Sefaroz CL-6B kolonundan çıkan örnek ultrafiltrasyon ile konsantre edilerek kolona uygulandı. Kolon 20 mM asetat (pH 4.50, 4 °C) tamponu ile yıkanarak, proteinlerin çıkışı spektrofotometrede 280 nm'deki absorbans ölçülerek izlendi. Kolonda protein çıkışı olmayıncaya kadar kolonu yıkama işlemine devam edildi. Fraksiyonlarda enzim aktivitesi ölçüldüğünde 13-15. fraksiyonlarda enzim aktivitesi diğer fraksiyonlara göre daha yüksek bulundu ve bu fraksiyonun enzim aktivitesi ölçüldüğünde enzimin % 7.24 verimle 101 kat saflaştırıldığı saptandı. Fraksiyonun SDS-PAGE görüntüsünde tek bant elde edilerek enzimin saflaştırıldığı kanıtlandı. Jel filtrasyon kromatografisinden elde edilen bu fraksiyon karakterizasyon çalışmalarında kullanıldı.

Çizelge 4.6. *Aspergillus tubingensis* HBF 202 fitazının saflaştırma adımları

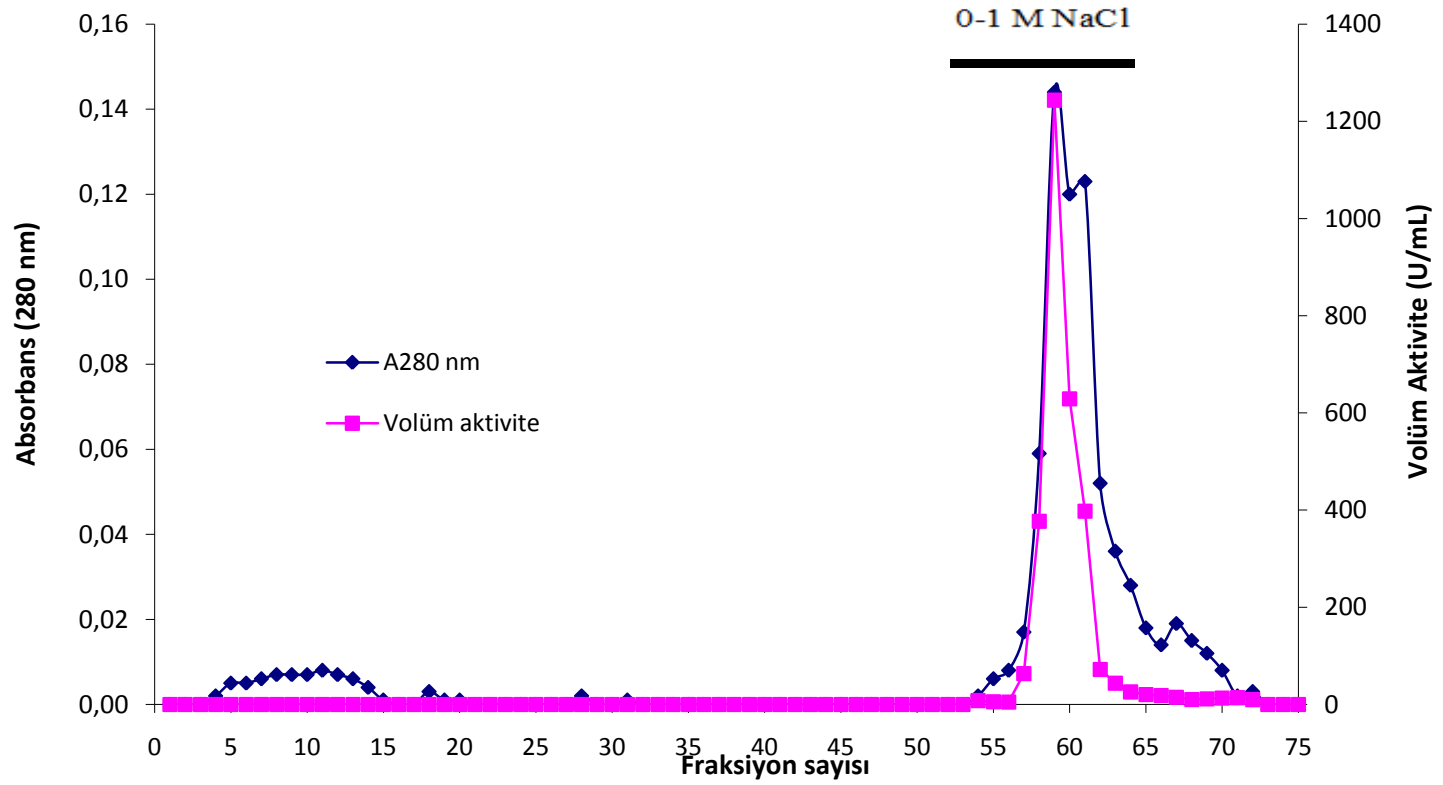
Fraksiyonlar	Total Hacim (mL)	Total Aktivite (U/mL) (ORT. $\pm$ S.H.)	Total Protein (mg/mL) (ORT. $\pm$ S.H.)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma katsayısı	Verim (%)
Ham enzim	295.00	62242 $\pm$ 122	14.7 $\pm$ 1.10	4233	1	100
Amonyum sülfat çöktürmesi (% 80-95)	4.70	31640 $\pm$ 52	1.56 $\pm$ 0.59	20220	5	50.83
Fenil sefaroze CL-4B	17.00	7958 $\pm$ 15	0.036 $\pm$ 0.02	220290	52	12.79
DEAE sefaroze CL-6B	2.00	4510 $\pm$ 57	0.019 $\pm$ 0.12	234268	55	7.25
Sefakril 200HR	10.50	4507 $\pm$ 53	0.011 $\pm$ 0.16	429227	101	7.24

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

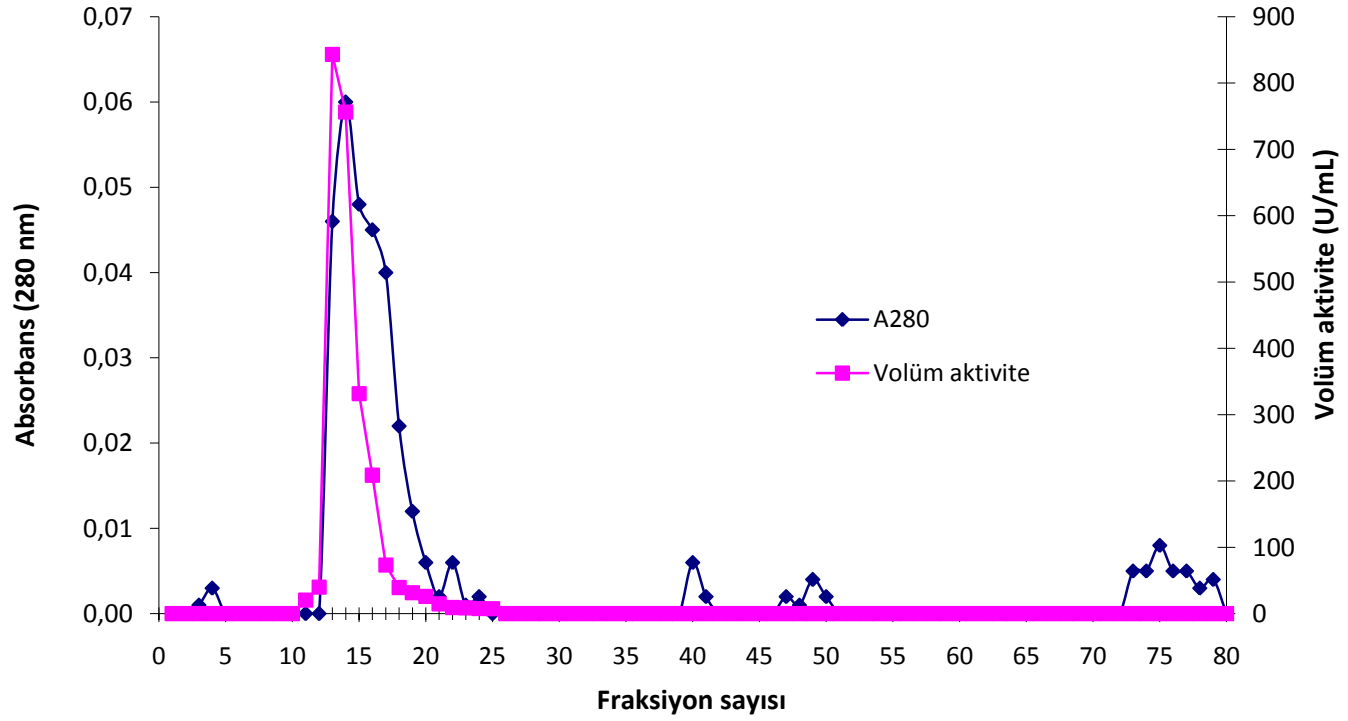
x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).



Şekil 4.8. Fitaz enziminin hidroforobik etkileşim (Fenil Sefaroz CL-4B) kromotografisinde saflaştırılması



Şekil 4.9. Fitaz enziminin iyon değişim (DEAE Sefaroz CL-6B) kromatografisinde saflaştırılması



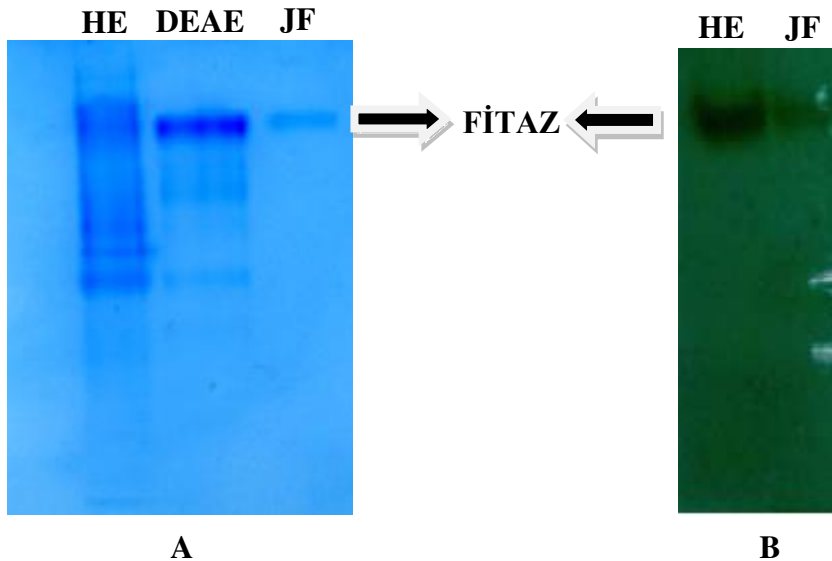
Şekil 4.10. Fitaz enziminin jel filtrasyon (Sefakril 200HR) kromatografisinde saflaştırılması

4.6. *Aspergillus tubingensis* HBF 202 Fitazının Karakterizasyonu

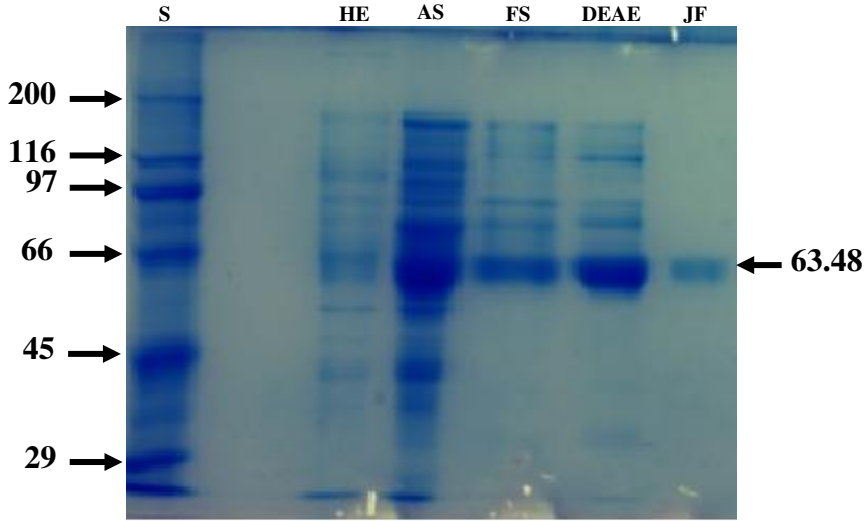
4.6.1. PAGE ve SDS-PAGE yöntemi ile Fitazın Molekül Ağırlığının Tayini

Saflaştırma boyunca elde edilen fraksiyonlarda enzimin saflığının kontrolü ve moleküler ağırlığının saptanması için PAGE ve SDS-PAGE yapıldı. PAGE ile elde edilen jel ikiye bölündü ve bir yarısı protein boyaması diğer yarısı da zimogram için kullanıldı. En son adım olan Sefakril 200HR kolonunda çıkan örnekte tek protein bandı görüldü. Böylece elde edilen fraksiyonun sadece fitaz enzimi içerdiği ve ham ekstraktan çeşitli yöntemler kullanılarak fitaz enziminin saflaştırıldığı kanıtlandı. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığını ve iki veya daha fazla alt birimden oluşup, oluşmadığını saptamak için SDS-PAGE yapıldığında enzimin tek bir alt birimden oluştuğu görüldü (Şekil 4.11 ve 4.12).

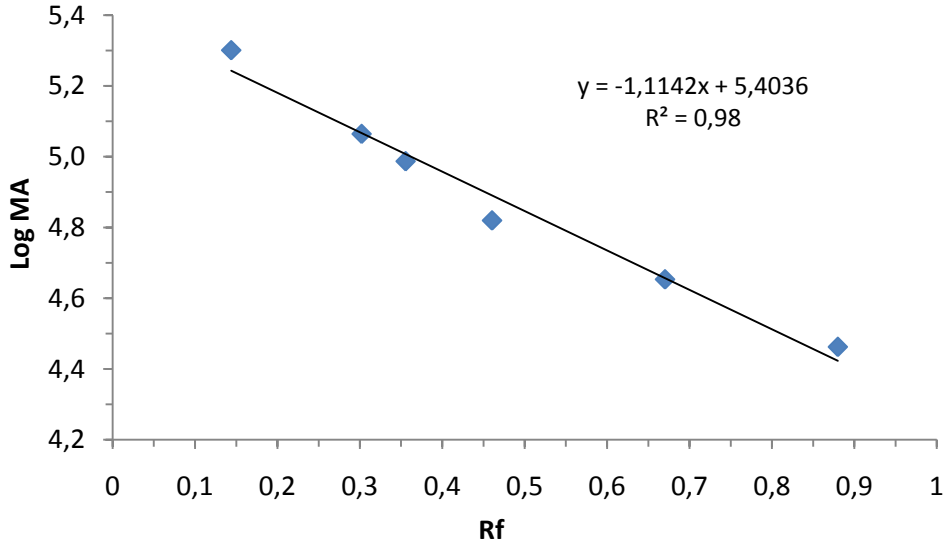
Protein standartlarının Rf değerleri ile moleküler ağırlıklarının logaritması alınarak standart grafiği çizildi (Şekil 4.13). Bu grafiğin denklemi $y = -1.1142 + 5.4036x$, tamamlayıcılık katsayısı $R^2 = 0.98$ bulundu. Bu denklemden yararlanarak enzimin moleküler ağırlığı hesaplandı. Buna göre fitazın moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 63.48 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 4.11. Saflaştırma adımlarının PAGE (A) ve zimogram (B) görüntüleri



Şekil 4.12. Saflaştırma adımlarının SDS- PAGE görüntüleri. (S: Standart, 200 kDa miyozin, 116 kDa β -galaktozidaz, 97 kDa fosforilaz B, 66 kDa sığır albumini, 45 kDa yumurta albumini, 29 kDa karbonik anhidraz, S:Standart, HE: Ham enzim, AS Amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE: DEAE sepharoz, FS: Fenil sefaroze JF: Jel filtrasyon kromatografisi)



Şekil 4.13. SDS-PAGE protein standart eğrisi

Liu vd., (1998), fitazın moleküler ağırlığının organizma türlerine bağlı olarak 35-700 kDa arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Ancak, *Flammulina velutipes*'ten (Zhu vd., 2011) ve *Klebsiella aerogenes*'den (Liu vd., 1998) izole edilen fitazların moleküler ağırlıkları alışılmışın dışında sırasıyla 14.8 ve 10-13 kDa'dur. Filametli funguslardan izole edilen fitazların moleküler ağırlıkları genelde 70-100 kDa arasındadır (Wodzinski ve Ullah, 1996; Casey ve Walsh, 2003). Bakteriyel fitazlar ise funguslardan elde edilen fitazlara göre daha küçük moleküler ağırlığa sahiptir. Ohtani ve ark. (2012) *Klebsiella pneumoniae* 9-3B ait fitazın moleküler ağırlığını 45 kDa olarak saptamışlardır.

Moleküler ağırlığı 40-70 kDa olan fitazların çoğunluğu monomerik enzimlerdir. Bununla birlikte, bazı fitazı hidroliz eden enzimler ise birçok alt birimden oluşmaktadır (Greiner ve Konietzny, 2002). Segueilha vd., (1992) *Schwanniomyces castellii* tarafından üretilen fitazı, büyük bir alt birimi (125 kDa) ve üç özdeş küçük alt birimleri (70 kDa) ile bir tetramerik proteini olarak tanımlamışlardır. *Candida krusei* WZ-001 fitazı iki alt birimden (120 kDa ve 30 kDa) oluşan dimerik bir enzimdir (Quan vd., 2002).

Fungal fitazların öngörülen moleküler ağırlıkları genelde 50 kDa iken, deneysel sonuçlarda elde edilen verilerin 65-70 kDa arasında olması fungal fitazlarda glikozilasyonun göstergesidir (Choi vd., 2001; Golovan vd., 2000; Han vd., 1999; Kerovuo vd., 1998; Rodriguez vd., 2000; Van vd., 1993). *Aspergillus niger* ATCC 9142 fitazının enziminde karbonhidrat içeriğinin % 31 olduğu bildirilmiş, moleküler ağırlığı 87 kDa olarak saptanmıştır (Casey ve Walsh, 2003). Glikozilasyon, *A. niger* NRRL 3135'in asit fosfatazi da dahil birçok fungal eksraselüler fitazın karakteristik özelliğidir (Ullah vd., 1994).

Çalışmamızda *A. tubingensis* HBF 202 fungusundan elde edilen fitazın moleküler ağırlığı (63.48 kDa), 64.57 kDa moleküler ağırlığa sahip *Aspergillus niger* UAD fitazı (Ekren, 2013), 66 kDa moleküler ağırlığa sahip *Aspergillus niger* van Teighem fitazı (Vats ve Banerjee, 2005) ve 60 kDa moleküler ağırlığa sahip *Aspergillus niger* SK-57 fitazı (Pandey, vd., 2001) ile benzerlik göstermektedir. Ancak, 60 kDa moleküler ağırlığa sahip dimerik *Aspergillus oryzae* fitazı (Shimizu, 1993) ve 68 kDa moleküler ağırlığa sahip dimerik *Aspergillus niger* NRRL 3135 (Mullaney ve Ullah, 2005) ile farklılık göstermektedir. Çalışmamızda *A. tubingensis* HBF 202 fitazının karbohidrat kalıntısı içerip içermediği saptanmamış olup ileriki çalışmalarda karbohidrat içeriğinin saptaması planlanmaktadır.

4.6.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

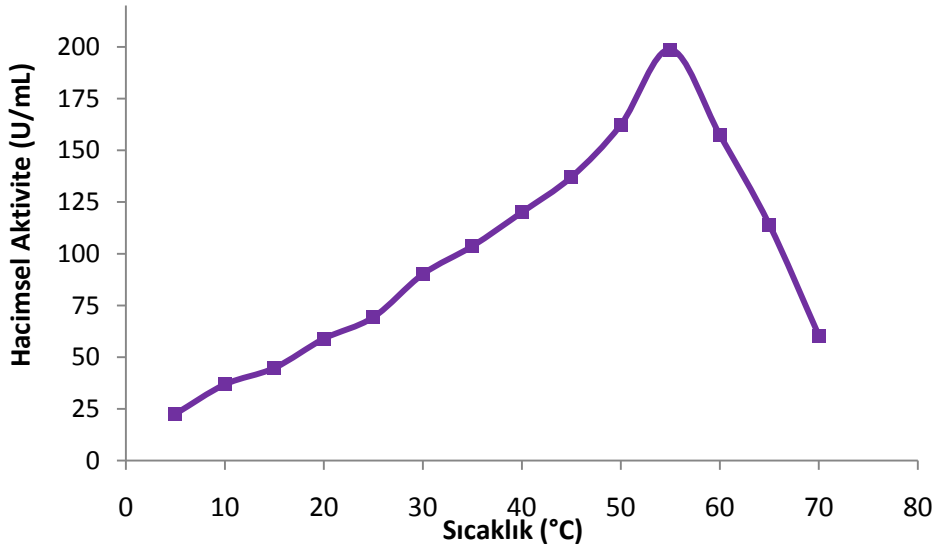
Ham fitaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin sonuçları Çizelge 4.7 ve Şekil 4.14’de sunuldu. Enzim aktivitesi 5 °C’de en düşük değerde (22.58 ± 0.23) olup, sıcaklığın kademeli olarak yükseltilmesiyle doğrusal bir şekilde artarak 55 °C’de maksimum seviyeye (198.79 ± 0.27) ulaştığı belirlendi. Sıcaklığın daha üst seviyelere yükseltilmesiyle, aktivitenin hızla düştüğü görüldü. 55 °C’deki maksimum enzim aktivitesi ile diğer tüm sıcaklıklardaki enzim aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildiğinde, 50, 60 ve 70 °C’lerde aktivite değişimi optimum aktivitenin sırasıyla % 81, 79 ve 30 ’unu gösterdiği saptandı.

Çizelge 4.7. *A. tubingensis* HBF 202 ham fitaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. $\pm$ S.H.)	x	Kalan Aktivite %
5	22.58 ± 0.23	a	11.36
10	36.83 ± 0.17	a	18.52
15	44.80 ± 0.44	b	22.53
20	58.93 ± 0.55	c	29.64
25	69.32 ± 0.27	d	34.87
30	90.09 ± 0.60	e	45.32
35	103.62 ± 0.66	e	52.12
40	120.04 ± 1.11	f	60.38
45	137.07 ± 0.34	g	68.95
50	162.31 ± 0.21	g	81.65
55	198.79 ± 0.27	h	100.00
60	157.48 ± 0.50	g	79.22
65	114.13 ± 0.19	f	57.41
70	60.51 ± 0.24	c	30.43

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).



Şekil 4.14. *A. tubingensis* HBF 202 ham fitazı aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Saf fitaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin sonuçları Çizelge 4.8 ve Şekil 4.15’de sunuldu. Enzim aktivitesi 5°C’de en düşük değerde (10.57 ± 14.76) olup, sıcaklığın kademeli olarak yükseltilmesiyle aktivite doğrusal bir şekilde artarak 60 °C’de maksimum seviyeye (955.08 ± 11.82) ulaştığı saptandı. Sıcaklığın daha üst seviyelere yükseltilmesiyle, aktivitenin hızla düştüğü görüldü ve 60 °C’deki maksimum enzim aktivitesi ile diğer tüm sıcaklıklardaki enzim aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildiğinde, 55, 65, ve 80 °C’lerde aktivite değişimi optimum aktivitenin sırasıyla % 80, 72 ve 20’sini gösterdiği saptandı.

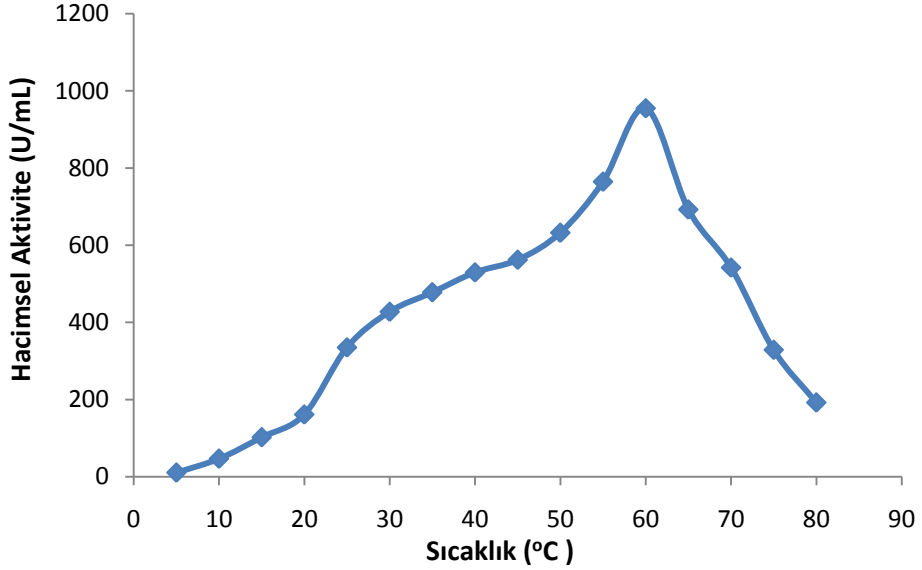
Mikrobiyal fitazların çoğunun optimum sıcaklıkları 45-60 °C arasında yer almaktadır (Pasamontes vd., 1997). Çalışmamıza benzer olarak, *Pichia pastori* (Han ve Lei, 1999), *Saccharomyces cerevisiae* (Han vd., 1999), *Klebsella aerogenes* (Qian vd., 1996) *Pantoea agglomerata* ve *Pichia anomala* (Greiner ve Konietzny, 2006)’dan elde edilen saf fitazların maksimum aktivitelerinin 60 °C’de olduğu saptanmıştır..

Çizelge 4.8. *A. tubingensis* HBF 202 fitazının aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ±S.H.)	x	Kalan Aktivite %
5	10.57 ± 14.76	a	1.10
10	46.66 ± 12.90	a	4.86
15	102.10 ± 7.26	b	10.69
20	161.25 ± 17.26	b	16.88
25	335.03 ± 25.90	c	35.07
30	427.51 ± 15.76	d	44.76
35	477.89 ± 10.23	d	50.00
40	529.52 ± 7.52	e	55.44
45	562.10 ± 19.81	ef	58.85
50	632.28 ± 18.25	g	66.20
55	764.61 ± 21.54	h	80.05
60	955.08 ± 11.82	ı	100.00
65	692.43 ± 11.79	j	72.49
70	542.05 ± 7.02	ek	56.75
75	328.52 ± 1.02	cl	34.39
80	192.18 ± 3.32	am	20.12

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).



Şekil 4.15. *A. tubingensis* HBF 202 fitazının aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

4.6.3. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Fitaz stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.9, 4.10 ve Şekil 4.16, 4.17’de gösterildi. Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisini saptamak amacıyla enzim, farklı sıcaklıklarda (25, 37, 60, 70 ve 80°C) inkübe edildi. Enzim çözeltisinden belli zaman aralıklarında örnekler alınarak aktivitesi tayin edildi ve kontrol değerine göre kalan enzim aktivitesi % olarak belirlendi.

Fitaz enzimi 25 ve 37 °C’da ilk yarım saatte aktivitesinin % 94’ünü koruduğu ve sekizinci saate kadar kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($p>0.05$). Yirmidört saatlik inkübasyon sonunda ise enzim aktivitesinin % 83 ve % 78’ini korunduğu saptandı.

Fitaz enzimi 60 °C’da inkübasyonunda ilk onbeş dakikada aktivitesinin % 95’ini koruduğu ve onbeşinci dakikaya kadar kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($p>0.05$). İnkübasyonun otuzuncu dakikasından itibaren inkübasyonun üçüncü saatine kadar enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak azalma göstermesine rağmen, başlangıç aktivitesinin % 80’inden fazlasını koruduğu belirlendi. sekiz saatlik inkübasyon sonunda ise enzim aktivitesinin % 74’ünü koruduğu bulundu.

Fitaz enzimi 70 °C'da inkübasyona bırakıldığında ilk kırkbeş dakikada aktivitesinin % 82'sini koruduğu saptandı. Enzim aktivitesi inkübasyonun birinci ve ikinci saatlerinde kontrole göre istatistiksel olarak azalma göstermiş ve başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 79 ve 73'ünü korumuştur. Enzim inkübasyonun 3, 4 ve 8. saatlerinde ise başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 71, 70 ve 64'ünü koruduğu bulundu.

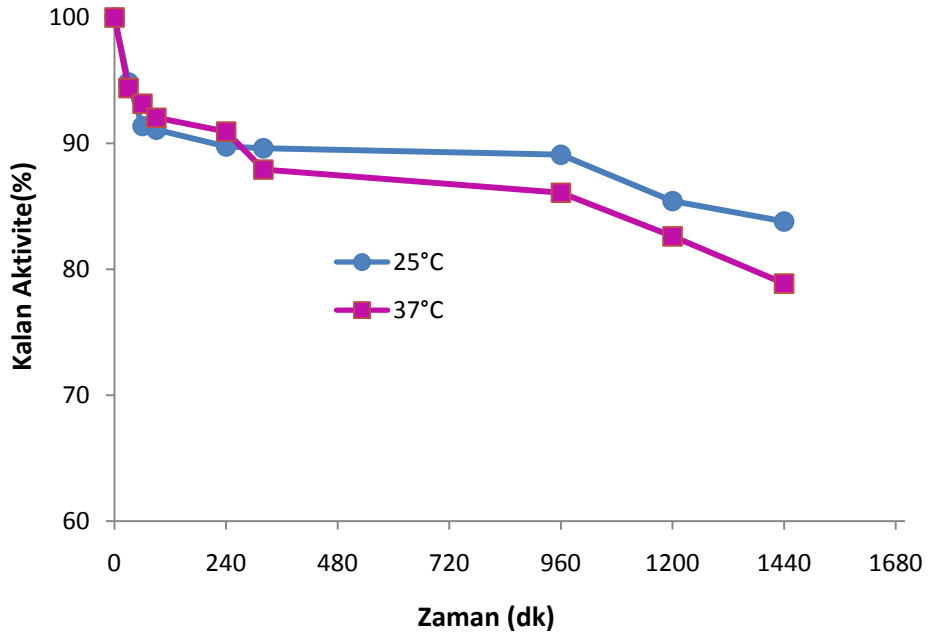
Fitaz enzimi 80 °C'da inkübasyona bırakıldığında ilk beş dakikada aktivitesinin % 67'sini koruduğu ve 5. dakikasından itibaren kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü ($p>0.05$). Enzim inkübasyonun onuncu ve onbeşinci dakikalarında başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 59 ve 33'ünü koruduğu bulundu.

Termostabilite fitazların endüstriyel uygulamaları için önemli bir kriter olarak kabul edilir (Pandey vd., 2001). Ticari yemler genellikle pellet formundadır ve pelletleme işlemi 60-90 °C'da iki dakika boyunca yapılır (Wyss vd., 1999a). Bu yüzden hayvan yemlerine uygulanan fitazlarda, aktivite kaybını önlemek için termostabilite aranan bir özelliktir (Lei vd., 2003). Fitaz enziminin, pelletlenmiş yemlere aktivite kaybı olmaması için sonradan spreyleneceği veya kimyasal olarak kaplanması yöntemleri olsa bile yem katkısı olarak termostabil fitaz enzimlerinin kullanımı daha iyi bir yöntem olacaktır (Aşan, 2007).

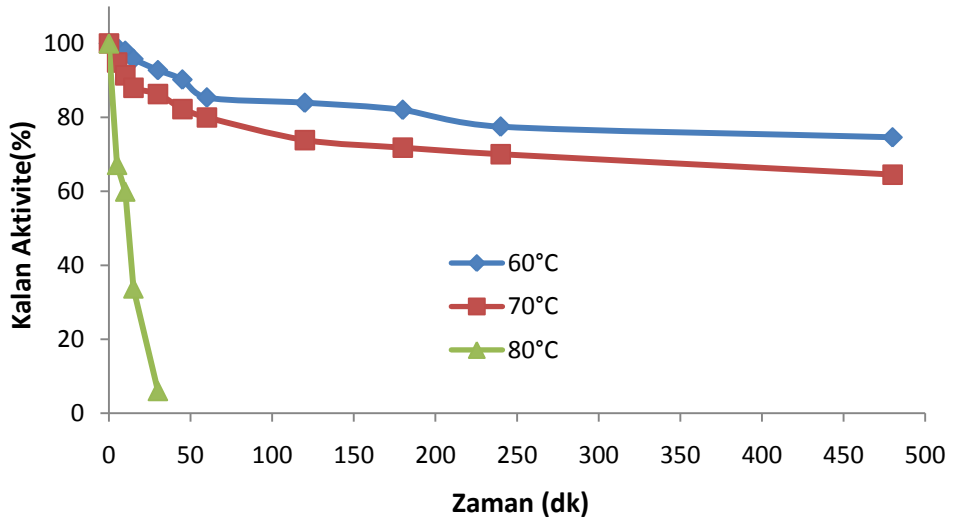
A. tubingensis HBF 202 fitazı, farklı sıcaklıklarda 60 dakika inkübasyonun ardından 0-30 °C arasında aktivitenin tamamını korurken, 50 °C'de aktivitesinin % 30'unu koruyabilen *Aspergillus niger* SK-57 fitazından (Nagashima vd., 1999) ve 35-80 °C 2 saatlik inkübasyonun sonunda aktivitesinin % 48'ni korurken, 80 °C'de 5 dakikalık inkübasyonun ardından aktivitenin % 20'sini koruyabilen *Rhizopus oligosporus* fitazından (Casey ve Walsh, 2006) daha yüksek termal stabiliteye sahip olduğu saptandı.

Ancak *A. tubingensis* HBF 202 fitazından daha yüksek termal stabiliteye sahip fitazlarda bulunmaktadır. *Rhizopus oryzae* fitazı 50 °C'de 30 dakikalık inkübasyon ardından aktivitesinin % 100'nü, 60, 70 ve 80 °C sıcaklıklarda ise başlangıç aktivitesinin % 90'ından fazlasını koruduğu saptanmıştır. *Rhizopus oryzae* fitazı'nın 70 °C'da yarılanma ömrünün ise 225 dakika olduğu saptanmıştır (Rani ve Ghosh, 2011). *Sporotrichum thermophile* fitazı 60 °C'de 1 saatlik inkübasyonunda aktivitesini % 100 korurken, 60 °C ve 80 °C'lerde yarılanma

ömürleri sırasıyla 960 ve 90 dakika olarak saptanmıştır (Singh ve Satyanarayana, 2009). *A. fumigatus*'dan elde edilen fitaz enziminin sıcaklığa dirençli olduğu ve enzimin 100 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda 20 dakikalık inkübasyonlarda, sadece %10'luk kayıpla aktivitesini koruduğu saptanmıştır (Pasamontes vd., 1997).



Şekil 4. 16. *A. tubingensis* HBF 202 fitazının 25 ve 37 °C'deki sıcaklık stabilitesi



Şekil 4. 17. *A. tubingensis* HBF 202 fitazının 60, 70 ve 80 °C'deki stabilitesi

Çizelge 4.9. *A. tubingensis* HBF 202 fitazının 25 ve 37 °C sıcaklıkta stabilitesi

İnkübasyon Süresi	25 °C			37 °C		
	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ±S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ±S.H.)	x	Kalan Aktivite %
Kontrol	340.45 ± 19.21	a	100	340.45 ± 19.21	a	100
30 dk	322.90 ± 11.68	a	94.84	321.40 ± 6.56	a	94.40
1 saat	311.12 ± 15.19	a	91.38	317.14 ± 8.78	a	93.15
2 saat	310.12 ± 28.88	a	91.09	313.38 ± 12.25	a	92.04
3 saat	305.61 ± 18.25	a	89.76	309.62 ± 11.47	a	90.94
4 saat	303.35 ± 28.88	a	89.62	299.34 ± 3.98	a	87.92
8 saat	303.35 ± 18.71	a	89.10	293.08 ± 6.84	a	86.08
16 saat	290.82 ± 6.18	b	85.42	281.30 ± 8.28	b	82.62
24 saat	285.31 ± 7.44	b	83.80	268.52 ± 9.33	b	78.87

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.10. *A. tubingensis* HBF 202 fitazının 60, 70 ve 80 °C sıcaklıkta stabilitesi

İnkübasyon Zamanı (dk)	60 °C			70 °C			80 °C		
	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ±S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ±S.H.)	x	Kalan Aktivite %
Kontrol	340.45 ± 19.21	a	100	340.45 ± 19.21	a	100	340.45 ± 19.21	a	100
5	336.69 ± 0.95	a	98.89	322.90 ± 2.88	a	94.84	228.67 ± 1.04	b	67.16
10	333.68 ± 0.88	a	98.01	311.12 ± 1.19	b	91.38	204.11 ± 9.14	c	59.95
15	326.16 ± 0.13	a	95.80	299.59 ± 1.46	b	88.00	114.88 ± 1.97	d	33.74
30	315.88 ± 3.61	b	92.78	293.83 ± 1.88	b	86.30	20.40 ± 0.64	e	5.99
45	307.11 ± 7.80	b	90.20	280.05 ± 2.39	b	82.25	-		-
60	290.57 ± 0.09	b	85.35	272.28 ± 8.90	c	79.97	-		-
120	285.81 ± 0.49	b	83.95	251.47 ± 2.97	c	73.86	-		-
180	279.29 ± 3.65	b	82.03	244.46 ± 0.97	d	71.80	-		-
240	263.75 ± 1.39	c	77.47	238.44 ± 0.26	d	70.03	-		-
480	253.98 ± 3.78	c	74.60	219.64 ± 7.20	e	64.51	-		-

ORT: Her veri üç tekrarı ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.6.4. Enzim Aktivitesi Üzerine pH' nın Etkisi

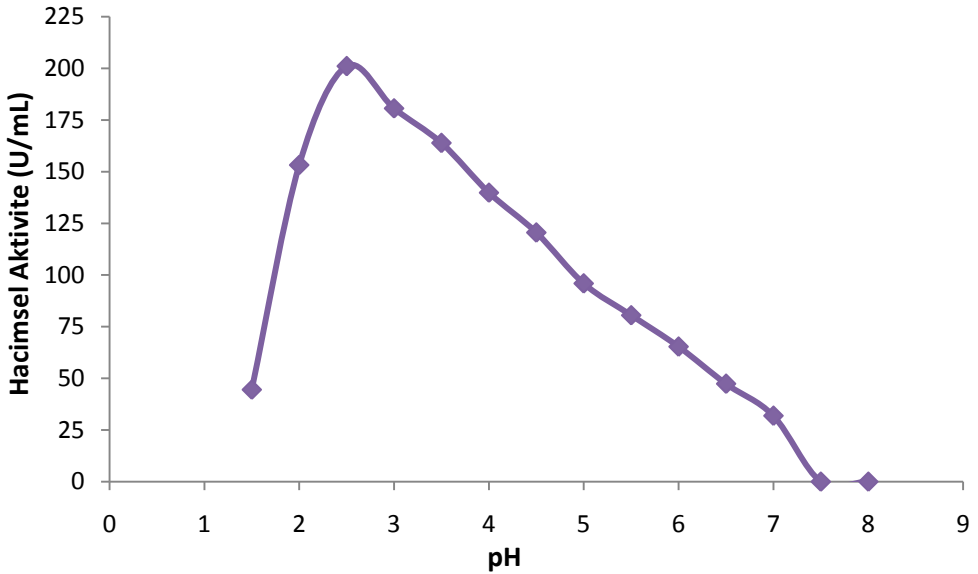
Ham fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisiyle ilgili sonuçlar Çizelge 4.11 ve Şekil 4.18'da gösterildi. Enzim aktivitesi pH 1.5'de en düşük değerde (44.54 ± 0.56) olup, pH'daki 0.5 birimlik artışlarla beraber, aktivite doğrusal bir şekilde artarak pH 2.5'da maksimum seviyeye (201.08 ± 3.79) ulaştığı ve pH'nın daha üst seviyelere yükseltilmesiyle, aktivitesinin düştüğü görüldü. Enzim, pH 7.5 ve 8.0' de aktivite göstermedi. Enzimin pH 2.5'daki maksimum enzim aktivitesi ile diğer tüm pH değerlerindeki aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildiğinde pH 2.0, 3.0 ve 3.5 değerlerinde başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 76, 89 ve 81 'ini koruduğu saptandı.

Çizelge 4.11 *A. tubingensis* HBF 202 ham fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

pH	Hacimsel aktivite (U/mL) (ORT. $\pm$ S.H.)	X	Kalan Aktivite %
1.5	44.54 ± 0.56	a	22.15
2.0	153.26 ± 1.71	b	76.21
2.5	201.08 ± 3.79	c	100.00
3.0	180.67 ± 6.98	d	89.84
3.5	163.88 ± 6.48	d	81.50
4.0	139.85 ± 5.91	e	69.54
4.5	120.53 ± 0.34	f	59.93
5.0	95.89 ± 9.46	g	47.68
5.5	80.55 ± 5.90	g	40.06
6.0	65.33 ± 1.91	h	32.49
6.5	47.34 ± 0.45	h	23.54
7.0	31.88 ± 0.07	h	15.85
7.5	00.00 ± 0.00	i	00.00
8.0	00.00 ± 0.00	i	00.00

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

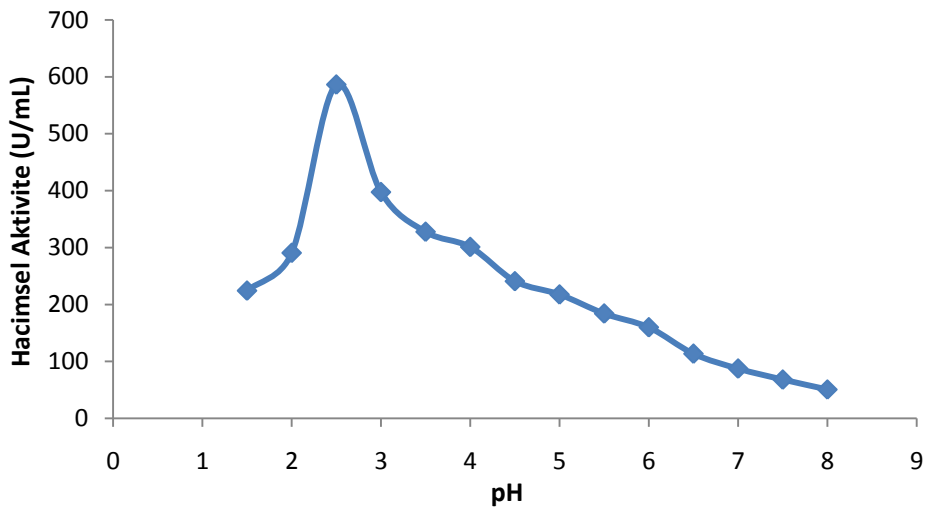
x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).



Şekil 4.18. *A. tubingensis* HBF 202 ham fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

A. tubingensis HBF 202 saf fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisiyle ilgili sonuçlar Çizelge 4.12 ve Şekil 4.19'de gösterildi. Enzim aktivitesi pH 1.5'de en düşük değerde (224.39 ± 0.12) olup, pH'daki 0.5 birimlik artışlarla beraber, aktivite doğrusal bir şekilde artarak pH 2.5'da maksimum seviyeye (586.23 ± 13.70) ulaştığı ve pH'nın daha üst seviyelere yükseltilmesiyle, aktivitesinin düştüğü görüldü. Enzimin pH 2.5'daki maksimum enzim aktivitesi ile diğer tüm pH değerlerindeki enzim aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildiğinde pH 2.0, 3.0 ve 3.5 değerlerinde başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 49, 67 ve 55'ini koruduğu saptandı.

Enzim karakterizasyonunda bir diğer parametre enzimin aktivite gösterdiği pH aralığının saptanması ve optimum pH'nın belirlenmesidir. Fitazların optimum pH'ları 2.2-8.0 arasında değişmektedir. Çoğu mikrobiyal fitazlar, özellikle de fungal orijinliler 4.5-5.6 arasında değişen optimum pH'a sahiptir. Çoğu fungal fitazlara zıt olarak *Aspergillus fumigatus* fitazı geniş bir aralıkta optimum pH'a sahiptir. Bu suşlarda pH 4.0 ve 7.3 arasında yüksek aktivite gözlenmiştir. Bazı bakteriyel fitazlar özellikle *Bacillus* suşlarından elde edilenler, 6.5-7.5 optimum pH sahiptirler (Kerovuo, 2000).



Şekil 4.19. *A. tubingensis* HBF 202 saf fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Çizelge 4.12. *A. tubingensis* HBF 202 saf fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

pH	Hacimsel aktivite (U/mL) (ORT. ±S.H.)	x	Kalan Aktivite %
1.5	224.39 ± 0.12	a	38.27
2.0	290.57 ± 1.12	a	49.56
2.5	586.23 ± 13.70	b	100.00
3.0	397.46 ± 3.24	c	67.79
3.5	327.77 ± 0.23	d	55.91
4.0	300.96 ± 22.31	e	51.33
4.5	241.06 ± 2.85	f	41.12
5.0	217.63 ± 14.23	g	37.12
5.5	184.05 ± 3.40	a	31.39
6.0	159.90 ± 6.61	a	27.27
6.5	135.52 ± 7.82	a	19.36
7.0	87.43 ± 0.03	a	14.91
7.5	68.11 ± 11.35	a	11.61
8.0	50.72 ± 12.76	a	8.65

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. S.H.: Standart hata

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

Aspergillus niger (PhyB), *A. ficuum* NRRL 3135 (Mullaney ve Ullah, 2005), *A. niger* (Vats ve Banerjee, 2004) ve *A. ficuum* (PhyB)'den (Ehrlich vd., 1993) elde edilen fitazların maksimum aktivitelerinin pH 2.5'te olduğu saptanmış olup, çalışmamızda kullanılan fitaz ile benzerlik göstermektedir. *Aspergillus niger* UAD fitazının ise pH 3.0 olduğu bildirilmiştir (Ekren, 2013).

Ancak çalışmamızdan farklı olarak başka çalışmalarda optimum pH'sı 5.0-5.5 *Aspergillus niger* NRRL 3135 fitazı (Ullah ve Gibson, 1987), pH'sı 5.0 *Aspergillus niger* 92 (Dvořáková vd., 1997), *T. lanuginosus* TL-7 (Gulati vd., 2007c) ve *Aspergillus niger* NCIM 563 (Mandviwala ve Khire 2000) fitazı ve pH'sı 5.5 *A. oryzae* fitazı (Shimizu, 1993), pH'sı 4.5 *A. terreus* fitazı (Yamada vd., 1968), pH 5.6'sı *A. carneus* fitazı ve pH 4.7 olan *A. carbonarius* fitazı (Pandey, 2001) saptanmıştır.

Aspergillus tubingensis HBF 202 fitazın optimum pH'sının 2.5 olması, enzimin endüstri açısından önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca enzimin pH 2.0-6.0 arasında aktiviteye sahip olması, sindirim kanalında fitat hidrolizi için aktif olabileceğini göstermektedir. Çünkü enzimin pH'sı 5.0-7.0 olan tükürük salgısında, midede (beslenme durumunda pH 6.5, asit salgısının uyarılması ile pH 3.5-4.5'e kadar düşmektedir) ve pH'sı 4.0-6.0 aralığında olan üst duodenum kısımlarında fitatı kolayca hidrolize etmesi için aktif olması gerekmektedir (Casey ve Walsh, 2004).

4.6.5. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisiyle ilgili sonuçlar Çizelge 4.13-4.14 ve Şekil 4.20'de gösterildi. Fitaz enzimi pH 1.5'da ilk 30 dakikada aktivitesinin % 90'nını koruduğu ve kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($p>0.05$). Ancak 30 dakikadan sonra elde edilen diğer bütün sonuçların kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü ($p<0.05$). Enzim 3. ve 4. saatlerde başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 64 ve 62' sini koruduğu, aralarındaki farkın ise istatistiksel olarak önemsiz olduğu görüldü ($p>0.05$). İnkübasyonun 8. ve 16. saatlerde ise başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 56 ve 51' sini koruduğu aralarındaki farkın ise istatistiksel olarak önemsiz olduğu görüldü ($p>0.05$).

Fitaz enzimi pH 2.0'da ilk üç saatte aktivitesinin % 81'ini koruduğu saptandı. Enzim 4. ve 8. saatlerde başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 78 ve 76'sını koruduğu, aralarındaki farkın ise istatistiksel olarak önemsiz olduğu görüldü ($p>0.05$). İnkübasyonun 16. saatinden itibaren enzim aktivitesinin % 70'inden fazlasını, 24 saat sonra aktivitesinin % 63'ünü koruduğu saptandı.

Fitaz enzimi pH 2.5 de ilk 8 saatte aktivitesinin % 92'sini koruduğu ve kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($p>0.05$). İnkübasyonun 16. saatinden itibaren enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak azalma göstermesine rağmen, yirmidört saat sonra aktivitesinin % 85'ini koruduğu görüldü.

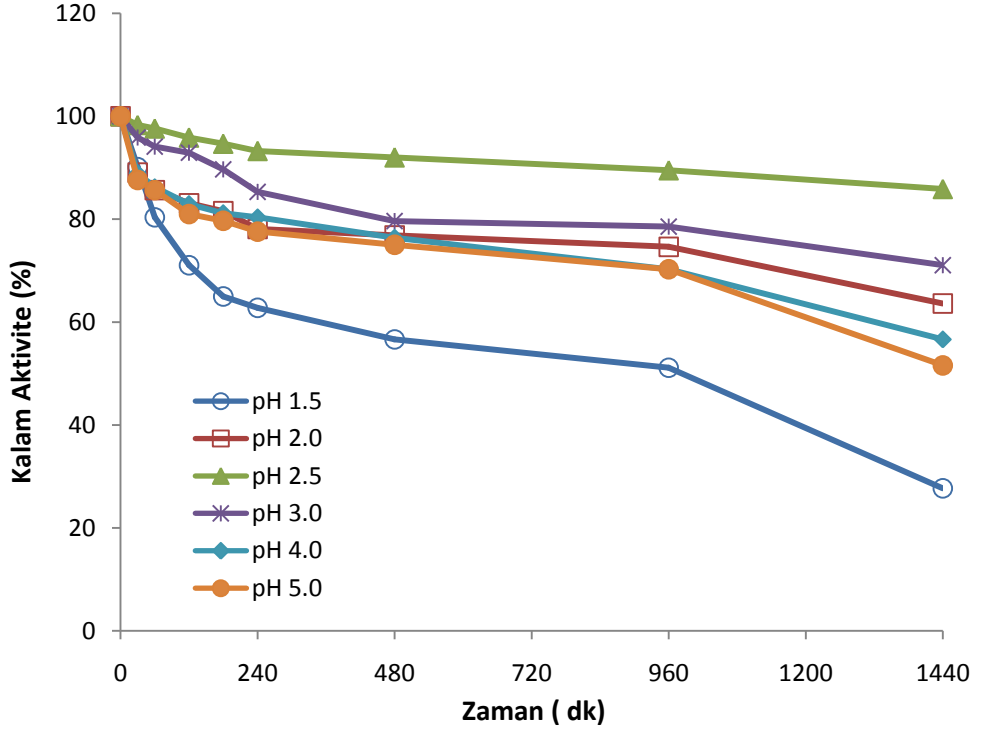
Fitaz enzimi pH 3.0'da ilk dört saatte aktivitesinin % 85'ini koruduğu ve kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($p>0.05$). İnkübasyonun 8. saatinden itibaren enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak azalma göstermesine rağmen, yirmidört saat sonra aktivitesinin % 70'ini koruduğu saptandı.

Fitaz enzimi pH 4.0'da inkübasyonuna bırakıldığında ilk 30 dakikada aktivitesinin % 88'ini koruduğu ve bütün sonuçların kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü ($p<0.05$). İnkübasyonun 4. saatinden itibaren enzim aktivitesinin % 80'ini koruduğu saptandı. Enzimin 24 saatlik inkübasyonu sonucu aktivitesinin % 56'sını koruduğu görüldü.

Fitaz enzimi pH 5.0'da inkübasyonuna bırakıldığında ilk 30 dakikada aktivitesinin % 87'ini koruduğu ve bütün sonuçların kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü ($p<0.05$). Enzim 16. ve 24. saatlerde sırasıyla başlangıç aktivitesinin % 70 ve 51'ini koruduğu saptandı.

Vohra ve Satyanarayana, (2002) *Pichia anomala* fitazının pH 4'de oda sıcaklığında 6 gün stabil olduğunu saptamışlardır. *Aspergillus oryzae* AK9 mikroorganizmasından elde edilen ham fitaz enzimi 2.0-3.6 ile 5.0-7.0 pH aralıklarında 2 saat boyunca stabildir (Chantasartasamee vd., 2005). *Candida krusei* WZ-001 fitazının pH 2.0-5.0 aralığında aktivitesinin % 80'ini koruyarak stabil olduğu bildirilmiştir (Kim vd., 2003). *Penicillium simplicissimum* W46 fitazının optimum pH'ının 4.0 olduğu enzimin pH 7.5 ve üzerindeki değerlerde ise

inaktif olduğu saptanmıştır. Enzimin pH 3.5-6.0 aralığında 7 gün boyunca stabil olduğu belirlenmiştir (Quan vd., 2002).



şekil 4.20. *A. tubingensis* HBF 202 fitaz stabilitesi üzerine pH'nın etkisi

Çizelge 4.13. *A. tubingensis* HBF 202 fitaz stabilitesi üzerine pH'nın etkisi

İnkübasyon Zamanı	pH 1.5			pH 2.0			pH 2.5		
	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %
Kontrol	425.60 ± 19.25	a	100	425.60 ± 19.25	a	100	425.60 ± 19.25	a	100
30 dk	383.57 ± 11.68	a	90.12	378.99 ± 8.25	b	89.05	418.36 ± 5.41	a	98.30
1 saat	342.29 ± 0.87	b	80.36	364.49 ± 19.65	b	85.64	415.46 ± 0.34	a	97.62
2 saat	302.41 ± 12.51	c	71.05	353.62 ± 5.98	b	83.09	407.97 ± 3.75	a	95.86
3 saat	276.57 ± 1.21	d	64.98	347.10 ± 1.25	b	81.56	402.90 ± 0.64	a	94.67
4 saat	267.14 ± 3.56	d	62.77	332.37 ± 19.56	c	78.09	396.86 ± 2.22	a	93.25
8 saat	241.06 ± 7.12	e	56.64	327.05 ± 5.87	c	76.85	391.55 ± 28.65	a	92.00
16 saat	217.63 ± 9.67	e	51.13	317.63 ± 12.25	c	74.63	380.92 ± 14.54	b	89.50
24 saat	117.87 ± 3.86	f	27.69	270.77 ± 7.53	d	63.62	365.46 ± 21.62	b	85.87

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata **x:** Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.14. *A. tubingensis* HBF 202 fitaz stabilitesi üzerine pH'nın etkisi

İnkübasyon Zamanı	pH 3.0			pH 4.0			pH 5.0		
	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %
Kontrol	425.60 ± 19.25	a	100	425.60 ± 19.25	a	100	425.60 ± 19.25	a	100
30 dk	407.97 ± 9.32	a	95.86	378.26 ± 5.61	b	88.88	372.95 ± 21.54	b	87.63
1 saat	400.48 ± 0.22	a	94.10	366.91 ± 0.33	b	86.21	364.49 ± 33.12	b	85.64
2 saat	395.41 ± 5.12	a	92.91	352.90 ± 7.77	b	82.92	344.69 ± 16.32	b	80.99
3 saat	381.64 ± 0.15	a	89.67	345.41 ± 1.21	b	81.16	339.13 ± 12.10	c	79.68
4 saat	363.04 ± 0.08	a	85.30	342.03 ± 34.12	c	80.36	330.19 ± 18.01	c	77.58
8 saat	338.89 ± 12.71	b	79.63	325.12 ± 12.59	c	76.39	319.32 ± 6.38	c	75.03
16 saat	334.30 ± 3.81	b	78.55	299.03 ± 6.89	c	70.26	299.03 ± 10.94	c	70.26
24 saat	302.42 ± 2.45	b	71.06	241.06 ± 3.32	d	56.64	219.57 ± 1.95	d	51.59

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata **x:** Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.6.6. Enzim Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Enzim ve substrat farklı zaman aralıklarında inkübasyona bırakıldıklarında ilk 20 dakikada enzim aktivitesi zamana bağlı olarak doğrusal artmaktadır (Şekil 4.21 ve Çizelge 4.15). Ancak inkübasyon zamanının artışı ile enzim aktivitesi doğrusallıktan sapmaktadır. Bu nedenle standart enzim aktivite deneyleri 20 dakikalık inkübasyonlarda yapıldı.

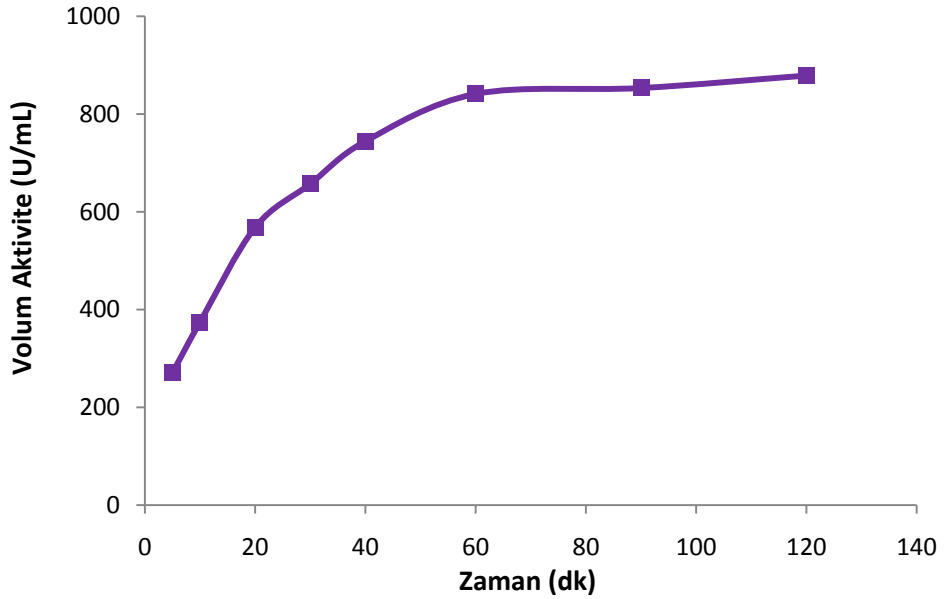
Zaman, enzim aktivitesinin ölçülmesinde önemli bir faktördür. Çünkü reaksiyon hızı belirli bir zamanda üretilen ürün miktarı ile belirlenir. Aktivite tayininin doğru tespiti için, oluşan ürünün linear olduğu bir noktada enzim aktivitesinin tayininin yapılması gerekmektedir. *A. tubingensis* HBF 202 fitazı ve substrat farklı sürelerde inkübe edildiğinde oluşan ürün miktarı zamana bağlı olarak artış gösterdi. Bununla birlikte ilk 20 dakikalık artışın doğrusal olduğu tespit edildi ve bu süre, inkübasyon süresi olarak seçildi. *Aspergillus niger* UA-D (Ekren, 2013), *A. ficuum* (Ullah, 1988) ve *Cryptococcus laurentii* ABO510 (Staden vd., 2007) fitazlarının aktivite tayininde, inkübasyon süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.15. Fitaz aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

Zaman (dk)	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. $\pm$ S.H.)	x
5	271.01 $\pm$ 5.86	a
10	374.39 $\pm$ 1.79	ab
20	568.11 $\pm$ 0.94	c
30	657.24 $\pm$ 1.09	d
40	744.20 $\pm$ 1.07	e
60	841.30 $\pm$ 5.22	f
90	853.38 $\pm$ 16.14	f
120	878.74 $\pm$ 6.56	f

ORT.: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).



Şekil 4.21. *A. tubingensis* HBF 202 fitaz aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

4.6.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

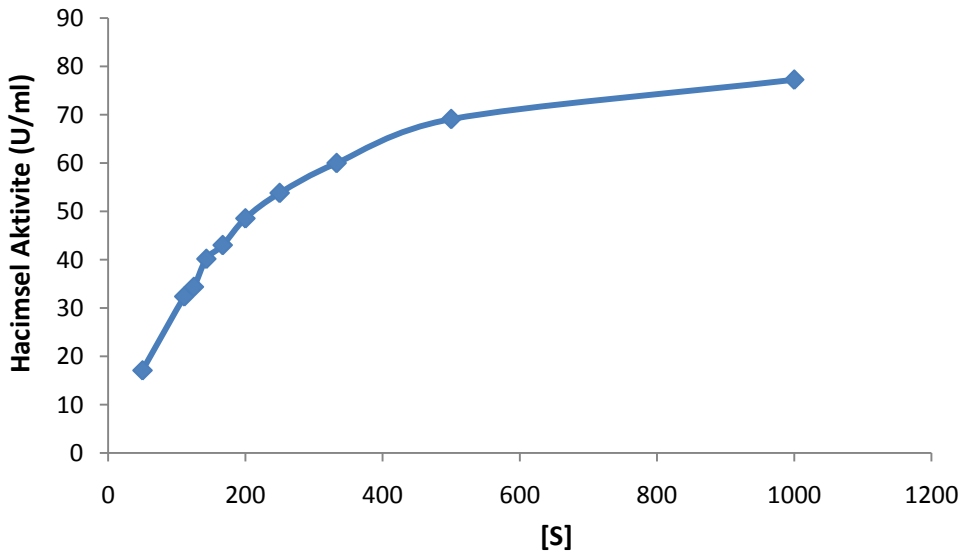
Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi sabit inkübasyon süresinde, optimum sıcaklık ve pH'da (60 °C ve pH 2.50) farklı konsantrasyonlarda (50-1000 μ M) substrat sodyum fitat kullanılarak, enzim aktivitesi standart deney koşullarında ölçüldü (Çizelge 4.16).

Substrat konsantrasyonunun 50 μ M'dan 1000 μ M'a kadar belli bir oranda artırılması ile enzim aktivitesinde kademeli olarak arttığı görüldü. Substrat konsantrasyonuna karşı enzim aktivite grafiği çizildiğinde enzimin Michaelis-Menten kinetiği izlediği görülmektedir (Şekil 4.22). Fitazın maksimum hızını (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitesini (K_m) saptamak için, $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ olarak Lineweaver- Burk $y = ax + b$ doğru grafiğinden yararlanıldı. Lineweaver-Burk grafiği, $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ olarak çizildi (Şekil 4.23). Bu grafiğin doğru denklemi ise, $y = 2.4325 + 0.0091$ olarak, tamamlayıcılık katsayısı (R^2) ise 0.9956 bulundu. Denklemden doğrunun dikey eksenini kestiği nokta $1/V_{max} = 0,0091$ değerini verdiğinden, V_{max} değeri 109.89 U/mL olarak hesaplandı. Doğrunun yatay eksenini kestiği nokta ise, $-1/K_m = -0.003743$ değerinde olup, K_m değeri 267 μ M olarak bulundu.

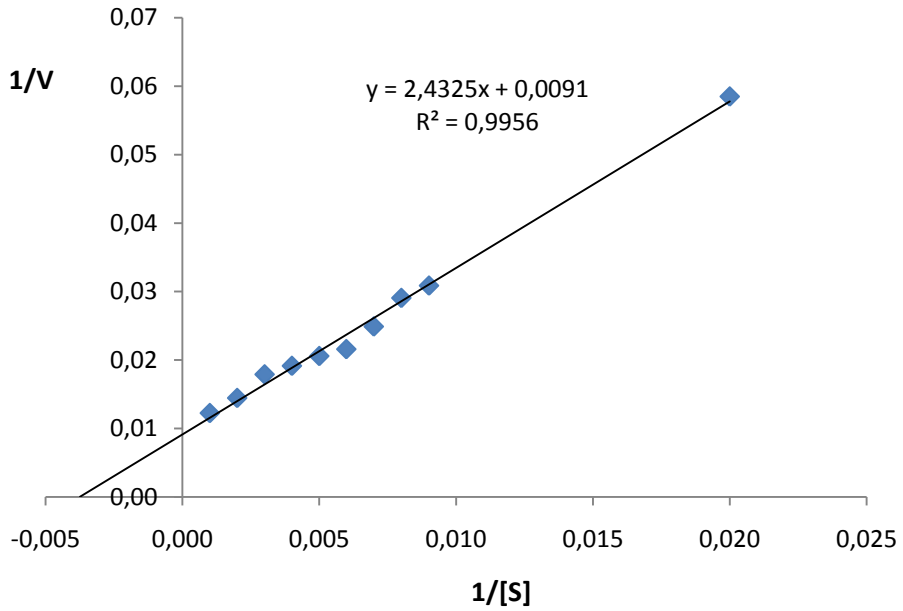
Çizelge 4.16. *A. tubingensis* HBF 202 fitaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Substrat Konsantrasyonu (μM)	Hacimsel aktivite (U/mL) (ORT. $\pm$ S.H.)	x
50	17.09 ± 0.84	a
111	32.38 ± 1.14	b
125	34.39 ± 2.12	b
143	40.15 ± 1.43	bc
167	43.00 ± 0.34	bc
200	48.55 ± 1.81	bc
250	53.81 ± 0.48	cd
333	60.00 ± 0.01	cd
500	69.10 ± 0.06	d
1000	72.24 ± 1.12	e

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata. **x:** Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).



Şekil 4.22. *A.tubingensis* HBF 202 fitaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Michaelis-Menten Grafiği)



Şekil 4.23. *A. tubingensis* HBF 202 fitaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk Grafiği)

A. tubingensis HBF 202'nin fitaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde, enzimatik reaksiyonun birinci dereceden (first-order) bir kinetik gösterdiği belirlendi. Ancak, 500 μM substrat konsantrasyonundan sonra aktivitenin artık daha fazla artmadığı ve sabit kaldığı görüldü. Bu da enzimin substratına karşı doygun hale geldiğini ve maksimum hızla çalıştığını göstermektedir. Bu durumda enzimatik reaksiyon sıfırıncı dereceden (zero-order) bir kinetik gösterdiği bulundu. Fitazların hidroliz hızı kullanılan substrat konsantrasyonu bağlıdır ve klasik bir Michaelis-Menten kinetiği göstermektedir (Vats ve Banerjee, 2004) .

Aspergillus tubingensis HBF 202 fitazından elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında K_m değeri 21 μM olan *Cryptococcus laurentii* ABO 510 fitazı (Staden vd.,2007), K_m değeri 30 μM olan *Candida krusei* WZ-001 fitazı (Quan vd., 2001), K_m değeri 200 μM olan *Pichia anomala* fitazı (Vohra ve Satyanarayana, 2002), K_m değeri 156 μM olan *Sporotrichum thermophile* fitazı (Singh ve Satyanarayana, 2009) ve K_m değeri 117 μM olan *Zea mays* (Laboure vd., 1993) fitazından yüksektir ve bu enzimlere göre sodyum fitata ilgisi düşüktür. Ancak, K_m değeri 606 μM olan *A.niger* van Teighem fitazı (Vats ve Banerjee, 2005), K_m

değeri 295 μM olan *Aspergillus ficuum* NTG-23 fitazı (Zhang vd., 2010) ve K_m ve $V_{\max}$ değeri sırasıyla 4.7 mM ve 49.01 $\mu\text{mol/dk/mg}$ olan *Bacillus licheniformis* PFBL-03 fitazından (Fasimoye vd., 2014) ise düşük olup bu enzimlere göre daha düşük substrat konsantrasyonlarında bile aktiftir.

4.6.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini incelemek için, enzim 1 mM, 5 mM ve 10 mM final konsantrasyonlarda AlCl_3 , BaCl_2 , CaCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 , FeCl_3 , KCl , LiCl , MgCl_2 , MnCl_2 , NaCl , NH_4Cl , NiCl_2 , PbCl_2 , ZnCl_2 metal iyonları ve EDTA içeren deney ortamlarında 60 °C'lik su banyosunda 20 dakika inkübe edildi ve aktivite tayini yapıldı.

Metal iyonları ve EDTA içermeyen deney ortamı kontrol olarak kabul edilip, aynı koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlendi (Çizelge 4.17; Şekil 4.24).

Aspergillus tubingensis HBF 202 fitazı, 1 mM Pb^{2+} iyonu varlığında ciddi bir inhibisyona uğrayarak kontrole göre aktivitesinin ancak % 44'ünü koruyabildiği saptandı. 5 ve 10 mM konsantrasyonlarda ise aktivitenin sırasıyla % 28 ve 13'ünün korunabildiği bulundu. *A. tubingensis* HBF 202 fitazında Pb^{2+} iyonlarının substrat bağlama bölgesi ve katalitik merkezinde görev alan amino asitlerle etkileşerek katalitik bölge ve substratın arasındaki elektriksel dengeyi bozduğu ve inhibisyona neden olduğunu öne sürebiliriz. Çalışmamızda elde edilen verilere benzer şekilde *A.niger* UA-D 1 mM Pb^{2+} iyonu varlığında dahi ciddi bir inhibisyona uğramıştır (Ekren, 2013). Ancak *Aspergillus ficuum* NTG-23 fitazı 1.25 mM, 2.5 mM, 5 mM ve 10 mM Pb^{2+} iyonunun varlığında aktivitesini koruduğu saptanmıştır (Zhang vd, 2010). *Selenomonas ruminantium* JY35 fitazının aktivitesi üzerinde 5 mM Pb^{2+} iyon varlığında enzim aktivitesinde yaklaşık % 50 bir artış gözlenmiştir (Yanke vd.,1999).

Fe^{2+} 'nin 1 mM varlığında dahi *A. tubingensis* HBF 202 fitazı tamamen inhibisyona uğradı. Bu inhibisyon, enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen Fe-fitat kompleksinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu düşünce Wang vd., (2004) tarafından fitaz aktivitesi üzerine mineral iyonların inhibisyon etkisi fitatın güçlü bir şelatlayıcı olmasından dolayı çözünmez metal-fitat kompleksleri oluşur ve

böylece enzim tarafından kullanılabilen fitat miktarı azalır açıklaması ile desteklenmektedir.

Enzim Al^{3+} ün 1 mM konsantrasyonunda kontrale göre aktivitesinde % 40'lık kayıp saptandı. 5 ve 10 mM konsantrasyonlarında ise enzim aktivitesinde inhibisyona neden olduğu belirlendi. Kontrol grubuyla aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Çalışmamıza benzer olarak, *A.niger* UA-D fitazı 1 mM Al^{3+} varlığında aktivitesinin % 52'sini koruyabilmiştir (Ekren, 2013). *Sporotrichum thermophile* fitazı 1 mM Al^{3+} varlığında aktivitesinin % 72'ini koruyabilmiştir (Singh ve Satyanarayana, 2009) *Cladosporium* sp. FP-1 fitazı 1 mM Al^{3+} varlığında aktivitesinin ancak % 50'ini koruyabilmiştir (Quan vd., 2004).

Cu^{2+} iyonunun 1 ve 5 mM konsantrasyonunda aktivitesinin % 93 ve % 70'ünü koruyabilmiştir. 10 mM konsantrasyonda fitaz aktivitesi azalmış (% 60) olup kontrol grubuyla aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Vohra ve Satyanarayana (2002) *P. anomala* fitazının 1 mM Cu^{2+} katyonu varlığında inhibe olduğunu saptamışlardır. *Citrobacter braakii* fitazı, çok düşük Cu^{2+} konsantrasyonlarda dahi, güçlü bir şekilde inhibasyona uğradığı saptanmıştır.

Ba^{2+} iyonunun 1 mM'lık konsantrasyonunda enzim aktivitesinde fazla etkisinin olmadığı, kontrol grubu ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulundu ($p > 0.05$). Ba^{2+} iyonunun 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarında enzim aktivitesinde sırasıyla % 62 ve 84'lük artış saptandı. *Aspergillus niger* UA-D (Ekren, 2013), *Pichia anomala* (Vohra ve Satyanarayana, 2002) ve *Candida krusei* WZ-001 (Quan vd., 2002) fitaz enzimlerinin aktivitesi üzerine 1 mM Ba^{2+} katyonunun bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Li^+ iyonları, denen tüm konsantrasyonlarında (1 mM, 5 mM ve 10 mM) enzim aktivitesi üzerinde artış gösterdi ve enzim aktivitesinde meydana gelen bu artışın kontrol ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p > 0.05$). Çalışmamıza benzer olarak Li^+ iyonunun 1 mM, 5 mM ve 10 mM'luk konsantrasyon varlığında *Aspergillus niger* UA-D fitazının aktivitesini artırdığı saptanmıştır (Ekren, 2013). Ancak *Cryptococcus laurentii* ABO 510'dan elde edilen fitazın 1 mM ve 5 mM Li^+ varlığından etkilenmediği belirlenmiştir (Staden vd., 2007).

Ca^{2+} ve Co^{2+} iyonlarının 1 ve 5 mM'lık konsantrasyonları aktiviteyi arttırdığı ve kontrol grubu ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.05$). Ca^{2+} ve Co^{2+} iyonlarının 10 mM'lık konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin sırasıyla % 72 ve 48'ini koruduğu saptandı ve kontrol grubu ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.05$). Vohra ve Satyanarayana, (2002) tarafından yapılan çalışma da *Pichia anomala* fitazının aktivitesi üzerine 1 mM Co^{+2} ve Ca^{+2} katyonlarının bir etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Mg^{2+} , Mn^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının 1mM'lık konsantrasyonları enzim aktivitesini sırasıyla % 29, 41 ve 15 oranında aktive ederken, artan konsantrasyonlarda inhibisyona neden olup 5 ve 10 mM konsantrasyonlarında geriye kalan enzim aktivitesi sırasıyla Mg^{2+} için % 121 ve 81, Mn^{2+} için % 74 ve 31, Zn^{2+} için % 52 ve 9 olarak saptandı. Kontrol grubuyla aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.05$). Greiner vd., (1997) tarafından yapılan çalışmada *Klebsiella terrigena* fitazının aktivitesi üzerine Mg^{2+} iyonlarının önemli bir etkisinin olmadığı, Mn^{2+} iyonlarına karşı aktivitesini büyük oranda koruduğu ve Zn^{2+} iyonları tarafından ise kuvvetle inhibe edildiği bildirilmiştir.

Ni^{2+} iyonunun 1 ve 5 mM'lık konsantrasyonları aktiviteyi arttırdığı ve kontrol grubu ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.05$). Enzimin 10 mM'lık Ni^{2+} iyonunu varlığında aktivitesinde yalnızca % 17'lik bir azalma saptandı ve kontrol ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$). Ekren, (2013) tarafından yapılan çalışmada Ni^{2+} iyonunun 1 ve 5 mM'lık konsantrasyonları enzimde sırasıyla % 22 ve 24 oranında aktivite ederken, 10 mM Ni^{2+} iyonunun varlığında aktivite de yalnızca % 3'lük bir azalma saptanmıştır. *Citrobacter braakii* fitazının metal iyonları ile 37 °C'de 2 saat inkübasyonun ardından 10 mM'a kadar Ni^{2+} katyonunun aktivite üzerine bir etkisinin olmadığı bulunmuştur (Kim vd., 2003).

Na^+ ve NH_4^+ iyonlarının her üç konsantrasyonunda enzim aktivitesinde aktivasyona neden olduğu ancak, Na^+ için bu değişimin önemli bir değişiklik olmayıp, kontrol ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunurken ($p>0.05$), NH_4^+ için değişimin önemli olup kontrol ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Elde edilen sonuçlarımıza

paralel olarak *Citrobacter braakii* fitazının 10 mM'a kadar Na⁺ katyonunun aktivite üzerine bir etkisinin olmadığı bulunmuştur (Kim vd., 2003).

Enzim aktivitesinde artışa neden olan bu iyonların ya enzimin yapısında bulunan negatif yüklü yan zincirlere sahip amino asitlere bağlanıp enzimin konformasyonunu değiştirerek yapısını stabilize ettiği yada substrata bağlanarak reaksiyon için onun doğru yönelimini sağladığını söyleyebiliriz.

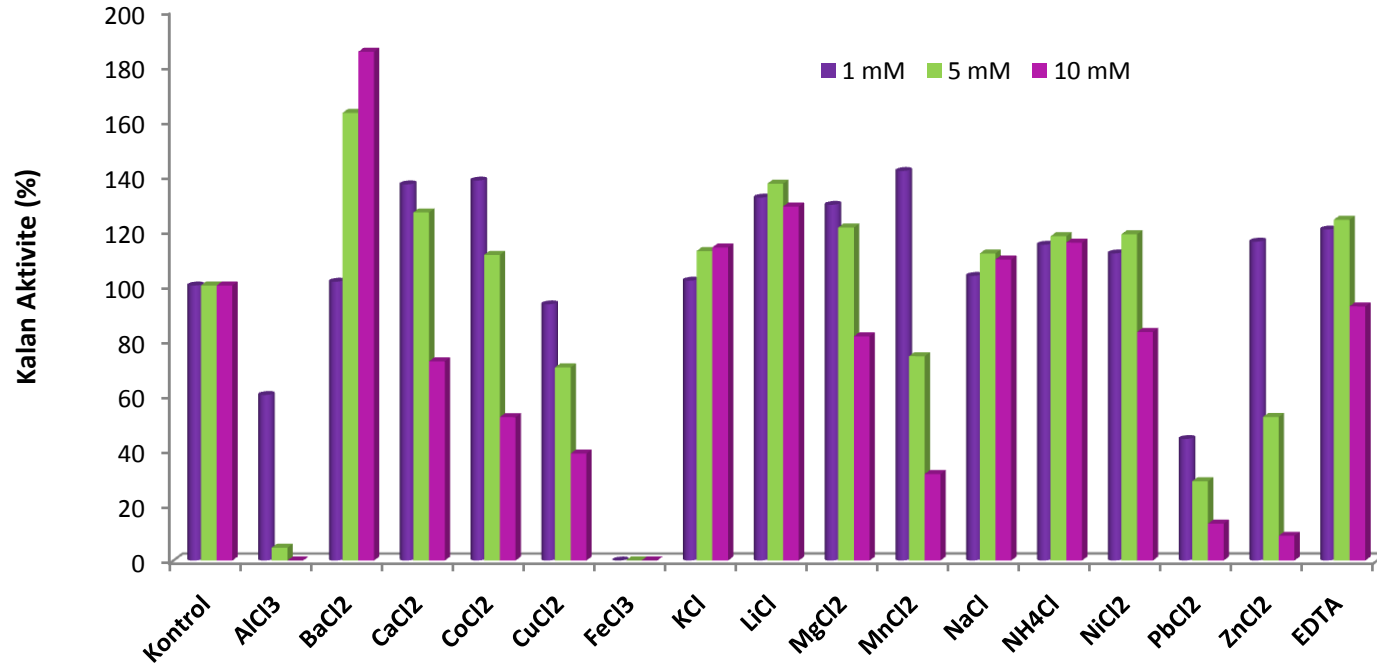
K⁺ iyonu her üç konsantrasyonunda enzim aktivitesinde önemli bir değişiklik saptanmadı ve kontrol ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p < 0.05$).

Aspergillus tubingensis HBF 202 fitazının 1 ve 5 mM EDTA varlığında aktivitesinde sırasıyla % 20 ve % 23 oranında artış saptandı. 10 mM'lık konsantrasyonunda ise aktivitenin % 92'sinin korunduğu ve kontrol grubu ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü ($p > 0.05$). *Aspergillus ficuum* NTG-23 fitazı 10 mM dan 1.25 mM azalan konsantrasyonlarda % 11.6 - % 7.5 'lik bir aktivasyon saptanmıştır (Zhang, vd., 2010). *Sporotrichum thermophile* fitazı 1 mM ve 5 mM EDTA varlığında inhibe olmadığı saptanmıştır (Singh ve Satyanarayana, 2009). Enzimin EDTA tarafından inhibe edilmemesi fitaz aktivitesi için bir metal iyonuna ihtiyacı olmadığını yani metalloenzim olmadığını göstermektedir.

Çizelge 4.17. *A.tubingensis* HBF 202 fitaz aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA' nın etkisi

Metal İyonları	1mM			5 mM			10 mM		
	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %
Kontrol	760.60 ± 3.21	a	100.00 ±	760,60 ± 3.21	a	100.00	760.60 ± 3.21	a	100.00
AlCl ₃	457.84 ± 0.43	b	60.20	35.44 ± 4.58	b	4.66	0.00 ± 0.00	b	0.00
BaCl ₂	771.13 ± 12.89	a	101.38	1237.89 ± 2.78	b	162.75	1407.07 ± 8.81	b	184.99
CaCl ₂	1040.30 ± 7.23	b	136.77	962.71 ± 0.58	b	126.57	551.08 ± 12.12	b	72.45
CoCl ₂	1050.83 ± 3.19	b	138.16	845.31 ± 4.58	b	111.14	396.69 ± 0.77	b	52.16
CuCl ₂	708.47 ± 6.34	b	93.15	534.04 ± 19.33	b	70.21	295.94 ± 4.23	b	38.91
FeCl ₃	0.00 ± 0.00	b	0.00	0.00 ± 0.00	b	0.00	0.00 ± 0.00	b	0.00
KCl	774.14 ± 3.58	a	100.78	855.84 ± 12.67	a	112.52	865.86 ± 1.67	a	113.84
LiCl	1003.71 ± 4.51	b	131.96	1042.31 ± 3.40	b	137.04	979.15 ± 7.19	b	128.73
MgCl ₂	983.66 ± 21.12	b	129.33	921.00 ± 9.21	b	121.09	620.25 ± 2.22	b	81.55
MnCl ₂	1077.39 ± 3.33	b	141.65	565.11 ± 7.44	b	74.30	239,30 ± 0.04	b	31.46
NaCl	787.17 ± 0.03	a	103.49	849.32 ± 13.76	a	111.66	832.78 ± 4.09	a	109.49
NH ₄ Cl	873.38 ± 4.12	b	114.83	896.94 ± 0.05	b	117.93	879.40 ± 0.78	b	115.62
NiCl ₂	849.32 ± 19.32	b	111.66	902.46 ± 0.08	b	118.65	632.28 ± 7.52	b	83.13
PbCl ₂	336.04 ± 21.91	b	44.18	219.25 ± 22.12	b	28.83	101.95 ± 3.51	b	13.40
ZnCl ₂	881.90 ± 2.11	b	115.95	397.19 ± 11.98	b	52.22	68.45 ± 12.09	b	9.00
EDTA	915.49 ± 2.44	b	120.36	942.56 ± 5.67	b	123.92	702.96 ± 23.09	b	92.42

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata. **x:** Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0.05)



Şekil 4.24. *A. tubingensis* HBF 202 fitaz aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA' nın etkisi

4.6.9. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin ve Denatürantların Etkisi

Serin inhibitörü olan PMSF ve sistein spesifik inhibitörü ve sülfidril oksitleyici bir ajan olan DTNB'nin 1 mM konsantrasyonunda yaklaşık % 34-52 oranında inhibisyona gözlendi. PMSF ve DTNB'nin 5 mM konsantrasyonunda, protein denatürantı olan SDS, triptofan inhibitörü olan NBS, arjinin inhibitörü olan 2,3-bütandion, fitaz enzimlerinin hidroliz ürünü olan fosfatın substrat analogu olan sodyum molibdat ve amonyum vanadat'ın ise 1 ve 5 mM konsantrasyonlarında enzimin çok yük oranlarda (~% 94) inhibe olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlarla ilgili veriler Çizelge 4.18 ve Şekil 4.25'de gösterilmiştir. PMSF'nin inhibisyona neden olması, enzimin aktif merkezinde serin amino asidinin olabileceğini, DTNB sistein amino asidinin, NBS ile inhibisyonu triptofan ve 2,3-bütandion'un inhibisyonu enzimin aktif merkezinde katalizden sorumlu bir arjinin amino asidinin olabileceğini düşündürmektedir.

Elde edilen sonuçlarımıza benzer şekilde *Candida krusei* WZ-001 (Quan vd., 2002) fitazının ve *A. niger* UA-D fitazının (Ekren, 2013) PMSF tarafından kuvvetle inhibe edildiği bildirilmiştir bu nedenle aktif bölgede serin amino asidinin bulunduğunu ileri sürmüşler. Buna karşın *Sporotrichum thermophile* fitazın 1 ve 5 mM PMSF varlığında sırasıyla % 87 ve 72 oranında aktivitesini koruduğu saptandı (Singh ve Satyanarayana, 2009). *Pichia anomala* fitazı 1 mM serin inhibitörü olan PSMF tarafından inhibe edilmediği bildirilmiştir (Vohra ve Satyanarayana, 2002). Bir protein denatürantı olan SDS'nin 1 ve 5 mM konsantrasyonlarında % 90 dan fazla denatürasyon görüldü. Elde edilen sonuçlarımıza benzer şekilde *Sporotrichum thermophile* fitazı da SDS'ye karşı çok fazla dayanıklı olmayan bir enzimdir, % 0.1'lik SDS tarafından kuvvetle inhibe edilmiştir. Ancak 1 ve 5 mM NBS varlığının enzim aktivitesi üzerinde bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Singh ve Satyanarayana, 2009). *A. niger* UA-D fitazının (Ekren, 2013), *Pichia anomala* fitazının (Vohra ve Satyanarayana, 2002) ve *A. ficuum* fitazının (Tang vd., 2006) 2,3- bütanedion tarafından kuvvetle inhibe edilmiştir ve bu nedenle aktif bölge arjinin amino asidinin bulunduğu ileri sürülmüştür.

Diğer bir fitaz inhibitörü olan florür 1 ve 5 mM konsantrasyonlarda % 25 ve 75 enzim aktivitesini azalttığı görüldü. Greiner vd., (2009) *Aspergillus niger* 11T53A9

fitazının farklı kaynaklardan izole edilen farklı fitazların inhibitörü olan F^{-1} , ve ayrıca molibdat ve vanadat tarafından kuvvetli bir şekilde inhibe edildiği saptanmıştır.

İndirgeyici ajan olan glutatyon varlığında enzim 1 ve 5 mM konsantrasyonlarında sırasıyla % 6 ve 38 aktivite kaybına neden oldu. Borik asit 1 mM da enzim aktivitesinde artışa neden olurken, 5 mM konsantrasyonunda enzim aktivitesinde bir etkisi olmamış ve kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p > 0.05$). Diğer bir katotropik ajan olan oksalik asitin ve sitratın 1 mM konsantrasyonu aktivite üzerinde hiçbir etkisi olmadı. Bu katotropik ajanların 5 mM konsantrasyonları ise, enzim aktivitesinde ciddi bir inhibisyon meydana gelmiştir.

A.tubingensis HBF 202 fitazından elde edilen sonuçlarımıza benzer şekilde *Citrobacter braakii* fitazının 2-mercaptoethanol ve 1,4- dithiothreitol (DTT) tarafından inhibe edilmediği bildirilmiş ve bu nedenle enzimin aktivitesinde molekül içi disülfid köprülerinin etkisinin olmadığı ileri sürülmüştür (Kim vd., 2003). Buna karşın *Candida krusei* WZ-001 fitazının sülfidril grubu inhibitörleri olan pCMB ve iyodasetat tarafından inhibe edildiği fakat 2-merkaptoeranol ve DTT tarafından ise stimüle edilmesi enzimin aktif merkezinde -SH gruplarının bulunduğunu göstermektedir şeklinde açıklanmıştır (Quan vd., 2002).

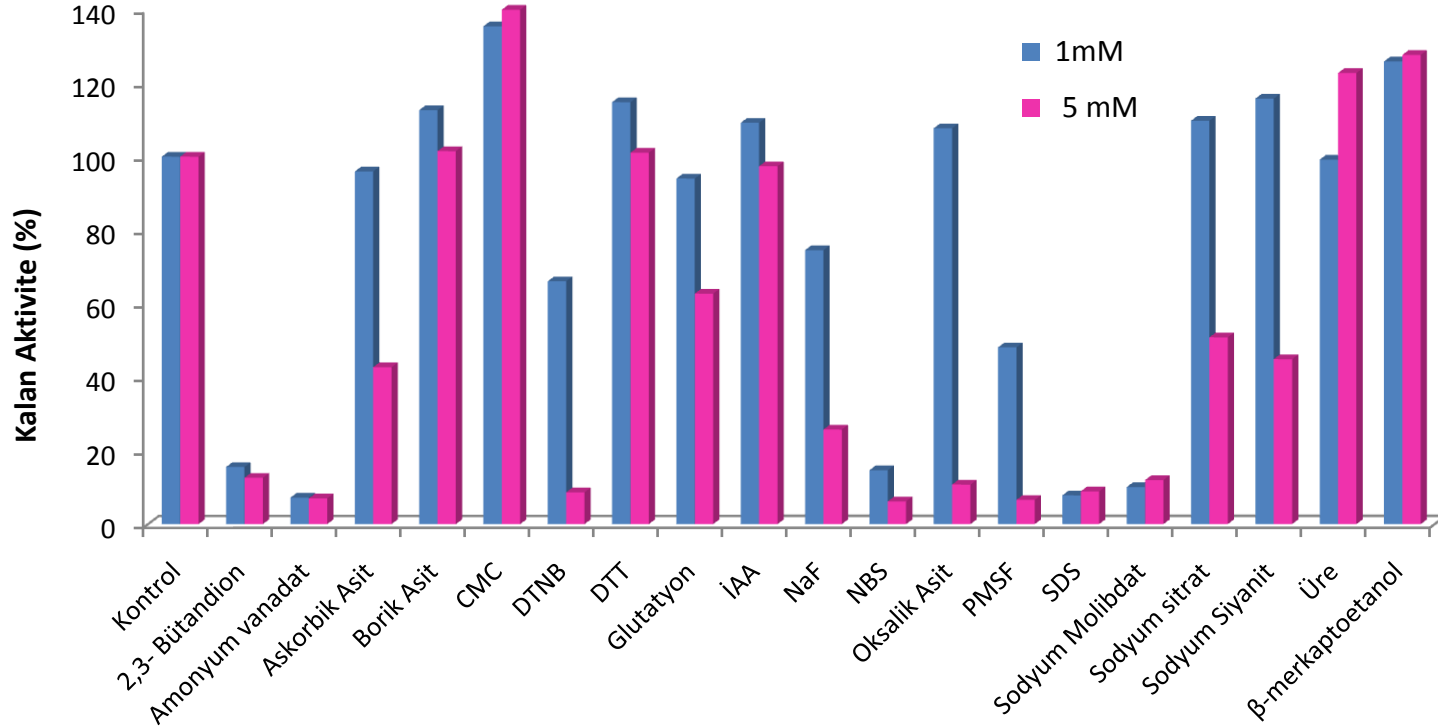
Protein denaturantı olan üre ve sodyum siyanit varlığında ise fitaz enzimi 1 mM üre varlığında aktivitesinin neredeyse tamamını korurken, siyanit varlığında ise başlangıç aktivitesine göre % 15'lik bir artış saptandı ve siyanitin konsantrasyonu 5 mM'a arttırıldığında ise enzim aktivitesinin ancak % 45'ini koruduğu saptandı. Ancak, aynı orandaki üre enzimi % 22 oranında artırmıştır.

Karboksil grubu inhibitörü olan CMC, enzim üzerinde 1 ve 5 mM konsantrasyonlarında sırasıyla % 35 ve 68 oranında aktivasyona yol açtığı saptandı. Enzimin aktif bölgesinde karboksil grubunun yer almadığını veya katalizden sorumlu olmadığını söyleyebiliriz. Enzim aktivitesindeki artışı, muhtemelen CMC enzimin aktif merkezi dışında karboksil gruplarına bağlanarak enzimin yapısında bir esnekliğe neden olarak enzimin substrat bağlanma yeteneğini arttırmış olabileceğinden kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.18. *A.tubingensis* fitaz aktivitesi üzerine inhibitörlerin ve denatürantların etkisi

İnhibitörler	1 mM			5 mM		
	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	Kalan Aktivite %
Kontrol	549.77 ± 0.46	a	100.00	549.77 ± 0.46	a	100.00
2,3-Bütadion	85.49 ± 0.08	b	15.55	69.32 ± 0.21	b	12.61
Amonyum vanadat	39.62 ± 8.12	b	7.21	38.49 ± 8.89	b	7.00
Sodyum molibdat	55.41 ± 0.07	b	10.08	65.93 ± 3.12	b	11.99
NBS	80.60 ± 17.12	b	14.66	33.98 ± 0.12	b	6.18
SDS	43.01 ± 8.34	b	7.82	49.02 ± 9.21	b	8.92
PMSF	264.44 ± 0.55	b	48.10	36.24 ± 13.25	b	6.59
DTNB	363.31 ± 0.99	b	66.08	47.51 ± 7.34	b	8.64
Oksalik asit	592.26 ± 0.87	a	107.73	59.17 ± 3.21	b	10.76
NaF	409.92 ± 22.21	b	74.56	141.50 ± 0.44	b	25.74
Askorbik Asit	527.59 ± 4.12	a	95.97	234.73 ± 5.16	b	42.70
Sodyum siyanit	636.62 ± 9.76	b	115.80	246.76 ± 3.64	b	44.89
Borik asit	619.32 ± 9.12	b	110.65	558.04 ± 8.16	a	101.51
CMC	744.89 ± 0.21	b	135.49	925.71 ± 16.12	b	168.38
Sodyum sitrat	603.53 ± 16.98	a	109.78	279.47 ± 0.08	b	50.83
DTT	631.35 ± 7.12	b	114.84	555.78 ± 5.12	a	101.09
Glutasyon	517.07 ± 6.55	a	94.05	344.88 ± 0.77	b	62.73
İAA	600.53 ± 13.55	b	109.23	535.48 ± 0.54	a	97.40
ÜRE	545.26 ± 6.12	a	99.18	674.96 ± 1.89	b	122.77
β-merkaptöetanol	692.26 ± 20.12	b	125.92	702.03 ± 5.81	b	127.70

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata. **x:** Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0.05)



Şekil 4.25. *A.tubingensis* HBF 202 fitaz aktivitesi üzerine inhibitörlerin ve denatürantların etkisi

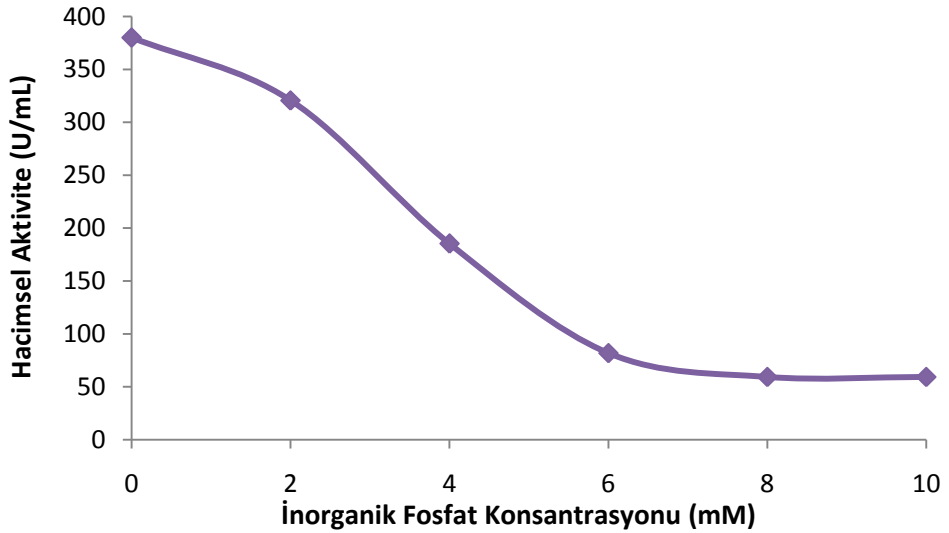
4.6.10. Enzim Aktivitesi Üzerine İnorganik Fosfatın Etkisi

(Çizelge 4.19 ve Şekil 4.26) İnorganik fosfat konsantrasyonu artış enzim aktivitesinde azalışa neden oldu Bu azalmaya neden olan derişimlerin, inorganik fosfat içermeyen kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Böylece ortamda 4 mM'dan fazla fitatın hidroliz ürünü olan fosfatın bulunması halinde enzim inaktif olduğu belirlendi. Çalışmamıza benzer olarak *A.niger* UA-D fitazı da 4 mM inorganik fosfat varlığında inhibe olduğu bildirilmiştir (Ekren, 2013). *Emericella nidulans*, *A. niger*, *A. fumigatus* ve *A.terreus* CBS fitazları 10 mM inorganik fosfat varlığında inhibe olduğu bildirilmiştir (Wyss vd., 1999b). *A. ficuum* asit fosfatazının 3 mM inorganik fosfat varlığında inhibe olduğu, fakat fitazın aktivitesinde inhibisyona neden olmadığı bildirilmiştir (Shieh vd., 1969). *P. anomala* fitazının (Vohra and Satyanarayana, 2002) ve *S. castellii* fitazının (Segueilha vd., 1992) aktivitesi üzerinde sırasıyla 10 ve 40 mM'a kadar inorganik fosfat konsantrasyonunda bir inhibisyon gözlenmemiştir.

Çizelge 4.19. Enzim aktivitesi üzerine inorganik fosfatın etkisi

İnorganik Fosfat Konsantrasyonu (mM)	Hacimsel aktivite (U/mL) (ORT. $\pm$ S.H.)	x
0	380.05 $\pm$ 0.34	a
2	320.65 $\pm$ 0.09	b
4	185.31 $\pm$ 0.12	c
6	81.80 $\pm$ 1.25	d
8	59.25 $\pm$ 0.65	d
10	59.25 $\pm$ 0.65	d

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.
x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).



Şekil 4.26. *A.tubingensis* HBF 202 fitaz aktivitesi üzerine inorganik fosfatın etkisi

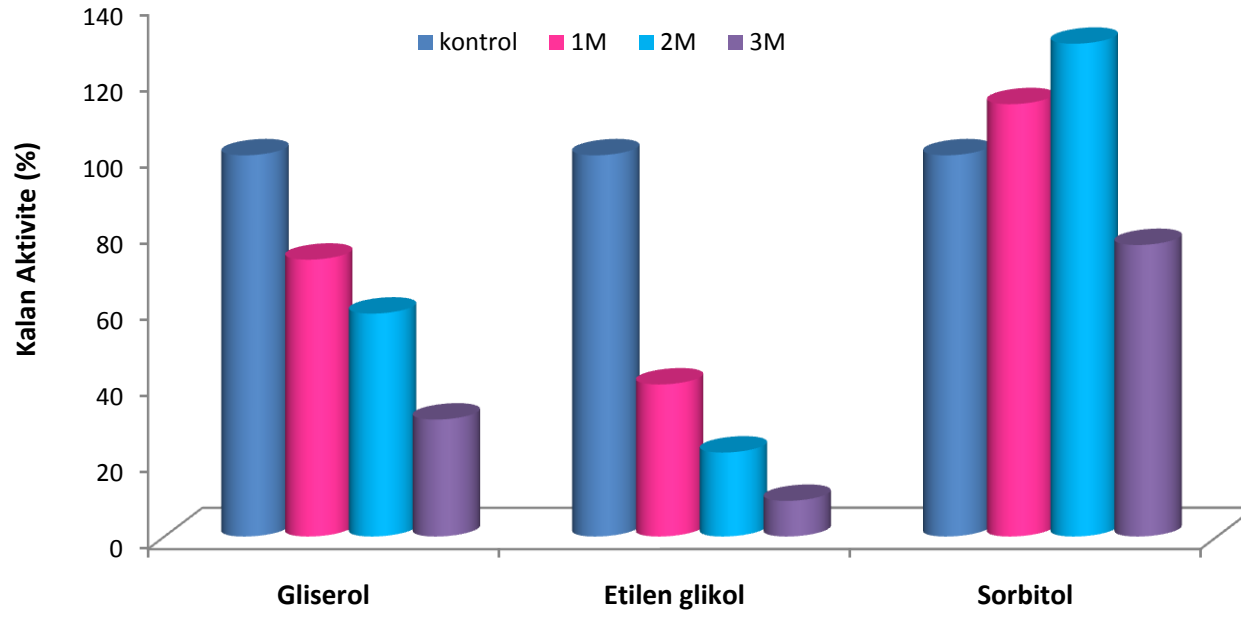
4.6.11. Enzimin Sıcaklık Stabilitesi Üzerine Polihidrik Alkollerin Etkisi

Enzimin sıcaklık stabilitesini artırmak amacıyla çeşitli polihidrik alkollerin (etilen glikol, gliserol, sorbitol) etkisi incelendi (Çizelge 4.20 ve Şekil 4.27). Kontrol grubu, 60 °C’de 1 saat sonunda aktivitesinin % 85’ini koruyabilirken (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.17), etilen glikol (2-OH grubu) ve gliserol (3-OH grubu) denenilen konsantrasyonlarda stabiliteyi artırıcı bir etkileri gözlenmedi, aksine aktivite üzerinde ciddi kayıplara neden oldukları belirlendi. Sorbitol (6-OH grubu) 1 ve 2 M konsantrasyonlarında aktivitede sırasıyla % 13 ve 29’luk bir artış gözlemlendi. Kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Sorbitol (6-OH grubu) 3 M konsantrasyonda ise, enzim aktivitesinin % 76’sını koruyabildi. Bu sonuçlardan sadece sorbitolün termal stabiliteyi koruduğu ve arttırdığını söyleyebiliriz.

Dielektrik katsayısı suyunkinden düşük olan çözeltilerin dielektrik katsayılarının düştüğü oranda (su 78, gliserol 42, etilen glikol 37 ve sorbitol 33,5) enzimin termostabilitesini artırdığını ve bu çözeltiler proteinlerin tersiyer yapılarının korunmasında çok önemli olan hidrofobik etkileşimleri kuvvetlendirdikleri ve böylece daha yüksek sıcaklıklarda enzimin yarı ömrünü artırdıkları bildirilmiştir (Nawani ve Kaur, 2000). Chakraborty ve Raj (2008) ise, enzim stabilitesinin,

polihidrik alkollerdeki serbest hidroksil (-OH) grubu sayısı ile doğru orantılı olarak arttığını yani daha fazla hidroksil grubu içerenlerin stabiliteyi daha çok artırdığını söylemişlerdir. Bu bilgiler bizim çalışma sonuçlarımızı desteklemektedir. Çünkü hidroksil grubu 6 olan sorbitol stabilize edici etki göstermiştir. Daha az sayıda hidroksil grubu bulunan etilen glikol ve gliserolde ise bu etki gözlenmemiştir.

Polihidrik alkollerin enzimlerin termal stabilitesini arttırdığı bilinmektedir (Lamosa vd., 2000). Ekren, (2013) tarafından *Aspergillus niger* UA-D fitazının polihidrik alkollerden gliserol ve sorbitolün (1 mM) sıcaklık stabilitesini arttırdığı bildirilmiştir. Singh ve Satyanarayana (2009) tarafından *Sporotrichum thermophile* fitazının % 10 gliserol varlığında enzimin yarılanma ömrünü 90 dakikadan 109 dakikaya çıkararak enzim aktivitesi üzerinde bir artışa neden olduğu, sorbitolün ise 113 dakikaya çıkararak enzim stabilitesini arttırıcı etkisi olduğu bildirilmiştir. *Pichia anomala* fitazının % 1 olacak şekilde gliserol varlığının enzim aktivitesi üzerinde bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Vohra ve Satyanarayana, 2002). *Cryptococcus laurentii* ABO 510 fitazı % 1 ve % 5 (w/v) gliserol, sorbitol ve mannitol varlığında enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Staden vd., 2007).



Şekil 4.27. *A. tubingensis* HBF 202 sıcaklık stabilitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi

Çizelge 4. 20. *A. tubingensis* HBF 202 sıcaklık stabilitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi

Polihidrik Alkol Konsantrasyonu	Gliserol			Etilen Glikol			Sorbitol		
	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. $\pm$ S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. $\pm$ S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. $\pm$ S.H.)	x	Kalan Aktivite %
Kontrol	411.12 $\pm$ 2.18	a	100.00	411.12 $\pm$ 2.18	a	100.00	411.12 $\pm$ 2.18	a	100.00
1 M	298.59 $\pm$ 3.98	b	72.63	164.01 $\pm$ 3.20	b	39.89	466.26 $\pm$ 0.88	b	113.41
2 M	240.45 $\pm$ 0.09	b	58.48	90.57 $\pm$ 0.45	b	22.03	531.42 $\pm$ 0.33	b	129.26
3 M	126.54 $\pm$ 7.34	b	30.68	38.44 $\pm$ 0.08	b	9.35	314.35 $\pm$ 1.15	b	76.47

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).

4.6.12. Enzim Stabilitesi Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi

A. tubingensis HBF 202 fitazının bütanol dışındaki organik çözücülerin düşük konsantrasyonlarına karşı aktivitesinin % 80'den fazlasını koruduğu hatta çoğu çözücünün enzim aktivitesine arttırıcı etkisi olduğu saptandı (Çizelge 4.21 ve Şekil 4.28). Fitaz enzimi bütanol çözücüsünün % 0.5 ve 1 konsantrasyonlarında, sırasıyla aktivitesinin % 49 ve 41'ini koruyabildi. Fitaz enzimi % 0.5 ve 1.0 konsantrasyonlarında DMSO, hekzan, dietileter ve siklohekzan aktivitesinin neredeyse tamamını koruduğu ve elde edilen değerler ile kontrol arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($p > 0.05$). Fitaz enzimi bütanol dışındaki aseton, asetonitril, benzen, etanol, etilasetat, gliserol, izopropanol ve metanolün % 0.5'lik konsantrasyonlarında aktivitesinin en az % 80'nini koruyabildiği saptandı ve elde edilen değerler ile kontrol arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($p > 0.05$).

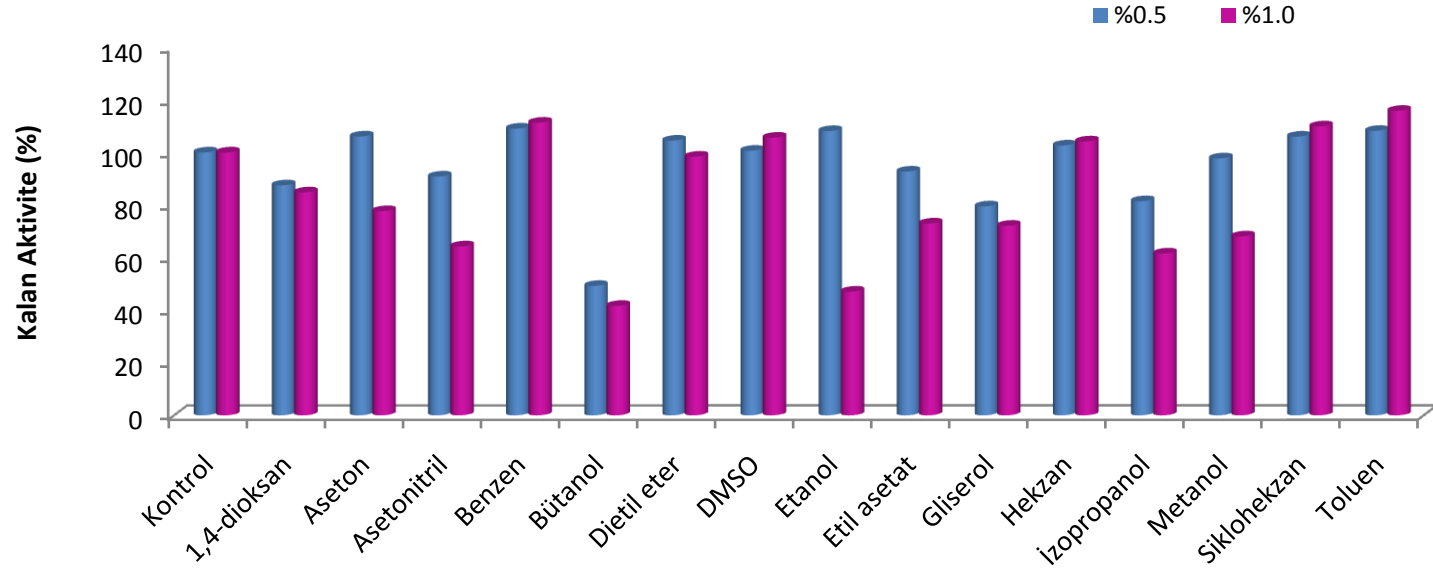
Genel olarak bakıldığında çözücülerin dielektrik sabiteleri arttıkça enzim aktivitesinde çok azda olsa azalışa neden olduğu görülmektedir. Bu çözücülerin hidrofilik özelliği nedeniyle (dielektrik sabitelerinin yüksek) enzimle etkileşim etkileşerek, enzim yapısında değişimlere neden olduğunu söyleyebiliriz. Çözücülerin hidrofobik özellikleri (dielektrik sabiteleri düşük) enzimin konformasyonunu koruyucu bir etki göstererek, yapıyı stabilize ettiğini ileri sürebiliriz. Bu sonuçlar, *A. tubingensis* HBF 202 fitazının üç boyutlu yapısında hidrofobik kalıntıların çok az ve önemli olmadığını göstermektedir. Saflaştırmanın ilk adımında uygulanan amonyum sülfat çöktürme denemelerinde enzimin çok yüksek tuz derişimlerinde (% 80-100) çökmüş olması da, hidrofobik kalıntıların fitaz enziminde çok az olduğunu göstermektedir. *Aspergillus niger* UA-D fitazının bütanol ve 1,4-dioksan dışındaki organik çözücülerin düşük konsantrasyonlarına karşı aktivitesinin % 75'den fazlasını koruduğu bildirilmiştir (Ekren, 2013). *Sporotrichum thermophile* fitazının aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisi çalışılmış ve % 10 aseton, bütanol, izoamil alkol, benzil alkol, toluen, etanol ve heksan varlığında enzimin aktivitesi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı saptanmıştır (Singh ve Satyanarayana, 2009). *Pichia anomala* fitazının % 1 veya 1 mM olacak şekilde gliserol ve toluen varlığının enzim aktivitesi üzerinde bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Vohra ve Satyanarayana, 2002). *Aspergillus niger* van Teighem fitazı %10 hekzan, bütanol, dimetilsülfoksit (DMSO), dimetilflorid (DMF) ve benzil alkol varlığında aktivite kaybetmediği bildirilmiştir.

Çizelge 4. 21. *A. tubingensis* HBF 202 fitazının stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

Organik Çözgenler	Dielektrik Sabiti ϵ	% 0.5			% 1.0		
		Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. $\pm$ S.H.)	x	Kalan Aktivite %	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. $\pm$ S.H.)	x	Kalan Aktivite %
Kontrol		585.89 $\pm$ 2.12	a	100.00	585.89 $\pm$ 2.12	a	100.00
Hekzan	1.89	601.43 $\pm$ 12.86	a	102.65	610.39 $\pm$ 5.50	a	104.18
Sikloheksan	2.02	621.21 $\pm$ 5.56	a	106.03	643.98 $\pm$ 8.85	a	109.91
1,4-dioksan	2.25	512.55 $\pm$ 0.08	b	87.48	496.88 $\pm$ 5.13	b	84.81
Benzen	2.27	639.05 $\pm$ 7.91	a	109.07	652.21 $\pm$ 6.45	b	111.32
Toluen	2.38	633.99 $\pm$ 2.22	a	108.21	678.58 $\pm$ 4.44	b	115.82
Dietil eter	4.33	612.22 $\pm$ 4.29	a	104.49	576.48 $\pm$ 6.72	a	98.39
Etil asetat	6.02	543.33 $\pm$ 18.67	a	92.74	427.58 $\pm$ 7.09	b	72.98
Bütanol	17.8	288.45 $\pm$ 0.54	b	49.23	244.03 $\pm$ 26.12	b	41.65
İzopropanol	17.9	477.21 $\pm$ 6.55	a	81.45	360.64 $\pm$ 2.26	b	61.55
Aseton	20.7	621.43 $\pm$ 6.78	a	106.07	455.09 $\pm$ 8.89	b	77.67
Etanol	24.5	633.54 $\pm$ 0.45	a	108.13	275.71 $\pm$ 12.65	b	47.06
Metanol	32.7	572.67 $\pm$ 19.65	a	97.74	398.73 $\pm$ 16.15	b	68.06
Asetonitril	37.5	532.17 $\pm$ 3.39	a	90.83	376.55 $\pm$ 12.54	b	64.27
DMSO	46.7	589.71 $\pm$ 12.10	a	100.65	618.81 $\pm$ 9.32	a	105.62
Gliserol	42.5	465.65 $\pm$ 11.87	b	79.48	422.55 $\pm$ 6.32	b	72.12

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).



Şekil 4.28. *A. tubingensis* HBF 202 fitazının stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

4.6.13. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi

Enzimin substrat spesifitesini belirlemek amacıyla pH 2.5 0.2 M glisin-HCl tamponunda hazırlanan 20 mM 4-nitrofenil-fosfat, 5-brom-4-klor-3-indol fosfat, D-fruktoz-1,6-bisfosfat, D-fruktoz-6-fosfat, D-glukoz-1-fosfat, D-glukoz-6-fosfat, α -gliserofosfat, β -gliserofosfat, α -naftil fosfat ve β -naftil fosfat substratları ile enzim aktivitesi ölçülmüş olup, sonuçlar Çizelge 4. 22 ve Şekil 4.29'de sunuldu.

A. tubingensis HBF 202 fitazının geniş bir substrat aralığında aktivite gösterdiği saptandı. Bununla birlikte en düşük enzim aktivitesi substrat olarak α -gliserofosfat kullanıldığında saptandı. En yüksek enzim aktivitesi ise D-fruktoz-1,6-bisfosfat substrat olarak kullanıldığında elde edildi. Fitaz enzimi, D-glukoz-1-fosfat ve D-glukoz-6-fosfat substratlarının fosfat gruplarının bulunduğu karbon farklı olsa bile, benzer aktivite sergilediler (her iki bağ içinde aynı steriospesifiklik). Bu sonuç, neden D-fruktoz-1,6-bisfosfat substrat olarak kullanıldığında yüksek spesifiklik olduğunda doğrulamaktadır. *A. tubingensis* HBF 202 fitazı β -naftil fosfat ve β -gliserofosfat'ın her ikisine yüksek spesifik gösterirken, α -naftil fosfat ve α -gliserofosfata karşı daha düşük spesifiklik göstermiştir. Bu sonuçtan enzimin β pozisyonu için steriospesifik olduğunu söyleyebiliriz.

Subsrtat spesifikliği ve affinitesi fitazlar için önemli katalitik özelliklerdir (Oh vd., 2004). Mikrobiyal fitazlar (*A. niger*, *E. coli*, *Bacillus* sp.) fitik asite karşı yüksek afiniteye sahip olmalarına rağmen, bitki fitazları ve *Aspergillus fumigatus* gibi fungal fitazlar daha geniş substrat spesifikliğine sahiptirler (Wyss vd., 1999a).

Bacillus subtilis (natto) N-77 fitazının sodyum fitat için oldukça spesifik olduğu bildirilmiştir. Ancak enzim, fosfotazların genel substratı olan p-nitrofenil fosfata (PNPP) karşı aktivite göstermediği saptanmıştır (Shimizu, 1992). *Bacillus* sp. DS11 fitazının sodyum fitat dışında kullanılan diğer substratlara karşı çok az veya hiç aktiviteye sahip olmadığı saptanmıştır (Kim vd., 1998). Vats ve Banerjee (2004) tarafından *Sporotrichum thermophile* fitazının geniş bir substrat aralığında aktivite gösterdiği saptanmıştır. *Cryptococcus laurentii* ABO 510 fitazı ATP, D-glukoz 6 fosfat-D-fruktoz 1,6-difosfat ve p-nitrofenil fosfat (p-NPP) de dahil olmak üzere geniş bir substrat aralığında aktivite göstermiştir (Staden vd., 2007). *Rhizomucor pusillus* fitazı fosfo fenol piruvat, riboflavin fosfat, AMP, ADP, ATP ve NADPH₂'ye karşı fitik aside benzer etkinlikte aktiftir (Chadha vd., 2004).

Fitazların substrat spesifikliğı karşılaştırıldığında histidin fitazlar (HAPhy), alkalın fitazlara göre daha geniş spesifik aralığına sahiptirler (Oh vd., 2004). Mikrobiyal HAPhy'lar ise substrat spesifikliğıne göre iki sınıfa ayrılmaktadır. İlk sınıfta yer alan fitazlar geniş substrat spesifikliğıne sahipken fitik asit için substrat spesifikliğı düşüktür. İkinci sınıfta yer alan fitazlar ise fitik aside karşı oldukça spesifiktir ve substrat spesifikliğı dardır (Wyss vd., 1999b). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar doğrultusunda enzimin bu sınıflandırmanın ilk sınıf olan histidin fitazlara (HAPhy) dahil olduğu söylenebilir.

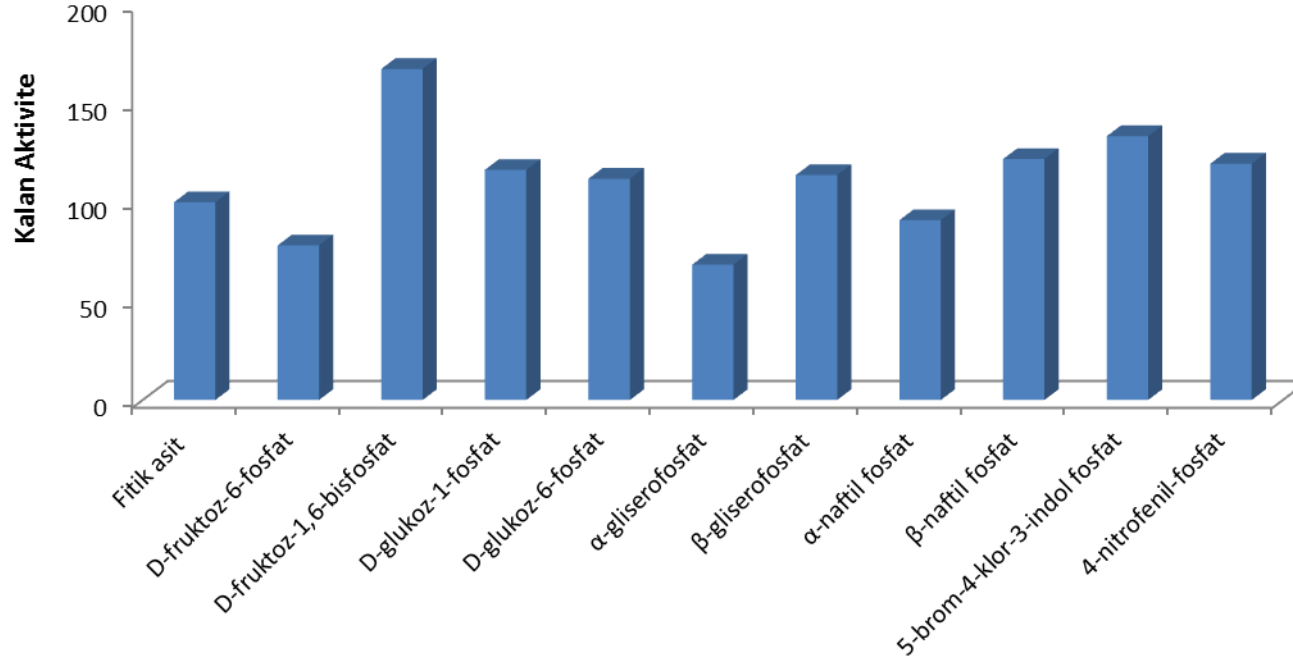
A. tubingensis HBF 202 fitazı geniş bir substrat aralığında aktivite göstermektedir. Geniş substrat spesifikliğı fitazlarda aranan bir özelliktir (Chadha vd., 2004) ve yem takviyeleri için daha uygundur (Wyss vd., 1999b; Gulati vd., 2007a). Bu sonuç enzimimizin yem endüstri açısından önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.22. *A.tubingensis* HBF 202 fitazının substrat spesifikliğı

Substrat	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. $\pm$ S.H.)	x	% Aktivite
Fitik asit	514.44 $\pm$ 5.85	a	100.00
D-fruktoz-1,6-bifosfat	861.43 $\pm$ 12.44	b	167.45
5-brom-4-klor-3-indol fosfat	686.24 $\pm$ 0.06	b	133.40
β -naftil fosfat	626.84 $\pm$ 1.06	b	121.85
β -gliserofosfat	585.11 $\pm$ 2.19	b	113.74
4-nitrofenil-fosfat	614.81 $\pm$ 1.19	b	119.51
D-glukoz-1-fosfat	598.65 $\pm$ 2.24	b	116.37
D-glukoz-6-fosfat	575.71 $\pm$ 3.45	b	111.91
D-fruktoz-6-fosfat	402.03 $\pm$ 3.39	b	78.15
α -naftil fosfat	467.82 $\pm$ 14.44	b	90.94
α -gliserofosfat	352.03 $\pm$ 6.54	b	68.43

ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$).



Şekil 4.29. *A.tubingensis* HBF 202 fitazının substrat spesifikliğ

5. SONUÇ

Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji fungus stoklarında bulunan, fitaz ürettiği daha önceden kalitatif olarak saptanmış (Ekren, 2013) olan *Aspergillus* sp. suşu, enzim üretimi için seçildi. Morfolojik olarak *A. tubingensis* HBF 202 olarak teşhis edilen suşun ITS gen bölgesinin dizi analizi yapılarak www.pubmed.com adresinde yer alan veritabanında kayıtlı ve tür tanısı yapılmış olan funguslar ile karşılaştırıldı. Karşılaştırılan dizler arasında en yüksek benzerliğin (% 99) *Aspergillus tubingensis* ile olduğu saptandı. *A. tubingensis* HBF 202 izolatının Genbank kayıt numarası **KM285407** dir.

A. tubingensis HBF 202 fungusunun fitaz üretimi için, kültür koşulları optimize edildiğinde en iyi fitaz üretiminin pH'sı 5.0, sıcaklığın 30 °C ve 8. gün (durağan fazın sonu) olduğu saptandı.

Optimum koşullarında üretilen *A. tubingensis* HBF 202 kültür ortamı süzildükten sonra elde edilen ham ekstrakt sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik etkileşim, diyaliz, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi işlemlerinden geçirilerek % 7.24'lük geri kazanımla 101 kat saflaştırıldı.

Saflaştırma basamaklarında elde edilen fraksiyonlar, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) ile zimografi yapılarak görüntülendi, enzimin monomerik yapıda olduğu görüldü. Standart proteinler kullanılarak enzimin molekül ağırlığı 63.48 kDA olarak hesaplandı.

Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu yapıldığında, maksimum enzim aktivitesinin pH 2.5 ve 60 °C'de olduğu saptandı. Enzimin geniş bir pH aralığında (pH 1.5-5.0) oldukça stabil olduğu görüldü. Fitaz enziminin 25-70 °C arasında aktivitesinin büyük bir kısmını koruması enzimin sıcaklık stabilitesinin iyi olduğunu gösterdi. Fitaz enziminin sodyum fitat için, K_m değerinin 267 μ M, V_{max} değerinin ise 109.89 U/mL olduğu bulundu. *A. tubingensis* HBF 202 fitazının geniş bir substrat aralığında aktivite gösterdiği saptandı. En yüksek enzim aktivitesi substrat olarak D-fruktoz-1,6-bisfosfat kullanıldığında elde edildi. Enzim fosforlanmış bileşiklere karşı oldukça aktif olması enzimin yem sanayinde kullanılması için avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Enzimin optimum pH'sının asidik olması enzimlerin pH'sına göre sınıflandırıldığında histidin asit fosfataz sınıfına dahil olduğunu ve PhyB fitazı olduğunu gösterir. Substrat spesifikliğinin geniş olması enzimin PhyB olduğunu

destekledi. Polihidrik alkollerden yalnızca sorbitolün sıcaklık stabilitesini artırdığı gözlemlendi. Fitazın, denenen organik çözücülerin büyük bir kısmının düşük konsantrasyonlarına karşı (% 0.5) aktivitesini büyük bir oranda (% 80) koruduğu, ancak çok azının yüksek konsantrasyonlarına karşı aktivitesini koruyamadığı görüldü. Enzimin 2,3-bütandion, NBS, PMSF ve DTNB ile büyük oranda inhibe olması aktif merkezde katalizden sorumlu arjinin, triptofan serin ve sistein amino asidinin olabileceğini düşündürmektedir.

Al^{3+} 5 mM konsantrasyonunda, Zn^{2+} ve Pb^{2+} 10 mM konsantrasyonlarında aktivitenin % 90'ından fazlasının inhibe olduğu belirlendi. Fe^{3+} iyonunun bütün konsantrasyonlarında enzim tamamiyle inhibe olduğu belirlendi. Bunlar dışındaki metal iyonları enzim aktivitesinde çok fazla inhibisyona neden olmadığı saptandı. *A. tubingensis* HBF 202 fitazı EDTA'nın denenen yüksek konsantrasyonlarında dahi bir inhibisyon gözlenmemiştir. Elde ettiğimiz bu saptama enzimin bir metalloenzim olmadığı düşüncesini akla getirmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler sonucunda *A. tubingensis* HBF 202 fitaz enziminin sahip olduğu karakteristik özellikleri ile endüstriyel alanda kullanılması ve ekonomik açıdan değerlendirilmesi önerilebilir. Elde edilen enzimi özellikle yemlerde kullanarak basit mideli hayvanlar tarafından yeterince yararlanılamayan fitik asidi hidrolize ederek protein ve nişastanın sindirimine olanak sağlamak, yemin protein ve enerjisinden yararlanmayı ve aynı zamanda hayvansal gübreden kaynaklanan fosfor kirliliğinin azaltılması planlanmaktadır. *A. tubingensis* HBF 202 fitaz enzimi gıdalara eklenerek fitat içeriği yüksek tahıl, baklagil ve soya proteinlerince zengin besinlerin tüketilmesinden dolayı ortaya çıkan çinko, demir, kalsiyum, magnezyum, manganez ve bakır gibi minerallerin alınımının negatif etkisinin engellenebileceği düşünülmektedir. Enzim saf oduğu için özel *myo*-inositollerin elde edilerek ilaç sanayisindeki potansiyeli araştırılabilir. Bu nedenle fitatın hidrolizi sonucu açığa çıkan ürünlerin saptanması planlanmaktadır. Enzimin karbonhidrat kalıntısı içerip içermediği tespit edilecektir. Enzimin ait olduğu alt sınıfın tam olarak belirlenebilmesi için enzimin elektroforezde saptanan bandı kesilerek, elde edilecek saf fitazın amino asit sekanslarının çıkarılması ve üç boyutlu yapısının aydınlatılması düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Açikel, Y.Ş., Çelebi, B. 2006. *R. delemar* ile Lipaz Üretimi. TÜBİTAK Projesi, MİSAG-282.
- Aşan M. 2007. Mikrobiyal Fitazlar, Uygulama Alanları ve Biyoteknoloji. **Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimler Dergisi**, 13: 147-155.
- Angelis M., Gallob G., Corboc M. R., McSweeneyd P. L.H., Facciae M., Giovineb M., Gobbettib M. 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. **International Journal of Food Microbiology**, 87: 259-270.
- Bajwa, W., Meyhack, B., Rudolph, H., Schweingruber, A.M., Hinnen, A. 1984. Structural analysis of the two tandemly repeated acidphosphatase genes in yeast. **Nucleic Acids Research**, 12:7721–7739.
- Barredo, J.L. 2005. Microbial enzymes and biotransformations. Human Press, p:1-27
- Baruah, K., Sahu, N. P., Pal, A. K., Jain, K. K., Debnath, D., Yengkokpam, S., et al. 2007. Interactions of dietary microbial phytase, citric acid and crude protein level on mineral utilization by Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), Juveniles. **Journal of World Aquaculture Society**, 38: 238–249.
- Bayraktar, A.D. ve Akbulut, G. 2013. Diabetes Mellitus'un Tıbbi Beslenme Tedavisinde Fitik Asit: Faydalı mı Zararlı mı ? **Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi**, 2:1.
- Berka, R.M., Rey, M.W., Brown, K.M., Byun, T. and Klotz, A.V. 1998. Molecular characterization and expression of a phytase gene from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Applied. Environment. Microbiology.**, 64: 4423–4427.
- Bilgiçli, N. 2002. Fitik asitin Beslenme Açısından Önemi ve Fitik asit Miktarı Düşürülmüş Gıda Üretim Metotları. **Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 30: 79-83.
- Billington, D.C. 1993. The inositol phosphates. Chemical Synthesis and Biological Significance. Verlag Chemie, Weinheim. 14:153-177.
- Bradford, M.M. 1975. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254.

- Casey, A., Walsh, G. 2004. Identification and characterisation of phytase of potential commercial interest. **Journal of Biotechnol**, 3: 313-322.
- Casey, A., Walsh, G., 2003. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. **Bioresource Technology**. 86, 183–188.
- Chadha, B.S., Harmeet, G., Mandeep, M., Saini, H.S. and Singh, N. 2004. Phytase production by the thermophilic fungus *Rhizomucos pusillus*. **World. Journal of. Microbiology. Biotechnology.**, 20: 105–109.
- Chakraborty, K. and Raj, R.P. 2008. An extra-cellular alkaline metalloproteinase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical characterization. **Food Chemistry**, 109: 727-736.
- Chan, W.L. 2004. A study of beta-propeller phytase in transgenic plants. Master Thesis, The University of Hong Kong.
- Chantasartasamee K., Ayuthaya D. I. Na, Intarareugsorn S., Dharmsthiti S. 2005. Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. **Process Biochemistry** 40:2285–2289.
- Chen, C.C., Wu, P.H., Huang, Cheng, K.J. 2004. A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase. **Enzyme and Microbial Technology**, 35: 315-320.
- Cheng, C. and Lim, B.L. 2005. Beta-propeller phytases in the aquatic environment: characterization of a novel phytase from *Shewanella oneidensis* MR-1. In Inositol Phosphates in the Soil-Plant-Animal System: Linking Agriculture and Environment. Proceedings of the Bouyoucos Conference to Address the Biogeochemical Interaction of Inositol Phosphates in the Environment; Turner, B.L., Richardson, A.E., Mullaney, E.J., Eds.; Sun Valley, Idaho, USA. pp. 55–56.
- Cheng, K. J., Sellinger, L. B., Yanke, L. J., Bae, H. D., Zhou, L. and Forsberg, C. W. 1999. Phytases of ruminal microorganisms. US Patent No. 5939303.
- Cho, J.S., Lee, C.W., Kang, S.H., Lee, J.C., Bok, J.D., Moon, Y.S., Lee, H.G., Kim, S.C. and Choi, Y.J. 2003. Purification and characterization of a phytase from *Pseudomonas syringae* MOK1. **Current. Microbiology**. 47, 290–294.
- Choi, Y.M., H.J. Suh, and J.M. Kim. 2001. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. **Journal of. Protein. Chemistry.**, 20: 287-292.

- Chu, H. M., Guo, R. T., Lin, T. W. 2004. Structures of *Selenomonas ruminantium* Phytase in Complex with Persulfated Phytate: DSP Phytase Fold and Mechanism for Sequential Substrate Hydrolysis. **Structure**, 12: 2015-2024.
- Cromwell, G.I., R.D. Coffey, G.R. Parker, H.J. Monegue and J.H. Randolph. 1995. Efficacy of a recombinant-derived phytase in improving the bioavailability of phosphorus in corn-soybean meal diets for pigs. **Journal of Animal Sciences**, 71: 1831-1840.
- Çolakoğlu, G. 2001. Fungal (Mantari) Büyüme İçin Kimyasal ve Fiziksel Çevre koşulları: Fungal Büyümenin Kinetiği. 9: 255-260.
- Demain, A.L., and Solomon, N.A., 1981. In Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering, pp. 3-14. Scientific American, Freeman and Comp., San Francisco.
- Denu, J.M. and Dixon, J.E. 1998. Protein tyrosine phosphatase: mechanism of catalysis and regulation. **Current Opinion in Chemical Biology**, 2: 633-641.
- Dossa J., Marck C., Boquet P.L. 1990. The complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gene appA reveals significant homology between pH 2.5 acid phosphatase and glucose-1-phosphatase. **Journal of Bacteriology**, 172: 5497–5500
- Dvorakova, J., 1998. Phytase, sources, preparation and exploitation. **Folia Microbiologica**, 43: 323– 338.
- Dvorakova, J., Volfova, O., and Kopecky, J. 1997. Characterization of phytase produced by *Aspergillus niger*. **Folia Microbiol.** 42: 349-352.
- Edward J., Mullaney and Abul H.J. 2003. The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312:179–184.
- Ekren, G.S. 2013. Fitaz Üreten Fungustan Enzim Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın.
- Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G., Mullaney, E.J., Dischinger, H.C., and Ullah, A.H.J, 1993. Identification and cloning of a phytase gene (phyB) from *Aspergillus niger* (ficus). **Biochemical. Biophysical. Research. Communications**, 195: 53–57.
- Ellestad, L.E., Angel, R. and Soares Jr, J.H. 2002. Intestinal phytase II: A comparison of activity and in vivo phytate hydrolysis in three teleost species with differing digestive strategies. **Fish Physiology. Biochemistry**, 26: 259–273.

- Elliott, S., Chang, C.W., Schweingruber, M.E., Schaller, J., Rickli, E. E., Carbon, J. 1986. Isolation and characterization of the structural gene for secreted acid phosphatase from *Schizosaccharomyces pombe*. **Journal of Biological Chemistry**, 261:2936–2941
- Erdman, J. W., and Poneros-Schneier, A. 1989. **Advances in. Experimental. Medicine and Biology**, 249: 161–171.
- Escobin-Mopera, L., Ohtani , M., Sekiguchi, S., Sone, T., Abe, A., Tanaka, M., Meevootisom, V., and Asano, K. 2012. Purification and characterization of phytase from *Klebsiella pneumoniae* 9-3B. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 113: 562–567.
- Fasimoye, F.O., Olajuyigbe, F.M. and Sanni, M.D. 2014. Purification and Characterization of Thermostable Extracellular Phytase From *Bacillus licheniformis* PFBL-03. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 44: 193-205.
- Furlan, S.A., and Pant, H.K., 2006. Enzyme Technology: General Properties of Enzymes, (A. Pandey, C.Webb, C.R. Soccol and C. Larroche), Springer Science and Business Media, Inc. And Asiatech Publishers Inc., pp.11-37, New York.
- Gargova S., Sariyska M., Angelov A., Stoilova I. 2006. *Aspergillus niger* pH 2.1 optimum acid phosphatase with high affinity for phytate. **Folia Microbiology**, 6:541-545.
- Golovan, S.P., Meidinger, R.G., Ajakaiye, A., Cottrill, M., Wiederkehr, M.Z., Barney, D.J., Plante, C., Pollard, W.J., Fan, Z.M., Hayes, M.A., Laursen, J., Hjorth, J.P., Hacker, R.R., Phillips, P.J., Forsberg, C.W. 2001. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. **Nature Biotechnology**, 19: 741- 745.
- Golovan, S.P., G. Wang, J. Zhang and C.W. Forsberg. 2000. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli* appA encoded bifunctional enzyme that inhibits both phytase and acid phosphatase activities. **Canadian Journal Microbiology**, 46: 59-71.
- Greiner R, Konietzny U and Jany Kl-D. 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 303: 107-113.
- Greiner, R., da Silva, L., G., Couri, S. 2009. Purification and characterisation of an extracellular phytase from *Aspergillus niger* 11T53A9. **Brazilian Journal of Microbiology**, 40: 795-807.

- Greiner, R., ve V Konietzny, U. 2006. Phytase for Food Application. Food Technology and Biotechnology, 44: 125-140.
- Greiner, R., Haller, E., Konietzny, U., and Jany, K. D. 1997. Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 341: 201-206.
- Greiner, R., Larsson Alminger, M., Carlsson, N.G., Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., Pedrosa, M. and Goyoaga, C. 2002. Pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytases of legume seeds. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 50: 6865–6870.
- Greiner, R., Lim, B.L., Cheng, C.W., and Carlsson. 2007. Pathway of phytate dephosphorylation by beta- propeller phytases of different origins. **Canadian Journal of Microbiology**, 53:488-495.
- Gulati, HK., Chadha, BS., Saini HS. 2007a. Production and characterization of thermostable alkaline phytase from *Bacillus laevolacticus* isolated from rhizosphere soil. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, 34:91–98.
- Gulati, HK., Chadha, BS., Saini HS. 2007b. Production of feed enzyme (phytase and plant cell Wall hydrolizing enzymes) by *Mucor indicus* MTCC 6333: purification and characyerization of phytase. **Folia Microbiology**, 52: 491-497.
- Gürsoy, A. 2011. Mikroorganizmaların Beslenmesi ve Gelişimi. **Gıda**, 1:1-8.
- Ha, N.C., Oh, B.C., Shin, S., Kim, H.J., Oh, T.K., Kim, Y.O., Choi, K.Y. and Oh, B.H. 2000. Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states. **Nature Structural and Molecular Biology**, 7: 147–153.
- Han, Y., Wilson, D.B., and Lei, X.G., 1999. Expression of an *Aspergillus niger* Phytase Gene (phyA) in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmetal. Microbiology**, 65(5): 1915-1918.
- Han, Y.M. and X.G. Lei. 1999. Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 364: 83-90.
- Han, Y.M., Yang, F., Zhou, A.G., Miller, E.R., Ku, P.K., Hogberg, M.G. and Lei, X.G. 1997. Supplemental phytases of microbial and cereal sources improve dietary phytate phosphorus utilization by pigs from weaning through finishing. **Journal of Animal Science**, 75: 1017–1025.

- Hara, S., Fennell, D.I. and Hesseltine, C.W. 1974. Aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* detected by fluorescence of agar medium and under UV light. **Applied Microbiology**, 27:1118-1123.
- Harland, B. F., and Morris, E. R., 1995. Phytate: A good or bad food component ? Nutrition. Research, 15:733-754.
- Haros, M., Bielecka, M. and Sanz, Y. 2005. Phytase activity as a novel metabolic feature in Bifidobacterium. **FEMS Microbiology Letters**, 247:231-239.
- Hayakawa, T., Toma, Y., and Igaue, I. 1989. Purification and characterisation of acid phosphatases with or without phytase activity from rice bran. **Agricultural and Biological Chemistry**, 53: 1475-1483.
- Hegeman, C.E. and Grabau, E.A. 2001. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. **Plant. Physiology**, 126: 1598-1608.
- Houde, R. L., Alli, I., and Kermasha, S. 1990. Purification and characterisation of canola seed (*Brassica* sp.) phytase. **Journal of Food Biochemistry**. 114: 331-351.
- Howson, S. J., and Davis, R. P. 1983. Production of phytate-hydrolyzing enzyme by some fungi. **Enzyme and Microbia Technology**, 5: 377-382.
- Idriss, E. E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T. and Borriß, R. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plantgrowth- promoting effect. **Microbiology**, 148: 2097-2109.
- Iqbal T.H., Lewis K.O. and Cooper B.T. 1994. Phytase activity in the human and rat small intestine. **Gut**, 35: 1233-1236.
- Irving, G. C. and Cosgrove, D. J. 1971. Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin. Some properties of a partially purified bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. **Australian Journal of Biological Sciences**, 24: 547-557.
- John, F.K., 1987. Enzyme Technology (H.J. Rehm ve G.Reed), **Biotechnology**, 7A: 37-62. New York.
- John, W., and Sons, I. 1998. Industrial Enzymes and Their Applications. Animal nutritions, 8: 389-398.
- Kaşık, G. 2010. Mantar Bilimi: Mantarların Sayısı ve Yayılışı (Kaşık, 2010). 7: 33-35.

- Kerovuo, J., 2000. A Novel Phytase from *Bacillus*. Characterization and Production of the Enzyme. Academic Dissertation, 68 p., Helsinki,
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N. and Apajalahti, J. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 64: 2079–2085.
- Kim, H., Kim, Y., Lee, J., Kim, K. and Kim, Y. 2003. Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*. **Biotechnology Letters**, 25: 1231–1234.
- Kim, T.W. and Lei X. G. 2005. An improved method for a rapid determination of phytase activity in animal feed. **Journal of Animal Science**, 83: 1062-1067
- Kim, Y.O, Kim, H.K., Bae, K.S., YU, J.H., and OH, T.K. 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus sp.* DS11. **Enzyme and Microbial Technology**, 22: 2-7.
- Konietzny, U., Greiner, R. 2004. Bacterial phytase: Potential application, *in vivo* function and regulation of its synthesis. **Brazilian Journal of Microbiology**, 35: 11-18.
- Konietzny, U., Greiner, R., and Jany, K.-D. 1995. Purification and characterization of a phytase from spelt. **Journal of Food Biochemistry**, 18: 165-183.
- Konietzny, U. and Greiner, R. 2002. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). **International Journal of Food Science and Technology**, 37: 791–812.
- Kostrewa, D., Grueninger-Leitch, F., D’Arcy, A., Broger, C., Mitchell, D. and van Loon, A.P.G.M. 1997. Crystal structure of phytase from *Aspergillus ficuum* at 2.5 Å resolution. **Nature Structure Biology**, 4: 185–190.
- Kostrewa, D., Wyss, M., D’Arcy, A. and van Loon, A.P.G.M. 1999. Crystal structure of *Aspergillus niger* pH 2.5 acid phosphatase at 2.4 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, 288: 965–974.
- Kumar V., Sinha A. K. , Makkar H. P.S., Becker K. 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food Chemistry**, 120 : 945–959.
- Knuckles B.E., Kuzmicky, D.D., Gumbmann, M.R. and Betschart, A.A. 1989. Effect of *myo*-inositol phosphate esters on *in vitro* and *in vivo* digestion of protein. *Journal Food Science*, 54:1348-1350.
- Kvist S., Carlsson T, Lawther J.M., DeCastro F.B. 2005. Process for the fractionation of cereal brans.US patent application US 20050089602.

- Laboure A.M., Gagnon J. and Lescure A.M. 1993. Purification and characterization of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. **Biochemical Journal**, 295: 413-419.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685.
- Lamosa, P., Burke, A., Peist, R., Huber, R., Liu, M.Y., Silva, G., Rodrigues-Pousada, C., LeGall, J., Maycock, C., Santos, H., 2000. Thermostabilization of proteins by diglycerol phosphate, a new compatible solute from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 66: 1974-1979.
- Lassen, S.F., Breinholt, J., Østergaard, P.R., Brugger, R., Bischoff, A., Wyss, M. and Fuglsang, C.C. 2001. Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp. and *Trametes pubescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, 67: 4701-4707.
- Lee D., Choi S. and Hwang Y., 2005. Culture Conditions and Characterizations of a New Phytase-Producing Fungal Isolate, *Aspergillus* sp. L117. **Mycobiology**, 33(4): 223-229.
- Lei, X.G., Porres, J.M., Mullaney, E.J. and Brinch-Pedersen, H. 2007. Phytase: source, structure and application. **Industrial Enzymes (Section E)**, (Polaina, J. And MacCabe, A.P.), Springer, pp. 505-529. The Netherlands.
- Lei, X.G. and Porres, J.M. 2003. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. **Biotechnology Letters**, 25: 1787-1794.
- Lei, X.G. and Stahl, C.H. 2001. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 57:474-481.
- Li, X., Z. Chi, Liu. Z., K. Yan and H. Li. 2008. Phytase production by a marine yeast *Kodamea ohmeri* BG3. **Applied and Biochemistry of Biotechnology**. 149: 183-193.
- Liu, B.L., Rafiq, A, Tzeng Y., and Rob, A. 1998. Induction and characterization of phytase and beyond. **Enzyme and Microbial Technology**, 22: 415-424.
- Lopez, H.W., Leenhardt, F., Coudray, C., and Resemesy, C., 2002. Minerals and phytic acid interactions: Is it a real problem for human nutrition? **International Journal of Food Science and Technology**, 37: 727-739.

- Madsen, G.B., Norman, B.E., and Slott, S. 1973. A new heat-stable bacterial amylase and its use in high-temperature liquefaction. **Starke**, 25: 304.
- Maenz, D.D. 2001. Enzymatic characteristics of phytases as they relate to their use in animal feed. In *Enzymes in farm animal nutrition*. Eds. Bedford, M.R. and Partridge, G.G. CABI Publishing, pp. 61–84, Wallington, UK.
- Maenz, D.D. and Classen, H.L. 1998. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. **Poultry Science**, 77: 557–563.
- Mandiviwala, T.N., Khire, J.M. 2000. Production of high activity thermostable phytase from thermotolerant *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Journal Indian Microbiology Biotechnology**, 24:237-243.
- Matsui, T., Nagagawa, Y., Tamura, A. 2000. Efficacy of yeast phytase in improving phosphorus bioavailability in a corn-soybean meal based diet for growing pigs. **Journal of Animal Science**, 78:94-99.
- Maugenest, S., Martinez, I., Godin, B., Perez, P., and Lescure, A.M. 1999. Structure of two maize phytase genes and their spatio-temporal 131 expression during seedling development. **Plant Molecular Biology**, 39: 503–514.
- Metin, K. 2007. Moleküler Biyoloji Teknikleri II: Protein Analiz Teknikleri. Moleküler Biyoloji (Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B.), Nobel Yayıncılık, Sayfa 555-598, Ankara.
- Mittal, A., Singh G., Goyal V., Yadav, A., Aggarwal, N. K. 2012. Production of phytase by acido-thermophilic strain of *Klebsiella sp.* DB-3FJ711774.1 using orange peel flour under submerged fermentation. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, 10:18-27.
- Mitchell, D. B., K. Vogel, B. J. Weimann, L. Pasamontes, and A. P. G. M. Van Loon. 1997. The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. **Microbiology** 143:245–252.
- Moreira, K.A., Herculano, P.N., Maciel, M.H.C., Porto, T.S., Spier, M.R., Motta, C.M.S., Porto, A.L.F. and Soccol, C.R. 2014. Optimization of Phytase production by *Aspergillus japonicus* Satio URM 5633 using cassava bast as substrate in solid state fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, 8: 929-938.
- Mullaney, E.J. and Ullah, A.H.J. 2005. Attributes, Catalytic Mechanisms and Applications. Inositol Phosphates Linking Agriculture and the Environment, Editör, Benjamin L. Turner, Alan E. Richardson, Edward J. Mullaney 7: 97-110.

- Mullaney, E.J. and Ullah, A.H.J. 2005 Conservation of cysteine residues in fungal histidine acid phytases. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, 328: 404–408.
- Mullaney, E.J., Daly, C.B. and Ullah, A.H.J. 2000. Advances in phytase research. **Advances in Applied Microbiology**, 47: 157–199.
- Mullaney, E.J., Daly, C.B., Kim, T., Porres, J.M., Lei, X.G., Sethumadhavan, K. and Ullah, A.H.J. 2000 Site-directed mutagenesis of *Aspergillus niger* NRRL 3135 phytase at residue 300 to enhance catalysis at pH 4.0. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 297: 1016–1020.
- Nagashima T., Tange T. and Anazawa H. 1999. Dephosphorylation of phytate by using the *Aspergillus niger* phytase with a high affinity for phytate. **Applied and Environmental Microbiology**, 65: 4682–4684.
- Nakano, T., Joh, T., Tokumoto, E., and Hayakawa, T. 1999. Purification and characterisation of phytase from bran of *Triticum aestivum*. **Food Science and Technology Research**, 5:18–23.
- Nayini, N.R., and Markakis, P., 1984. The phytase of yeast. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, 17: 24–26.
- Nawani, N. and Kaur, J. 2000. Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 206: 91–96.
- Nelson, D.L., Cox, M. M. 2004. Enzymes. *Lehninger Principles of Biochemistry* (Nelson, D.L., Cox, M.M) W.H. Freeman, p. 190–249.
- Odibo, F. J. C. and Ulbrich-Hofmann, R. 2001. Thermostable α -amylase and glucoamylase from *Thermomyces lanuginosus* F1 **Acta Biotechnology**, 21(2):141–153, Germany.
- Oh, B.C., Chang, B.S., Park, K.H., Ha, N.C., Kim, H.K., Oh, B.H. and Oh, T.K. 2001. Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloquelaceiens* DS11. **Biochemistry**, 40: 9669–9676.
- Oh, B.C., Choi, W.C., Park, S., Kim, Y.O. and Oh, T.K. 2004. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phosphatase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 63: 362–372.
- Ohtani, M., Abe, A., Mopera, E.L., Sekiguchi, S., Sone, T., Tanaka, M., Meevootisom, V., Asano, K. 2012. Purification and characterization of phytase from *Klebsiella pneumoniae* 9-3B **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 113:562–567.

- Pandey, A., and Ramachandran, S. 2006. Enzyme Technology: General Introduction, Springer Science and Business Media, Inc. And Asiatech Publishers Inc., p 1-11. New York.
- Pandey, A. Soccol C. R. Rodriguez - Leon J. A. and Nigam. P. 2001. Solid State Fermentation in Biotechnology Published by Asiatech Publishers, First edition, New Delhi.
- Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, V. And Soccol, T. 2001. Production, Purification and Properties of Microbial Phytases. **Bioresource Technology**, 3: 203-214.
- Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M. and van Loon, A.P.G.M. 1997. Gene cloning and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 63: 1696–1700.
- Piddington, C.S., Houston, Paloheimo, C.S., Cantrell, M., M., Meittinen-Oinonen, A., Nevalainen, H. and Rambosek, J., 1993. The cloning and sequencing of the genes encoding phytase (phy) and pH 2.5- optimum acid phosphatase (aph) from *Aspergillus niger var. awamori*. **Gene**, 133: 55–62.
- Pitt, J.I., Hocking A.D. and Glenn, D.R. 1983. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Journal of Applied Bacteriology**, 54: 109-114.
- Powar, V. K. and Jagannathan, V. 1982. Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, 151: 1102-1108.
- Qian, H., Kornegay, E. T., and Denbow, D. M. 1996. Utilization of phytate phosphorus and calcium as influenced by microbial phytase, cholecalciferol, and the calcium: Total phosphorus ratio in broiler diet. **Poultry Science**, 76: 37–46.
- Quan, C., Zhang, L., Wang, Y., and Ohta, Y. 2001. Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 92: 154–160.
- Quan C. S., Fan S. D., Zhang L. H., Wang Y. J and Ohta Y. 2002. Purification and properties of a phytase from *Candida krusei* WZ-001. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 94: 419-425.
- Quan, C.S., Tian, W.J., Fan, S.D. and Kikuchi, Y. 2004. Purification and properties of a low-molecularweight phytase from *Cladosporium* sp. FP-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 94: 260–266.

- Ragon, M., Aumelas, A., Chemardin, P., Galvez, S., Moulin, G., Boze, H. 2008. Complete Hydrolysis of myo-inositol hexakisphosphate by a novel phytase from *Debaryomyces castellii* CBS 2923. **Applied Microbiology Biotechnology**, 78:47–53.
- Rani, R. and Ghosh, S. 2011. Production of phytase unde solid-state fermentation using *Rhizopus oryzae*: Novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. **Bioresource Technology**, 102: 1641-1649.
- Reddy, N.R., S.K., Sathe and D.K. Salunkhe, 1982. Phytases in legumes and cereals. **Advances in Food Research**, 28: 1-92.
- Rehms, H. and Barz, W. 1995. Degradation of stachyose, raffinose, melibiose and sucrose by different tempe-producing *Rhizopus* fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 44: 47-52.
- Rodriguez, E., Wood, Z.A., Karplus, P.A. and Lei, X.G. 2000. Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 382: 105–112.
- Roy, P.M., Poddar, M., Singh, K.K., and Ghosh, S. 2012. Purification, characterization and properties of phytase from *Shigella sp.* CD2. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**. 49: 266-277.
- Sabu, A., Sarita, S., Pandey, A., Bogar, B., Szakacs, G. and Soccal., C.R. 2002. Solid- State Fermantion for Production of Phytase by *Rhizopus oligosporus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 102: 251-260.
- Salmon, D.N.X., Walter, A., Porto, T.S., Moreira, K.A., de SouzaVanderberghe, L.P., Soccol, R.C., Port, A.L.F. and Spier, R.M. 2014. Aqueous two-phase extraction for partial purification of *Schizophyllum commune* phytase produced under solid- state fermatation. **Biocatalysis and Biotransformation**, 32: 45-52.
- Sano, K., Fukuhara, H., Nakamura, Y. 1999. Phytase of the yeast *Arxula adenivorans*. **Biotechnology Letters**, 21: 33–38.
- Sariyska M.V., Gargova S.A., Koleva L.A., Angelov A.I. 2005. *Aspergillus niger* phytase: purification and characterization. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, 3: 93-105.
- Scott, J.J. and Loewus, F.A. 1986. A calcium-activated phytase from pollen of *Lilium longiflorum*. **Plant Physiology**. 82: 333–335.

- Segueilha, L., Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G.F and Galzy, P. 1992. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 74: 7–11.
- Selle, P. H., and Ravindran, V. 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, 135: 1–41.
- Shah, V.; Parekh, L.J. 1990. Phytase from *Klebsiella* sp. No. PG-2: purification and properties. **Indian Journal of Biochemistry Biophysics**, 27: 98–102.
- Shah, K.B., Trivedi, R. 2012. Purification and Characterisation of an Extracellular Phytase From *Aspergillus tamari*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, 3:775–783.
- Shamsuddin, A.M. 2002. Anti-cancer function of phytic acid. **International Journal of Food Science Technology**, 37: 769–782.
- Shieh, T. R. and Ware, J. H. 1968. Survey of microorganism for the production of extracellular phytase. **Journal of Applied Microbiology**, 16: 1348–1351.
- Shieh, T. R., Wodzinski, R. S. and Ware, J. H. 1969. Regulation of the formation of acid phosphatases by inorganic phosphate in *Aspergillus ficuum*. **Journal of Bacteriology**, 100: 1161–1165.
- Shimizu M. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (nato) N-77. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 56:1266–1269.
- Shimizu M. 1993. Purification and characterization of phytase and acid phosphates produced by *Aspergillus oryzae* K1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 57:1364–1365.
- Shin, S., Ha, N.C., Oh, B.C., Oh, T.K. and Oh, B.H. (2001). Enzyme mechanism and catalytic property of β propeller phytase. **Structure** 9: 851–858.
- Silva, L.G., Trugo, L.C., Terzi, S.C., and Couri, S., 2005. Low phytate lupin flour based biomass obtained by fermentation with a mutant of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, 40: 951–954.
- Simell, M., Turunen, M., Pironen, J., and Vaara, T., 1989. Feed and food applications of phytase. Lecture-3rd Meet. **Industrial Applications of Enzymes**, p:224–235.
- Simon O, Igbasan F. 2002. In vitro properties of phytase from various microbial origins. **International Journal of Food Science and Technology**, 37:813–822.

- Singh, B. and Satyanarayana, T. 2009. Characterization of a HAP-phytase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*. **Bioresource Technology**, 100: 2046–2051.
- Siren, M., 1998. Use of an ester of inositoltriphosphate for the preparing of medicaments. U.S. Patent: 5846957.
- Siren, M., 1995. Method of treating pain using inositol triphosphate. U.S. Patent: 5407924.
- Standen, Van J., den Haan, R., van Zyl, W.H., Botha A. and Viljoen- Bloom M. 2007. Phytase activity in *Cryptococcus laurentii* ABO510. **Federation of European Microbiological Societies**, 7: 442-448.
- Sung, H.G., Shin, H.T., Ha, J.K., Lai, H.-L., Cheng, K.-J. And Lee, J.H. 2005. Effect of germination. **Bioresource Technology**, 96: 1297-1303.
- Sunitha, K., Kim, Y.O., Lee, J.K. and Oh, T.K. 2000. Statistical optimization of seed and induction conditions to enhance phytase production by recombinant *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**, 5: 51–56.
- Soma, R., Anita, M. and Rani, M.R. 2013. Production and Characterization of Extracellular phytase: An Industrial Enzyme. **International Journal of Plant Research**, 26: 81-83.
- Sümengen, M., Dinçer, S. and Kaya, A. 2013. Phytase Production from *Lactobacillus plantarum*. **Turkish Journal of Biology**, 36: 533-541.
- Sümengen, M. 2011. Laktik Asit Bakterilerinden Fitaz Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanakları. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Şakar, S. 2004. Çevre Mikrobiyolojisi-II: Mikroorganizmaların Büyümleri ve Ölümleri.1:5-14,Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Tambe, S.M., Kaklij, G.S., Kelkar, S.M., and Parekh, L.J. 1994. Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: evidence for unusually small active enzyme peptide. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 77: 23-27.
- Tang, J., Leung, A., Leung, C., Lim, B.L., 2006. Hydrolysis of precipitated phytate by three distinct families of phytases. **Soil Biology and Biochemistry**, 38: 1316–1324.
- Tran-Dinh, N., Pitt, J.I and Carter, D.A. 1999. Molecular Genotype Analysis of Natural Toxigenic and Nontoxigenic Isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Food Science**, Australia, 11 : 1485–1490.

- Tseng Y. H., Fang T.J., Tseng S.-M. 2000. Isolation and characterization of a novel phytase from *Penicillium simplicissimum*. **Folia Microbiology**, 45: 121-127.
- Tye A.J., Siu F.K., Leung TY, Lim B.L. 2002. Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *B.subtilis* 168 and *B. licheniformis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 59:190–197.
- Ullah, A., Mullaney, E., Dischinger, H., 1994. Advances in phytase research, **Biochemical and Biophysics Research Communications**, 203:182–189.
- Ullah, A.H.J. 1988. Production, rapid purification and catalytic characterization of extracellular phytase from *Aspergillus ficuum*. **Preparative Biochemistry**, 18: 443-458.
- Ullah, A.H.J and Gibson, D. 1987. Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8.) from *Aspergillus ficuum* 3135: purification and characterization. **Preparative Biochemistry**, 17: 63-91.
- Van Etten, R.L. 1982 Human prostatic acid phosphatase: a histidine phosphatase. **Annals of the New York Academy of Science**, 390: 27-51.
- Van Etten, R.L., Davidson, R., Stevis, P.E., MacArthur, H. and Moore, D.L. 1991 Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase. **The Journal Biological Chemistry**, 266, 2313–2319.
- Van Hartingsveldt, W., C.M.J. Van Zeijl, M. Harteveld, R.J. Gouka, M.E.G. Suykerbuyk, R.G.M. Luiten, P.A. Van Paridon, G.C.M. Selten, A.E. Veenstra, R.F.M. Van Gorcom, and C.A.M.J.J. Van den Hondel. 1993. Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (phyA) of *Aspergillus niger*. **Gene**, 127: 87–94.
- Vats, P. and Banerjee, U.C. 2004. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphates phosphohydrolases): An overview, **Enzyme and Microbial Technology**, 35: 3–14.
- Vats, P., Banerjee, U.C. 2005. Biochemical characterisation of extracellular phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) from a hyper-producing strain of *Aspergillus niger* van Teighem. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 32: 141–147.
- Viveros, A., Centeno, C., Brenes, A., Canales, R., and Lozano, A. 2000. Phytase and acid phosphatase activities in plant feedstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48: 4009–4013.

- Vohra, A. and Satyanarayana, T. 2001. Phytase production by the yeast, *Pichia anomala*. **Biotechnology Letters**, 23: 551–554.
- Vohra, A. and T. Satyanarayana. 2002. Purification and characterization of a thermostable and acid-stable phytase from *Pichia anomala*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 18: 687–691.
- Vohra, A. and T. Satyanarayana. 2003. Phytases: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, 23: 29-60.
- Volfova, O., Dvorakova, J., Hanzlikova, A., Jandera, A. 1994. Phytase from *Aspergillus niger*. **Folia Microbiologica**, 9: 481–484.
- Wang, X.Y., Meang, F.G. and Zhou, H.M. 2004. The role of disulfide bonds in the conformational stability and catalytic activity of phytase. **Biochemistry Cell Biology**, 82: 329–334.
- Wang, Y., Wu, Y., Han, J., Fu, S., Guo, S. and Shen, Z. 2013. Production and Characterization of a thermostable beta-propeller phytase from *Bacillus licheniformis*. **African Journal of Microbiology Research**, 7: 1745-1751.
- Weremko, D., Fandrejowski, H., Zebrowska, T., Han, K., Kim, J. H., & Cho, W. T. 1997. Bioavailability of phosphorus in feeds of plant origin for pigs. **Asian-Australians Journal of Animal Sciences**, 10: 551–566.
- Wise, A. and Gilbert, D.J. 1982. Phytate hydrolysis in germfree and conventional rats. **Applied Environmental Microbiology**, 43: 753–756.
- Wiseman, A. 1987. The Application of Enzymes in Industry. Handbook of Enzym Biotechnology (Wiseman, A.), John Wiley Sons, p:274-373, New York.
- Wodzinski, R.J., Ullah, A.H.J., 1996. Phytase. **Advances in Applied Microbiology**, 42, 263–303.
- Wolfson, D., Olmstead, S., Meiss, D., and Ralston, J., 2008. Making sense of digestive enzymes, KLAIRE LABSTM™. A division of ProTheraR, Inc.
- Woyengo, T.A and Nyachoti, C.M. 2011. Supplementation of phytase and carbohydrase to diets for poultry. **Canadian Journal of Animal Science**, 91: 177-192
- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Rémy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehmann, M. and van Loon, A.P.G.M. (1999a). Biochemical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Catalytic properties. **Applied Environmental Microbiology**, 65: 367–373.

- Wyss, M., Pasamontes, L., Friedlein, A., Rémy, R., Tessier, M., Kronenberger, A., Middendorf, A., Lehmann, A., Schoebelen, L., Röthlisberger, U., Kuszniir, E., Wahl, G., Müller, F., Lahm, H.W., Vogel, K. and van Loon, A.P.G.M. (1999b) Biophysical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, 65: 359–366.
- Yabe K., Ando, Y., Ito, M. and Terakadon. 1987. Simple Method for Screening Aflatoxin-Producing Molds by UV Photography. **Applied and Environmental Microbiology**, 53: 230-234.
- Yamada, K., Minoda, Y., Yamamoto, S. 1968. Phytase from *Aspergillus terreus*. Part I. Production, purification and some general properties of the enzyme. **Agricultural Biology Chemistry**, 32: 1275-1282.
- Yanke, L.J., Bae, H.D., Selinger, L.B. and Cheng, K.J.1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. **Microbiology**, 144, 1565–1573.
- Yanke, L.J., Selinger, L.B. and Cheng, K.J. 1999. Phytase activity of *Selenomonas ruminantium*: a preliminary characterization. **Letters in Applied Microbiology**, 29:20–25.
- Yoo, G.Y., Wang, X., Choi, S., Han, K., Kang, J.C., and Bai, S.C., 2005. Dietary microbial phytase increased the phosphorus digestibility in juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegeli* fed diets containing soybean meal. *Aquaculture*, 243: 315–322.
- Yoon, S.J., Choi, Y.J., Min, H.K., Cho, K.K., Kim, J.W., Lee, S.C., Jung, Y.H., 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, 18: 449-454.
- Yu, P. and Chen, Y. 2013. Purification and characterization of a novel neutral and heat- tolerant phytase from a newly isolated strain *Bacillus neasonii* ZJ0702. **BMC Biotechnology**, 13:78.
- Zhang, G.Q., Dong , X.F., Wang, Z.H., Zhang, Wang, Q. H.X., Tong, J.M. 2010. Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. **Bioresource Technology**, 101: 4125–4131
- Zhu, M. J., Wang, H. X. and Ng, T. B. 2011. Purification and identification of a phytase from fruity bodies of the winter mushroom, *Flammulina velutipes*. **African Journal of Biotechnology**, 10: 17845-17852.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sedef SOYAL
Doğum Yeri ve Tarihi : Keçiören/ 12.03.1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİM FAALİYETLERİ

A) Ulusal Bildiriler

1. *Aspergillus tubingensis* tarafından üretilen fitaz enziminin üretimi ve karakterizasyonu. Sedef Soyal, Kubilay METİN. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, Türkiye.
2. *Aspergillus niger* tarafından üretilen fitaz enziminin üretimi ve karakterizasyonu. Nilay Ezgi ÇAKAR, Sedef SOYAL, Kubilay METİN. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, Türkiye

B) Katıldığı Projeler

Adnan Mendere Üniversitesi Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı tarafından desteklenen ve 2012 yılında başlatılan "*Aspergillus* sp.'den Fitaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu" (FEF-13011) adlı kişisel araştırma projesi Doç.Dr. Kubilay Metin ve Yüksek Lisans öğrencisi Nilay Ezgi Çakar ile birlikte hala devam etmektedir.

İLETİŞİM

E-posta Adresi : sedef-soyal@hotmail.com
Tarih : 19.08.2014