



**DOĞAL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN
Lactobacillus brevis'İN 16S rRNA İLE MOLEKÜLER
TANILANMASI, FİTAZ ENZİMİ AKTİVİTESİ,
ENDÜSTRİYE KAZANDIRILABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Osman MALKOÇ

Yüksek Lisans Tezi

**Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı**

2017

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOĞAL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *Lactobacillus brevis*'İN
16S rRNA İLE MOLEKÜLER TANILANMASI, FİTAZ ENZİMİ
AKTİVİTESİ, ENDÜSTRİYE KAZANDIRILABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

Osman MALKOÇ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2017

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**DOĞAL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *Lactobacillus brevis*'İN 16S rRNA İLE
MOLEKÜLER TANILANMASI, FİTAZ ENZİMİ AKTİVİTESİ, ENDÜSTRİYE
KAZANDIRILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ danışmanlığında, Osman MALKOÇ tarafından hazırlanan bu çalışma, 03/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı - Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (3./3)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç.Dr. Emine ORHAN

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 13.../07.../2017 tarih ve 28.../...30..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DOĞAL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *Lactobacillus brevis*'İN 16S rRNA İLE MOLEKÜLER TANILANMASI, FİTAZ ENZİMİ AKTİVİTESİ, ENDÜSTRİYE KAZANDIRILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Osman MALKOÇ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Literatürde tanımlanan fitaz aynı zamanda kimyasal adıyla myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase olarak ta bilinmektedir. Fitazlar; bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Mikrobiyal kaynaklı fitazlar biyoteknolojik uygulamalar için tercih edilmektedir. Fitazlar; gıda sanayinde, yem katkısında, kağıt endüstrisinde ve toprak iyileştirmede tercih edilmektedir. Biyoteknolojide ise fitaz enzimi çalışmaları, enzimi gerek üretmede gerekse özelliklerinin geliştirilmesinde kullanılacak olan etkin bir araçtır.

Bu çalışmada, taze kaşar peynirinden izolasyonu yapılmış olan *Lactobacillus brevis* suşunun 16S rRNA ile moleküler tanımlanması, bakterinin fitaz enzimi aktivitesi ve endüstriye kazandırılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bakteri 16S rRNA yöntemi ile tanımlanmıştır. % 99 oranında tanımlanan *Lactobacillus brevis*'ten üretilen ekstraselüler fitaz enziminin optimum sıcaklığı 50°C, optimum pH'sı ise 3,0 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre bu bakterinin ürettiği enzimin karakteristik özelliklerinden dolayı endüstriye kazandırılabilceği, gıda sektöründe starter kültür olarak kullanılabileceği çalışmamızla teyit edilmiştir.

2017, 48 sayfa

Anahtar Kelimeler: 16S rRNA, Fitaz, *Lactobacillus brevis*

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

A STUDY ON THE MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Lactobacillus brevis* ISOLATED FROM NATURAL SOURCES BY 16S rRNA, PHYTASE ENZYME ACTIVITY AND ITS POTENTIAL INDUSTRIAL BENEFITABILITY

Osman MALKOÇ

Atatürk University
Institute of Science and Technology
Department of Agricultural Biotechnology
Branch of Enzyme and Microbial Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

The phytase identified in the literature is also known as myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase with its chemical name. Phytases are produced by plants, animals and microorganisms. Microbial-derived phytases are preferred for biotechnological applications. Phytases are preferred in food industry, feed additives, paper industry and soil improvement. In biotechnology, phytase enzyme studies are an effective tool to be used in the production of enzymes, or in the development of their properties.

The aim of this study was to investigate the molecular identification of *Lactobacillus brevis* strain isolated from Kashar cheese by 16S rRNA, to determine its phytase enzyme activity and to evaluate its possible industrial benefitability. The identification was performed using the 16S rRNA method. The identification rate of *Lactobacillus brevis* was 99% and the optimum temperature of the extracellular phytase enzyme was determined as 50°C and the optimum pH was pH 3.0. According to the results, it has been confirmed with our study that the bacterium can be introduced to the industrial use due to the characteristics of the enzyme produced by this bacterium and that it can be used as a starter culture in the food industry.

2017, 48 pages

Keywords: 16S rRNA, Phytase, *Lactobacillus brevis*

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde göstermiş olduğu her türlü yardım ve katkılarından dolayı danışman hocam Sayın Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ'a, teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca çalışmalarımnda her daim yanımda olan yüksek lisans arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan ve maddi manevi desteklerini esirgemeyen aileme, minnettar olduğumu bildirmek isterim.

Osman MALKOÇ

Temmuz, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Lactobacillus</i> Cinsi.....	1
1.1.1. <i>Lactobacillus brevis</i>	1
1.2. Enzimler	2
1.2.1. Yapısı.....	2
1.2.2. Sınıflandırma ve adlandırma	5
1.3. Fitaz Enzimi	7
1.3.1. Tarihçesi ve kimyasal yapısı	7
1.3.2. Karakteristik özellikleri	9
1.3.2.a. Substrat spesifikliğı	10
1.3.2.b. Optimum ph ve sıcaklık	10
1.3.2.c. Termostabilite	10
1.3.2.4 Proteoliz dirençliliğı	11
1.4. Fitaz Enziminin Kaynakları.....	11
1.4.1. Bitkisel fitazlar	11
1.4.2. Hayvansal fitazlar.....	12
1.4.3. Mikrobiyal fitazlar.....	12
1.5. Fitazın Biyoteknolojide Kullanımı	13
2. KAYNAK ÖZETİ.....	14
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar	21
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	22

3.1.3. Kullanılan kitler.....	22
3.1.4. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı	22
3.2. Yöntem	26
3.2.1. Mikroorganizma izolasyonu ve identifikasyonu	26
3.2.2. Morfolojik özelliklerin belirlenmesi	27
3.2.3. Çalışmada kullanılan bakteri kültürlerinin muhafazası.....	28
3.2.4. Mikroorganizmanın moleküler tanılanması	28
3.2.4.a. Bakteri izolatların DNA izolasyonu	28
3.2.4.b. 16S rRNA bölgesinin PCR yardımı ile çoğaltılması.....	29
3.2.4.c. DNA dizi analizlerinin alınması ve sonuçların değerlendirilmesi.....	30
3.2.5. Bakterilerin inokülasyonu	30
3.2.6. Enzim aktivitesinin ölçülmesi	31
3.2.6.a. Enzimin optimum pH değerinin saptanması	31
3.2.6.b. Enzimin optimum sıcaklık değerinin saptanması.....	32
4. ARAŞTIRMA ve BULGULAR.....	33
4.1. Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi	33
4.2. Moleküler Yöntem ile <i>Lactobacillus brevis</i> 'in Tanınması.....	34
4.2.1. DNA izolasyon sonucu.....	34
4.2.2. PCR sonuçlarının jel görüntüsü.....	34
4.2.3. Dizi analizi sonuçları.....	35
4.3. Fitaz Aktivitesi Sonuçları	36
4.3.1. Fitaz enziminin optimum pH sonuçları	36
4.3.2. Fitaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları	37
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	39
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	49

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	Adenozin Trifosfat
DMSO	Dimetilsülfoksit
EC	Enzim Komisyonu
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten sabiti
L	Litre
LAB	Laktik Asit Bakterileri
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NCBI	Uluslararası Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
nm	Nanometre
rpm	Dakikada devir sayısı
sp.	Species (tür, tekil)
TCA	Trikloroasetik asit
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
U/mg	Unit/miligram
unit/μl	Unit/mikrolitre
v/v	Hacim/Hacim (volüme/volüme)
°C	Santigrat
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enzimlerin genel yapısı	3
Şekil 1.2. Anahtar-kilit modeli	4
Şekil 1.3. İndüklenmiş uyum modeli	4
Şekil 1.4. Suzuki et al. (1907) tarafından önerilen fitin yapısı	8
Şekil 1.5. (A) Neuberg (1908) ve (B) Anderson (1914) tarafından önerilen fitat (fitik asit) yapısı	8
Şekil 1.6. Fitik asit (myo-inositol-1, 2, 3, 4, 5, 6 hexafosfat)	9
Şekil 4.1. <i>Lactobacillus brevis</i> bakterisinin koloni görünümü	33
Şekil 4.2. <i>Lactobacillus brevis</i> (NL-2)'in DNA izolasyon sonucu elektroforezde görünümü	34
Şekil 4.3. <i>Lactobacillus brevis</i> (NL-2)'in PCR sonucu jel görüntüsü	35
Şekil 4.4. <i>Lactobacillus brevis</i> izolatından 16S rRNA gen bölgesine ait dizi analizi sonucu	36
Şekil 4.5. <i>Lactobacillus brevis</i> 'den elde edilen ekstraselüler fitaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	37
Şekil 4.6. <i>Lactobacillus brevis</i> 'den elde edilen ekstraselüler fitaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. IUBMB tarafından tercih edilen enzim sınıflandırılması	6
Çizelge 4.1. <i>Lactobacillus brevis</i> 'in optimum pH absorbans (A) değerleri	37
Çizelge 4.2. <i>Lactobacillus brevis</i> 'in optimum sıcaklık absorbans (A) değerleri	38



1. GİRİŞ

Biyoteknoloji terimi, canlı sistemler üzerindeki uygulamalara dayalı bir grup teknolojiyi ifade eder (Garrett 2009). Biyoteknoloji; moleküler biyoloji, genetik mühendisliği, biyokimya ve mikrobiyoloji gibi değişik bilim dallarından faydalanır (Sáez *et al.* 2008) ve bu bilim dallarının uygulamaları ile insanların faydalanması için gıda, ilaç ve kimyasal üretimi amaçlar (Pattinson *et al.* 2001). Artan nüfus nedeniyle insanların ihtiyaçları arttığından oluşan problemlere biyoteknoloji gibi alanlarla bilim insanları çözümler aramaktadırlar.

1.1. *Lactobacillus* Cinsi

Lactobacillus cinsinin en belirgin özelliği karbonhidratları parçalaması sonucu laktik asit oluşturmastır. Yapısı hareketsiz, kapsülsüz, sporsuz, gram pozitif, anaerop veya mikroaerofil, kalın bazen ince, görünimleri polimorf yapılı, tekli bazen kısa zincirler halindeki bakterilerdir. Zenginleştirilmiş besiyerlerinde daha kolaylıkla üreme gösterirler. 5-55°C’de ve pH 5-6 sınırlarında daha iyi çoğalırlar (Anonim 2016a).

1.1.1. *Lactobacillus brevis*

Lactobacillus brevis, fermantasyon sırasında CO₂ ve laktik asit oluşturan, heterofermantatif olan gram pozitif yapısında ve çubuk şeklinde bir laktik asit bakteri türüdür. Yaklaşık olarak 16 farklı suşu mevcuttur (Pavlova *et al.* 2002). Fermente gıdalar gibi birçok farklı ortamda ve normal mikrobiyal biyotada rastlanabilir. Genellikle turşu gibi yiyeceklerde bulunur. *L. brevis*’in başlıca metabolitleri laktik asit ve etanoldür (Pidoux 1989).

1.2. Enzimler

C, H, O ve N'tan meydana gelen, hücrelerde meydana gelen biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen, vücuttaki biyokimyasal olayların yaşamsal faaliyetler ile uyumunu sağlayan biyolojik sistemlerin katalizörleridir (Karademir *et al.* 2002; Nelson and Cox 2004). Enzimler aktivasyon enerjilerinde düşüş yaratarak çeşitli biyokimyasal reaksiyonların hızını arttırlar. Enzimlerin en önemli özelliklerinden birisi de spesifik aktivite gösterebilmeleridir. Enzimler tarafından katalizlenen bir tepkimede öncelikle enzim substrat ile kimyasal ve kimyasal olmayan bağlarla birbirine bağlanarak enzim-substrat ara kompleksi oluşur. Reaksiyonun devamında ise ara kompleks sonucu ürün oluşurken enzim serbest hale gelerek tekrar aynı reaksiyon döngüsüne katılır (Bohn *et al.* 2008).

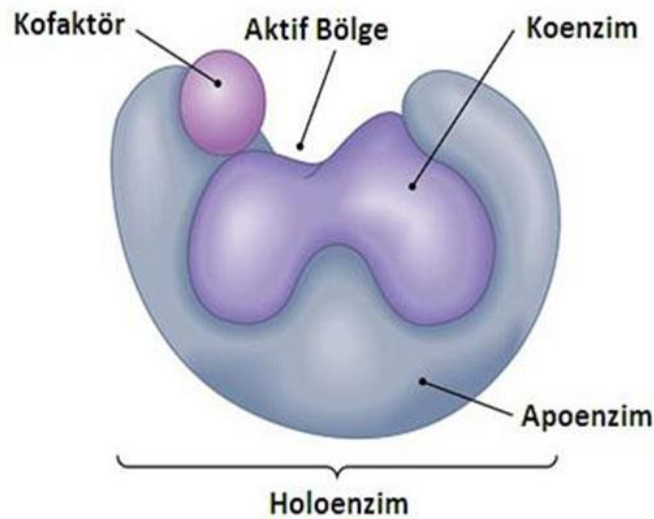
Enzimler protein yapılıdır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu bazı RNA moleküllerinin de (L19 RNA, snRNA vs) enzim aktivitesi gösterdikleri saptanmıştır. Genetik biliminde transkripsiyonun ardından RNA'daki intron adı verilen kodlanmayan bölgeler RNA'dan çıkarılarak sadece ekson adı verilen kodlanan bölgelerin birleştirilmesi splicing mekanizması olarak adlandırılır. Ökaryotlarda ekson bölgelerinin birleştirilmesi sonucunda öncül mesajcı RNA (pre-mRNA) olgun mRNA'ya dönüşür. Oluşan mRNA protein sentezinde başlatıcı görev görür. RNA'dan intron bölgelerinin çıkarılıp kalan ekson bölgelerinin birleştirilmesi süreci Philip Sharp ve Richard J. Roberts tarafından 1977'de keşfedilmiştir (Brocades 1991; Brinch-Pedersen *et al.* 2000).

1.2.1. Yapısı

Bütün enzimler protein yapısındadır. Ancak buna istinaden katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu da enzimdir. Enzimlerdeki katalitik aktivite, protein konformasyonlarının bütünlüğü ile doğru orantılıdır. Enzimin katalitik aktivitesi, enzimin denatüre edilmesi veya alt ünitelerine ayrıştırılması sonucu kaybolur. Bir enzimin katalitik aktivitesi amino asit komponentlerinin yıkımına göre değişkenlik

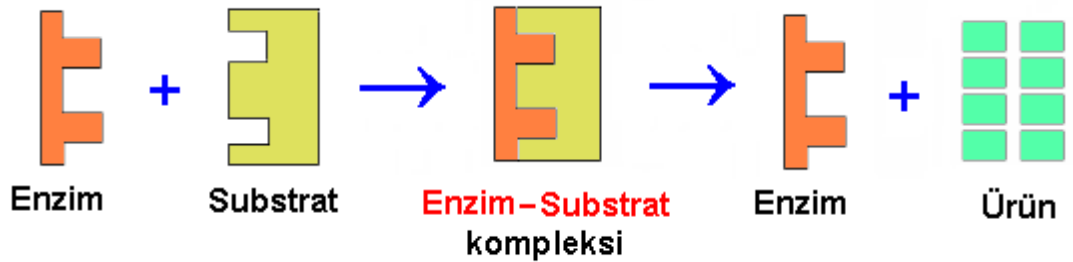
gösterir. Bu değişkenlik sonucu katalitik aktivite daima bozulur. Bu sebeptendir ki katalitik aktivite için enzimlerin primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapıları gereklidir (Nelson and Cox 2004).

Enzimlerin bazıları sadece proteinden meydana gelmesine rağmen çoğu enzimler fonksiyon ve yapı ve itibariyle iki farklı gruptan meydana gelmektedir. Bunlardan biri “Apoenzim” diğeri ise “Koenzim/Kofaktör”dür. Enzimin spesifikliğini belirleyen (yalnız belirli reaksiyonları katalizleyen) kısmı Apoenzim olarak adlandırılır. Bu grup sadece proteinden oluştuğu için ısı ile kolayca denatüre olabilmektedir. Bazı enzimler aktiviteleri için yapısında bulunan amino asit rezidülerinden (amino asidin su kaybetmesiyle arta kalan kısmı) başka kimyasal komponente gerek duymazlar. Fakat bazı enzimlerse kofaktör olarak adlandırılan ek bir kimyasal komponente gereksinim duyarlar. Kofaktör, Fe^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon olabilmesine karşın, koenzim adı verilen organik veya metalloorganik yapıda kompleks bir molekül olabilir. Koenzim kendi varlığında bir etki gösteremez. Ancak apoenzim varlığında etkinlik gösterebilmektedir. Koenzimler enzim proteinine kovalent olarak çok sıkı bir şekilde bağlanırsa oluşan yapı “prostetik grup” olarak adlandırılır. Bu yapı apoenzim ile birleşirse “Holoenzim” adını alır (Şekil 1.1)(Pandey and Ramachandran 2006).



Şekil 1.1. Enzimlerin genel yapısı (Anonim 2016b)

Substrat, enzimin etki ettiği bileşiğe denir. Enzim- substrat reaksiyonu sonucu oluşan maddeye de ürün adı verilir. Enzim ile substrat kompleksinin birbirine bağlanması ile ilgili 2 teori ortaya atılmıştır. İlk teori 1894'te Emil Fischer tarafından ortaya atılan anahtar-kilit modelidir. Bu modelde substrat enzimin yapısal olarak aktif bölgesine anahtar-kilit uyumu gibi bağlandığı için bu teori kabul edilmiştir (Şekil 1.2). Diğer model ise 1958'de Daniel Koshland tarafından ortaya atılan indüklenmiş-uyum modelidir (Şekil 1.3). Bu modelde ise enzim substrat yokluğunda serbest halde bulunur. Enzim ortama gelen substrat varlığında, substratını katalize edebilmek için uygun şekilde bağlayacak biçimsel bir değişikliğe uğrar. Enzimin bağlı olduğu substrat parçalandığı zaman ve reaksiyon sona erdiğinde enzim hiçbir değişime uğramadan çıkar. Ve bu nedenledir ki enzimler bu özelliklerden dolayı tekrar tekrar kullanılabilirler. Enzimler genellikle geri dönüşümlüdür yani çift yönlü çalışırlar (Nelson and Cox 2004; Açıklık ve Çelebi 2006; Anonim 2016c).



Şekil 1.2. Anahtar-kilit modeli (Anonim 2017a)



Şekil 1.3. İndüklenmiş uyum modeli (Anonim 2017b)

Enzimlerin özgüllüğü veya spesifikliğı, katalize ettikleri mevcut reaksiyonlar ile ilgili özellikleridir. Enzimlerin spesifisifiklikleri 4 grup altında toplanır.

1) Mutlak spesifiklik: Bir enzimin, sadece kendine özgü bir substratın kendine özgü bir reaksiyonunu katalize etmesine dayanır.

2) Grup spesifikliğı : Benzer fonksiyonel grupları (amino, metil, fosfat) içeren substrat ile enzimin reaksiyona girmesi durumudur.

3) Bağ spesifikliğı: Belli bağ tipleri (proteinlerin peptid bağı gibi) üzerine enzimin etkili olmasıdır.

4) Stereokimyasal spesifiklik: Bir bileşiğin yalnızca bir stereokimyasal şekli üzerine enzimin etkili olmasıdır. Örneğin; arjinaz enzimi, arjininin L formunu etkiler iken D formunu etkilemez (Açıkel ve Çelebi 2006; Anonim 2017c).

1.2.2. Sınıflandırma ve adlandırma

Enzimler aktif veya inaktif durumlarına göre adlandırılır. İnaktif durumdaki enzimlerde substratlarının sonuna “jen” eki getirilerek adlandırma yapılır. Örneğin; tripsinojen. Aktif durumdaki enzimlerde ise parçaladıkları ve çözdükleri substratın sonuna “ase=az” eki getirilerek adlandırma yapılır. Örneğin; üreye etki eden enzim üreaz olarak adlandırılır (Anonim 2016c). Pepsin, amigdalın, zimaz, pityalin gibi aktivitelerini veya substratlarını tanımlamayan ve aynı zamanda genel tanıma da uymayan enzim adlandırması da kullanılmıştır. Karışık adlandırmaların sonucu olarak aynı enzimde farklı adlar kullanıldığından dolayı adlandırmada sorunlar meydana gelmiştir. Bunun sonucunda oluşan karışıklığı önlemek amacıyla enzimleri adlandırmak ve sınıflandırmak için “Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB)” tarafından tercih edilen sistematik adlandırmada enzimler altı ana sınıfa ayrılmaktadır (Çizelge 1.1) (Hooper and Hames 2005). Bunlar;

Çizelge 1.1. IUBMB tarafından tercih edilen enzim sınıflandırılması (Anonim 2016c)

1. Oksidoredüktazlar	Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir. Oksidasyon reaksiyonu; moleküle oksijen (O) eklenmesi veya molekülden hidrojen (H) ayrılması sonucu + değer artmasıyla olur. Redüksiyon reaksiyonu ise; moleküle hidrojen (H) eklemekle veya molekülden oksijen (O) ayrılmakla yani + değer azalmasıyla olur. Bu tepkimelerden sorumlu enzimler ise 2 alt gruba ayrılmıştır. a)Dehidrogenazlar: Hidrojen (H) aktaran ve taşıyan enzimlerdir. b) Oksidazlar: Elektron aktaran ve kaybeden enzimlerdir.
2. Transferazlar	Molekülden H^+ (hidrojen iyonu) dışında, C, N ve fosfor taşıyan gruplar gibi başka grupların bir molekülden diğerine transferini katalize eden enzimlerdir.
3. Hidrolazlar	Su katılması nedeniyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir.
4. Liyazlar	C-C, C-N, C-O ve C-S bağlarını hidroliz ve yükseltgenme dışında bir mekanizma ile kıran enzimlerdir.
5. İzomerazlar	Molekül içinde birtakım değişiklikler yaparak onun uzayda dizilişini değiştiren enzimlerdir.
6. Ligazlar	Bu enzimler, yüksek enerjili fosfatların enerjisini kullanarak karbon (C) ile N, C, O, S arasında bağ oluşumunu katalizler.

Sistematik adlandırmada karışıklığı önlemek adına her bir enzime enzim komisyonu (EC) tarafından dört rakamlı kod numarası verilir. Aynı zamanda katalizlediği reaksiyonu tanıtan sistematik ad verilmektedir. Örneğin; bir fosfat grubunu ATP'den glukoz transferini katalize eden ATP:glukoz fosfotransferaz enzimi gibi. ATP:glukoz fosfotransferazın kod numarası 2. 7. 1. 1 dir. Burada birinci sıradaki rakam tepkimenin tipi veya sınıf adını (2; transferaz) belirtir. İkinci sıradaki rakam, donörün ilgili grubunu belirten alt sınıfı (7; fosfotransferaz) belirtir. Üçüncü sıradaki rakam, akseptörün ilgili

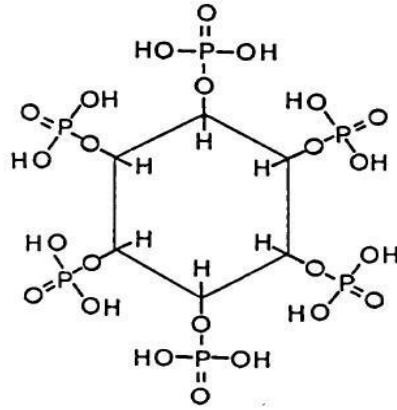
grubunu (1; -CH-OH) belirtir. Dördüncü sıradaki rakam ise akseptör olan substratı (1; glukoz) ifade eder (Nelson and Cox 2004; Anonim 2016c).

1.3. Fitaz Enzimi

Fitaz, kimyasal adıyla myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase olarak bilinmektedir. Literatüre 1907 yılında geçmiştir. Fitazlar, fosfomonoesterazlar sınıfına aittir. Fitik asitten fosfatın ayrılmasını ya da fitatın redükte edilmiş inositol fosfat esterlere ve inorganik fosfata hidrolizini katalize eder (Lei and Porres 2003; Konietzny and Greiner 2004). Fitazlar, 40-100 kDa molekül ağırlığına sahip monomerik proteinlerdir. Optimum pH 4.5-6.0 ve sıcaklığı 45-60°C'dir (Pandey *et al.* 2001).

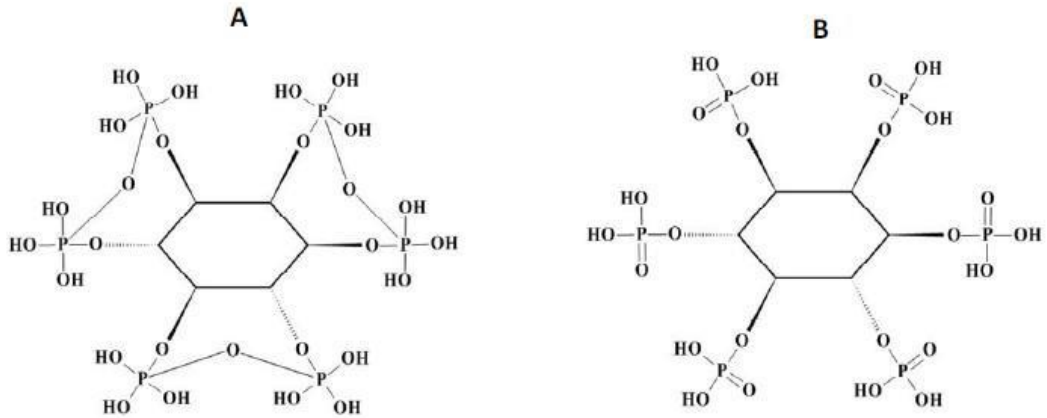
1.3.1. Tarihçesi ve kimyasal yapısı

T. Hartig, 1855-1856 yıllarında birçok bitki tohumundan nişastasız küçük tanecikleri izole etmiş; bu tanecikleri tohumun çimlenmesi ve bitkinin büyümesi için gerekli olan maddelerin kaynağı olarak düşünmüştür (Scott 1986a; Kim *et al.* 1999). Pfeffer (1872), T. Hartig tarafından izole edilen bu taneciklerin magnezyum, fosfor ve kalsiyum içerdiğini bulmuştur. Ayrıca tanecikler içinde organik maddelerin de bulunduğu gözlemlenmiş ve fosfatın karbonhidratla birleştiği tahmin edilmiştir. Bu sebeple inosite-fosforik asit (fitin) olarak isimlendirilmesi önerilmiştir; çünkü fosforik asit ile hidrolize edildiğinde inositolün açığa çıktığı gözlemlenmiştir (Schulze and Winterstein 1896). Posternak (1903) bu bileşik üzerinde yapmış olduğu fiziksel ve kimyasal çalışmalar sonucunda bileşiğin “fitin” olarak adlandırılmasına karşı çıkmıştır. Pirinç kepeğinden elde edilen fitinden inositolün ayrıştırılabilmesi ile Suzuki *et al.* (1907) fitinin yapısını çizebilmişlerdir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Suzuki *et al.* (1907) tarafından önerilen fitin yapısı

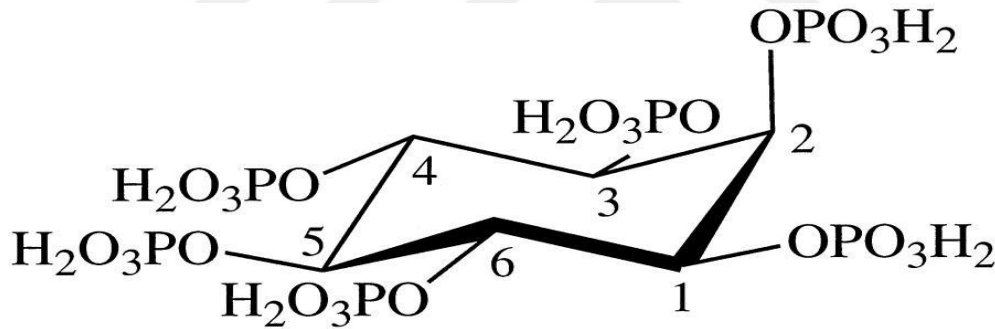
Fitik asit'in kimyasal yapısı hakkında çeşitli bilim adamları farklı önerilerde bulunmuş olsalar da en çok C. Neuberg ve R.J. Anderson'nın tavsiyeleri ön plana çıkmış ve tartışma konusu olmuştur. C. Neuberg üç adet su molekülünün fosforlar arasında güçlü bağlar oluşturduğunu önerirken R.J. Anderson ise fosforlar arasında bağ bulunmadığını önermiştir (Lehmann *et al.* 2000; Rodriguez *et al.* 2000; Mullaney *et al.* 2002) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. (A) Neuberg (1908) ve (B) Anderson (1914) tarafından önerilen fitat (fitik asit) yapısı (Tran 2010)

Fitik asidin konformasyonel yapısı X-ışını (Truter and Tate 1970; Blank *et al.* 1971) ve ^{31}P -NMR (Johnson and Tate 1970; Isbrandt and Oertel 1980) ile tespit edilmiştir. Johnson ve Tate (1969) C-2 pozisyonundaki fosfatın ekselel konumda, diğel fosfatların (C-1, C-3, C-4, C-5, C-6) ise ekvatorial konumda olduğunu ileri sürmüştür. Bunun aksine Blank ve arkadaşları (1971) C-1, C-3, C-4, C-5 ve C-6 konumundaki fosfatların ekselel pozisyonda, C-2 konumundaki fosforun ise ekvatorial pozisyonda olduğunu öne sürmüştür (Isbrandt and Oertel 1980).

Fitik asit, myo-inositol halkası ve buna bağlı inorganik fosfattan oluşan serbest bir ester asididir (Wyss *et al.* 1999a) (şekil 1.6). Günümüzde fitik asit, Myo-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6 hexakisfosfat olarak adlandırılmaktadır (IUPAC-IUB 1977). Moleküler formülü $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$ ve moleküler ağırlığı $660.04 \text{ g mol}^{-1}$ dur (Kumar *et al.* 2010).



şekil 1.6. Fitik asit (myo-inositol-1, 2, 3, 4, 5, 6 hexafosfat) (Wyss *et al.* 1999a)

Fitazlar optimum pH 5.0 değerinde en iyi aktiviteyi gösterir iken, alkalın fitazlar; pH 8.0'e yakın değerlerde en iyi aktivite gösterirler (Baruah *et al.* 2007).

1.3.2. Karakteristik özellikleri

Fitaz aktivitesi, genellikle belli sıcaklık ve pH şartlarında sečilmiř olan substrattan her dakika başına serbest halde bulunan inorganik fosfat miktarını ölçmektedir. Diğel bütün enzimlerde de olduğu gibi fitaz aktivitesi enzimin doğal özelliklerinden ve ortam

şartlarından etkilenmektedir. Fitazın özellikleri aşağıdaki gibi pratik öneme sahiptir (Lei and Porres 2003)

1.3.2.a. Substrat spesifikliğı

Substrat spesifikliğı ve farklı fitazların afinitesi üzerine sıkça arařtırmalar yapılmıřtır (Ullah and Phillippy 1994; Wyss *et al.* 1999a; Greiner and Farouk 2007). Fitik asite karřı yüksek afiniteye sahip olan fitazlar mikrobiyal fitazlar grubudur. Buna raėmen bitki fitazları ve *Aspergillus fumigatus* gibi fungal fitazlar daha geniř substrat spesifikliėine sahiptir. Bu yůzden bitki fitazları ve fungal fitazlar, fitik asidi daha alt inositol fosfatlara indirgerler (Wyss *et al.* 1999a). Fitazların çoėu, son őrűn olarak fitik asidi inositol monofosfat estere indirgeme yeteneėine sahiptir (Ullah and Phillippy 1994; Wyss *et al.* 1999a; Greiner and Farouk 2007), Ancak *Bacillus sp.* fitazları tercihen komřu fosfat őrűrinde hidrolizi her saniye gerėekleřtirerek son őrűn olarak fitik asidi inositol trifosfata indirgemektedirler (Kerovuo and Tynkkynen 2000)

1.3.2.b. Optimum ph ve sıcaklık

Gűnűműze kadar izole edilen çoėu fitaz enziminin optimum pH aralıėı 4.5-6.0 aralıėında olduėu bilinmektedir. Ama *Bacillus sp.*'den izole edilen fitazlar alkali veya nűtr optimum pH'ya sahip olduėu da arařtırmalarda gűrűlműřtűr (Kim *et al.* 1998; Choi *et al.* 2001). Bitkisel ve mikrobiyal fitazların birėoėunda optimum sıcaklık 45-60°C arasında deėiřiklik gűstermektedir. Yűksek optimal sıcaklıklar, kanatlı ve domuzların (37-40°C) mide sıcaklıklarında fitazların tűm aktivitesini engellemekte, buna karřın balıklarda ise fitazların performansını dűřűrmektedir (Lei and Porres 2003).

1.3.2.c. Termostabilite

Ticari yemlerde genellikle peletlenme oluřtuėu iėin proses ařamasında yűksek sıcaklık (60-80°C) ve buhar iřlemi kullanılmaktadır. Ayrıca proses ařamasında meydana gelen aktivite kaybından kaėınmak iėin bűtűn yem enzimleri stabil ısıya ihtiyaė duyarlar.

Termostabil enzimlerde görülen dezavantajın en önemli olanı, genellikle sabitlik ile ilişkili olmasıdır. Bu nedenle proteinin esnekliğinde azaltma yaparak ortam sıcaklıklarında düşük spesifik aktivite gösterirler. Fitazlarda kimyasal kaplama, ısı stabiliteilerinin geliştirilmesi için kullanılmıştır. Lakin bu işlem midedeki enzimlerin fonksiyonunu ve miktar salınımını bir şekilde riske atmaktadır. Peletleme esnasında uygulanan 65-95°C'lerdeki sıcaklıklarda oluşabilecek olan herhangi bir aktivite kaybından ötürü peletleme işleminden sonra püskürtme yöntemi ile fitaz sıvı halde yemlere uygulanmaktadır. Fakat bu uygulamada iş gücü ve maliyet oldukça yüksektir (Lei and Porres 2003; Aşan 2007).

1.3.2.4 Proteoliz dirençliliği

Sindirim sisteminde proteinazlar tarafından meydana gelebilecek hidrolitik parçalanmalara karşı fitaz enziminin etkili ve güçlü bir dirence sahip olması gerekmektedir. Bakteriyel ve fungal fitazlar, tripsin ve pepsine farklı hassasiyet gösterirler (Kerovuo *et al.* 1998; Rodriguez *et al.* 1999). Bakteriyel fitazların proteolitik parçalanmalara karşı olan dirençliliği fungal fitazlara nazaran daha fazladır (Igbasan *et al.* 2000). Fitazların proteaza hassas olan bölgeleri, Site-Directed Mutagenesis kullanılarak moleküllerin yüzeyinde maruz kalan kısımlar değiştirilmiş veya engellenmiştir (Wyss *et al.* 1999b).

1.4. Fitaz Enziminin Kaynakları

1.4.1. Bitkisel fitazlar

Bitkilerden elde edilen fitazlar genelde optimum sıcaklığı 38-55°C ve optimum pH'sı 4.5-6.0 aralığında olan histidin asit fosfatazlardır. Bununla beraber bitkisel fitazların kinetik özelliklerinde bariz büyük farklılıklar bulunmaktadır (K_m 30-300 μM ; k_{cat} 43-704 s^{-1} ve spesifik aktivite 43-636 U/mg protein). Moleküler ağırlıkları 47-76 kDa'dur (Lei *et al.* 2007). Bitkisel kaynaklı fitazların çeşitliliği ve stabilitesinin düşük olması

rasyonlarda güvenilir enzim kaynakları olarak kullanımını sınırlandırmaktadır (Angel *et al.* 2002).

1.4.2. Hayvansal fitazlar

Çeşitli hayvan türlerinin dokularında fitaz aktivitesi tespit edilmesine rağmen (Bitar and Reinhold 1972), hayvansal kaynaklı fitazların hiçbirinde moleküler karakterizasyon tamamlanmamıştır. Hayvansal kaynaklı fitatların Km değeri, 0.03-2.6 mM aralığında değişmektedir. Hayvansal fitazlar alkali ve nötral aralıkta optimum pH göstermesine rağmen, kümes hayvanlarının bağırsak epitel hücrelerinde yapılan bir çalışmada, optimum pH'nın 5.5-6.0 aralığında olduğu gösterilmiştir (Ellestad *et al.* 2002).

Hayvansal kaynaklı fitazlar bağırsak epitel hücre zarından izole edilmiş olsa da (Maenz and Classen 1998; Ellestad *et al.* 2002; Angel *et al.* 2002), tek mideli hayvanlarda besinsel fitat fosforunun kullanılabilirliğini arttırmak için, düşük maliyetli dış kaynaklı (eksojen) fitazın ilave edilmesi hayvansal fitazla ilgili çalışmaları gölgede bırakmıştır. Rumen veya kalın bağırsakta bulunan fitaz aktivitesi esasen mikrobiyal kaynaklıdır (Wise and Gilbert 1982; Yanke *et al.* 1998).

1.4.3. Mikrobiyal fitazlar

Günümüzde fitazlar birçok bakteri, maya, fungus ve protozoalardan izole edilmiştir. Bu enzimlerin çoğu, alkali fitaz ya da histidin asit fosfatazın alt familyasına aittir. Biyokimyasal özellikleri, kinetikleri ve stereospesifliklerinde önemli farklılıklar görülür. Çeşitli mikrobiyal fitazlar, günümüzde hayvan yemi ilavesi olarak ticarileştirilmiştir (Lei *et al.* 2007).

1.5. Fitazın Biyoteknolojide Kullanımı

Günümüzde modern biyoteknoloji genetiği değiştirilmiş canlıları kullanarak ticari miktarlarda ürün elde etmeyi amaçlamıştır. Son 20 yılda fitaz enzimi çevre koruma, beslenme ve biyoteknoloji alanlarında bilim insanlarının dikkatini çekmiştir. Fitazlar biyoteknolojik uygulamalarda (yem ve gıdalarda fitat içeriğini azaltmada) yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Lei and Stahl 2001; Vohra and Satyanarayana 2003).

Bu çalışmada kaşar peynirinden izolasyonu yapılmış olan Tarımsal Biyoteknoloji Kültür koleksiyonundan temin edilen *Lactobacillus brevis* suşunun moleküler olarak tanılanması ve yeni bir mikrobiyal kaynaktan fitaz enzimi üretimi ve enzimin karakterizasyonu amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETİ

Sümengen *et al.* (2012), fermantasyon sonucu oluşan gıda ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus brevis* suşlarından elde ettikleri fitaz enzimini üretmiş ve karakterize etmişlerdir. Bu suşun fitaz üretimi, 30°C’de 48 saat inkübe edildikten sonra orta sodyum fitat içeren koloniler etrafındaki şeffaf bölgeler üretilerek tespit edilmiştir. *Lactobacillus brevis*’ten fitazın moleküler ağırlığı SDS-PAGE’de 73 kDa ve 34 kDa olarak hesaplanmıştır. *Lactobacillus brevis* hücre dışı ve hücre içi enzimlerin optimum aktivitesi sırasıyla 120°C, pH 3,4 ve 110°C, pH 3,4’te ortaya çıktı. *Lactobacillus brevis*’ten hücre dışı enzim, 90°C’de 5 dakika süre ile %91 stabil kalmıştır. *Lactobacillus brevis* intrasellüler enzim aktivitesi, HgCl₂ (%157), MnCl₂ (%140), ZnCl₂ (%121), MgCl₂ (%133), CuCl₂ (%131) ve FeCl₂ (%123) ile belirgin şekilde uyarılmıştır.

Aziz *et al.* (2015), yaptıkları çalışmada fitaz üreten bakterilerin fiziko-kimyasal koşullarını incelemişlerdir. Fitaz üreten bakteri izolatları, fosfat çözündürücü ortamda tarandı. *Lactobacillus casei*, *Enterobacter intermedius*, *Bacillus badius*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp. ve *Klebsiella* spp. izolatlarının (PHY02, PHY03, PHY06, PHY07, PHY12 ve PHY30) sırasıyla morfolojik, mikroskopik ve biyokimyasal karakteristikleri tanımlandı. Tüm izolatların (PHY02, PHY03, PHY06, PHY07, PHY12 ve PHY30) aktiviteleri sırasıyla 37°C’de (27, 9, 19, 40, 19 ve 32 IU/ml), pH 6,5’te (26, 15, 19, 41, 19 ve 32 IU/ml) ve %1 NaCl (27, 15, 17, 41, 18 ve 32 IU/ml) olarak tespit edildi. Sonuç olarak, fitaz üreten bakteri izolatları daha fazla analiz edilebilir ve yerli biyogübre olarak geliştirilebilir.

Kang *et al.* (2015), bu çalışmada, yüksek fitaz aktivitesine sahip seçilmiş *Lactobacillus sakei* Wikim001 ile inoküle fitat indirgenmiş kahverengi pirincin beslenmesi yoluyla, ovariektomize (OVX) farelerde osteoporozun koruyucu etkisini incelemişlerdir. %5 BR-WK diyetinin aksine, *Lactobacillus sakei* Wikim001 (%10 BR-WK diyeti) ile üretilen %10 kahverengi pirinç içeren normal diyetli OVX fareleri, trabeküler kemik hacmi / doku hacmi, kemik yüzeyi / doku hacmi, trabeküler sayı ve femurdaki kemik

mineral yoğunluğu kontrol OVX farelerine kıyasla azalmıştır. Üstelik %10 BR-WK diyeti ile beslenen OVX fareleri, osteokalsin ve CTX-1 de dahil olmak üzere kemik döngüsü belirteçlerini azaltmıştır. Bu sonuçlar BR-WK diyetinin OVX kaynaklı trabeküler kemik kaybında kemik koruyucu etkisi olduğunu ve kemik döngü oranını baskılayarak kemik mikro mimarisinin bozulmasını önlediğini göstermektedir. Bu nedenle BR-WK diyeti kemik kütlesini ve yapısını osteoporoza karşı korumak için faydalı olabileceği fikri sunulmuştur.

Zeren (2015), yaptığı bu çalışmada, Türkiye'nin 30 farklı ilinden alınan toprak örneklerinden 300 adet bakteri izole etmiştir. Bakterilerin morfolojik ve fizyolojik özellikleri incelenerek 236 bakterinin *Bacillus* cinsi olduğu tespit edilmiştir. Bütün suşların fitaz aktiviteleri fitaz tarama ortamı (PSM) kullanılarak tespit edilmiş ve açık zonların çapı mm olarak gösterilmiştir. Toplam 19 *Bacillus* sp. suşu, ekstraselüler fitaz üreticisi olarak bulunmuştur. 19 *Bacillus* sp. suşları arasında en geniş zona (11 mm) sahip 1 adet suş seçilmiş ve *Bacillus* sp. EBD 9-1 olarak adlandırılmıştır. 16S rRNA dizi analizi sonucunda *Bacillus* sp. EBD 9-1 suşunun *Bacillus megaterium* ile %100 benzerlik gösterdiği tespit edilmiş ve yeni izolat *Bacillus megaterium* EBD 9-1 olarak adlandırılmıştır. *Bacillus megaterium* EBD 9-1 suşunun fitaz enzim geni *E. coli* DH5α suşunda klonlanmaya çalışılmıştır. *Bacillus megaterium* DSM319, *Bacillus megaterium* QM B1551 ve *Bacillus megaterium* WSH-002 suşlarının bütün genom sekansı NCBI veri bankasında mevcuttur. Ancak, bu sekansların içinde fitaza ait bir sekans bulunamamıştır. Bu sebeple, farklı *Bacillus* türlerinin fitaz sekansları hizalanmış ve bir çifti dejenere olmak üzere 2 primer çifti hazırlanmıştır. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) sonucunda, sadece dejenere primer çiftleri kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Çoğaltılan bu DNA fragmanları pGEMR-T Easy vektörüne ligasyon ile aktarılmıştır. Rekombinant plazmitlerin *E. coli* DH5α suşuna transformasyonu gerçekleştirilmiş ve rekombinant plazmidi içeren saf *E. coli* DH5α suşunun plazmidleri izole edilmiştir. Klonlanmanın kontrolü için, rekombinant plazmid *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmiş ve beklenen boydaki bantlar agaroz jel elektroforezinde gözlenmiştir. İzole edilen plazmidler T7 primeri ve ABI PRISM-310 Genetic Analyzer cihazı kullanılarak sekanslanmıştır. Sonuç olarak, 3 DNA

fragmanının nükleotit dizisinin fitaz enzimi sekansı ile benzerlik göstermediği gözlemlenmiştir. Bu nedenle dejenere primerler ile amplifikasyon sonucunda fitaz geni çoğaltılamamıştır. Yeni izole edilen bu *Bacillus megaterium* EBD 9-1 suşu endüstriyel ölçekte fitaz üretimi için büyük bir potansiyele sahip olabilir.

Sümengen vd (2013), gerçekleştirdikleri bu çalışmada fitazı fermente gıdalardan izole edilen *Lactobacillus plantarum*'dan üretmiştir. *Lactobacillus plantarum*'un ekstraselüler ve hücre içi enzim aktiviteleri sırasıyla 984,50 U/ml ve 494 U/g olarak saptanmıştır. *Lactobacillus plantarum*'dan hücre dışı fitaz moleküler ağırlığının 46 kDa olduğu ve hücre içi fitazların SDS-PAGE ile 72 kDa, 36 kDa ve 33 kDa olduğu tespit edilmiştir. Hücre içi ve hücre dışı fitaz aktivitesi için optimum koşullar 120°C ve pH 3,4 olarak bulunmuştur. Hücre içi enzim 80°C'de 10 dakika boyunca %94 stabil kalmıştır. Hücre dışı enzim aktivitesi 1 mM CoCl₂ ve FeCl₂'den önemli ölçüde etkilenmemiştir. Hücre içi enzim aktivitesi 5 mM MnCl₂'den önemli ölçüde etkilenmemiştir. Bu gözlemler, *Lactobacillus plantarum*'un fermantasyon tahıl ve soya bazlı gıdalar geliştirmek için başlangıç kültürleri olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu ve böylece fitat düzeylerini düşürdüğünü ve bu tür çeşitli minerallerin biyoyararlanımını yükselttiğini göstermektedir. Bu, daha güvenli ve daha besleyici fermente edilmiş bir besin sağlayacaktır.

Sarıbuğa (2013), yapmış olduğu çalışmada *Lactobacillus* sp. suşlarından fitaz enziminin izolasyonunu ve karakterizasyonunu incelemiştir. Bu bakterilerin fitaz üretimi MRS (Man, Ragosa and Sharpe) ortamında 30°C'de 48 saat inkübasyon süresinden sonra, kolonilerin çevresinde oluşan zon üretimi ile belirlenmiştir. Yapılan önceki çalışmalarda en iyi aktivite gösteren suşlar kullanılmıştır. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus*'dan üretilen enzimlerin en yüksek aktiviteleri pH 6,0'da 167,3 EU/ml ve pH 5,0'de 163,1 EU/ml olarak belirlenmiştir. *Lactobacillus plantarum* ekstraselüler enzimi, 25°C'de 10 dakika süre ile en yüksek aktivite gösterirken, 10-100°C arasındaki sıcaklık değerlerinde de 2 saat boyunca enzim aktivitesini %90'nın üzerinde koruyabilmiştir. *Lactobacillus acidophilus* ekstraselüler enzimi optimum sıcaklık değeri 30°C'de 10 dakika süre ile en yüksek aktivite gösterirken, 10-100°C arasındaki sıcaklık

değerlerinde de 2 saat boyunca enzim aktivitesini %90'nın üzerinde koruyabilmiştir. Bu sonuçlara göre, *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus* enzimleri sahip olduğu karakteristik özelliklerden dolayı endüstriyel alanda kullanıma uygun olduğu belirlenmiştir.

Kalsiyum katkılı soya silikasında fitat varlığı mineral absorpsiyonuna müdahale edebilir. Bazı laktik asit bakterileri, fitatları bozan ve dolayısıyla mineral biyolojik kullanılabilirliğini ve emilimini potansiyel olarak artıracak enzim fitazı üretirler. Bu çalışma, *Lactobacillus acidophilus* ATCC4962, ATCC33200, ATCC4356, ATCC4161, *Lactobacillus casei* ASCC290, *Lactobacillus plantarum* ASCC276 ve *Lactobacillus fermentum* VRI-003'ü içeren 7 suşun fizyolojik bozunma potansiyelini ve fitaz aktivitesini araştırmaktadır. Bu bakterilerin aktiviteleri tarama ortamında ve potasyum fitat ile desteklenmiş kalsiyum katkılı soya silikasında incelenmiştir. *Lactobacillus acidophilus* ATCC4962 ve *Lactobacillus acidophilus* ATCC4161 ile fermente edilmiş zenginleştirilmiş soya silikasındaki fitaz aktivitesi, 12 saat ve 24 saat fermentasyon sonrası sırasıyla %85 ve %91 oranında artış olduğu gözlemlenmiştir. Tüm suşlar yaklaşık pH 5'te en yüksek fitaz aktivitesi ifade etmişlerdir. Fakat fitat bozunması gözlemlenmemiştir (Tang *et al.* 2010).

Raghavendra *et al.* (2010), tarafından fitat indirgeme potansiyeline sahip 60 civarında laktik asit bakteri suşu, bakliyat ve tahıl kaynaklı bilinen fermente örneklerden izole edilmiştir. Myo-inositol hekzafosfat (IP6) indirgeme yetenekleri kobalt klorür (CoCl₂) plate assay (nitel boyama yöntemi) ile incelenmiştir. Kültürlerden biri olan *Pediococcus pentosaceus* CFR R123'ün fitik asitin kalsiyum ve sodyum tuzlarını indirgeme yeteneğinde olduğu görülmüş olup, fitat indirgeyen CFR R123'ün faydalı özelliklerinin in vitro değerlendirilmesi de yapılmıştır. *Pediococcus pentosaceus* CFR R123, pH 2'de %53 ve pH 2,5'de %62 oranında canlılık göstermesine karşılık, *Lactobacillus rhamnosus* GG'nin kültürleri, pH 2'de %55 canlılık gösterirken, pH 2,5'de %82 oranında canlılık göstermiştir. GG suşu %0,3 öküz safrası bulunan ortam-da hiç üreme göstermez iken, CFR R123 suşunun ksilene hidrofobisitesi %62,8 iken GG suşunun %59 olduğu gözlemlenmiştir. Her iki test suşunun da *Listeria monocytogenes* Scott A,

Escherichia coli gibi gıda kaynaklı patojenlere karşı antibakteriyal aktiviteye sahip oldukları ve *Pediococcus pentosaceus* CFR R123'ün β -galaktosidaz aktivitesi ve kolesterol düşürücü özelliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Laktik asit bakterileri, fitat indirgeme kabiliyetleri ve birçok faydalı özellikleriyle fonksiyonel gıdalarda besin güvenliğini arttırmak için starter kültür olarak kullanılabilecekleri ileri sürülmüştür.

Palacios *et al.* (2008), yapmış oldukları çalışmada, fitat yönünden zengin olan yemlerle beslenen tavukların sindirim (gastrointestinal) sistemlerinin farklı yerlerinden yüksek fitat indirgeme aktivitesine sahip suşları seçmiş olup, bunların tam buğday ekmeğinin yapım süreci için uygunluklarını araştırmışlardır. Farklı *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşları izole edilmiş, fitaz ve fosfataz aktivitesi için ayrı ayrı teste tabii tutulmuştur. Her iki enzim de fitatın indirgenmesinde katkıda bulunabileceği düşüncesi ile ayrı ayrı test edilmiştir. Fitat indirgeme aktivitesi en yüksek olan izolatların, *Lactobacillus salivarius* (L-ID15), *Bifidobacterium dentium* ve *Lactobacillus reuteri* (L-M15) türlerinin olduğu belirlenmiştir. Tam buğday ekmeği yapımında *Lactobacillus salivarius* (L-ID15) ve *Lactobacillus reuteri* (L-M15) seçilerek fermentatif yetenekleri test edilmiştir. Seçilen iki bakteride tam buğday ekmeklerinin kontrol grubu (laktobasil yokluğundaki ekmekler) ile benzer teknolojik kaliteye sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca laktobasillerin varlığı sonucu inositol fosfat düzeyi düşük ekmek kırıntıları görülmüştür. Sonuç olarak, yüksek fitat indirgeme aktivitesine sahip olan iki bağırsak laktobasil suşlarının, tam buğday ekmek yapımı sürecinde “starter” kültür olarak kullanılan faydalı özelliklere sahip olduğu çalışmamız sonucuyla desteklenmektedir.

Zotta *et al.* (2007), Cornetto di Matera mayalarından izole edilen LAB'nin 41 suşunda, fermentasyon sırasındaki rollerini aydınlatmak için onların enzimatik aktivitelerini incelemişlerdir. Spektrofotometrede, sentetik substratlar kullanılarak üreaz, fitaz, fosfataz, peptidaz ve β -glukosidaz aktiviteleri ölçülmüştür. Proteolitik aktiviteleri, kontrol grubu olarak asitleştirilmiş ve nötral steril hamurlar kullanılarak numune hamurlarda araştırılmıştır. Bütün suşlar düşük üreaz, iminopeptidaz ve glutamil aminopeptidaz aktivitesine sahip olmakla birlikte diğer enzimatik aktiviteler sebebiyle

tür içerisinde farklılıklar gözlemlenmiştir. *Lactobacillus plantarum*, *Weissella cibaria* ve *Lactobacillus pentosus*'un enzimatik aktiviteleri suşlar arasında değişiklik göstermekte iken, *Leuconostoc mesenteroides* ve *Lactobacillus curvatus* suşları çoğunlukla yüksek aminopeptidaz, X-prolyl dipeptidylaminopeptidaz, β -glukosidaz ve fitaz aktivitesi göstermiştir. Hiyerarşik kümeleme analizi yapılarak benzer enzimatik profillerine dayanarak suşlar sınıflandırılmıştır. Farklı ekmek yapımı süresince karışık starter kültür olarak kullanımı ileri sürülen *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus* ve *Leuconostoc mesenteroides*'in farklı suşlarının fitaz, proteolitik, β -glukosidaz ve peptidaz aktivitelerinde ilginç kombinasyonlar görülmüştür.

Reale *et al.* (2004), Güney İtalya bölgesindeki mayalardan *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* ve *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının fitaz aktivitesini 31P NMR tekniği kullanarak ölçmüşlerdir. Çalışmanın sonucunda, ekmek yapımında LAB'lerinin kullanımına dayalı maya teknolojisi ortaya çıkarılmıştır.

Chaoui *et al.* (2003), fitaz aktivitesi, maya fermentasyonu sırasında ve unda fizikokimyasal ve karakteristik (pH, fitik asit hidrolizi ve hamur kabarma kapasitesi) özellikleri belirlemek amacıyla doğal mayalı ekmek starterleri üzerinde çalışmışlar ve fermentasyon mikroorganizmaları (mayalar ve laktik asit bakterileri) tanımlamışlardır. Sonuçlara bakıldığında, bilinen starter kültürler ile başlatılan mayalarda fitik asitin düştüğünü ve fitaz aktivitesinde geniş çeşitliliğe sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Fermentasyon sonunda mikroorganizma sayısında artma meydana gelmiş, starterlerin daha yüksek fermentasyon aktivitesi gösterdiği gözlemlenmiştir. Fermentasyonda laktik asit bakterilerinin yüksek sayıda olduğu saptanmış, maya popülasyonları geniş çeşitlilik göstermiştir. Fitaz aktivitesi, *Lactobacillus plantarum* ve *Leuconostoc mesenteroides* ile *Saccharomyces cerevisiae*'nin birlikte olduğu laktik asit bakteri ve maya izolatlarından yapılmış starter kültürlerde ispat edilmiştir.

Zamudio *et al.* (2001), tarafından 6 laktik asit bakteri (*Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii*,

Lactobacillus casei ve *Lactobacillus plantarum*) kültürü için fitaz aktiviteleri değerlendirilmiştir. Aralarında en yüksek aktivite *Lactobacillus plantarum* için bulunmuş olmasına rağmen, fitaz aktivitesinin çok düşük olduğu tespit edilmiştir. Fitat indirgeyici aktivitesi ile enzimin, moleküler ağırlığının 52 kDa olduğu ve optimum aktivitenin pH 5,5 ve optimum sıcaklığın 65°C’de gösterdiği belirtilmiştir. Fitaz aktivitesi, asetil fosfat gibi monofosforillenmiş bileşikler ile daha yüksek bir hidroliz oranına sahip non-spesifik asit fosfatazdan dolayı düşük enzim aktivitesi olarak açıklanmıştır.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada, taze kaşar peynirinden örnek alınmıştır. Bakteri izolasyonu için gereken genel ve özel besiyeri, bakterinin moleküler tanı ve enzim aktivitesi işlemlerinde kimyasallar ve kitler kullanılmıştır.

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar:

İnkübatör (Wisecube, KOREA)

Otoklav (Wiseclave Wac-47, KOREA)

Mikroskop (Bresser, GERMANY)

Steril Kabin (Safefast Classic 212 359, SINGAPORE)

Çalkalayıcı (Shimadzu, PHILIPPINES)

Manyetik Karıştırıcı (Heidolph, GERMANY)

pH Metre (Ohaus Starter3000, USA)

Derin Dondurucu (Nuaire -86 Ultralow Freezer, NU6613W37, U. S. A.)

Hassas Terazı (Shimadzu, JAPAN)

Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE)

Su Banyosu (Mettler WNB14, GERMANY)

Mikrodalga Fırın (Arçelik, TÜRKİYE)

Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)

Spektrofotometre (UV-1201V)

Vorteks (Wisemix Vm-10, KOREA)

Santrifüj (Therma Mr23 İ, GERMANY)

Elektroforez Tankı (Yatay) (OWL B2, U.S.A.)

Elektroforez Akım Sağlayıcı (Biometra Pack P25, GERMANY)

Jel Görüntüleme Sistemi (Biorad Gel Doc 2000, ITALY)

PCR Cihazı (Thermo Cycler Block, GERMANY)

DNA İzolasyon Robotu (Qiacube, GERMANY)

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

M17 Agar (Merck), M17 Broth (Merck), Nutrient Agar (Oxoid), Proteinaz K (Merck), Tris-HCl (Merck), NaCl (Merck), Ethanol (Merck), 1XTAE (Sigma), 1XTBE (Sigma), 20X Dimetil sülfoksit (Sigma), 10 x PCR tamponu: (Sigma), dNTPs (Sigma), *Taq* DNA polimeraz (Sigma), Agaroz (Sigma), Jel Red (Sigma).

3.1.3. Kullanılan kitler

Bakteri DNA izolasyonu kiti (QIAGEN).

3.1.4. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı

Nutrient Agar: Hassas terazide tartılan 28g/L Nutrient Agar karışımı hazır haldeki 1 L dH₂O içerisine ilave edilerek elde edilen besiyeri otoklavda 121°C’de 15 dk steril hale getirilip soğumaya bırakılmıştır. Besiyeri 4°C’ye varıncaya kadar soğutulduktan sonra steril halde bulunan petrilere dağıtılarak katılaşması için bekletilmiştir (Lelliot and Stead 1987).

M17 Agar: Hassas terazide tartılan 55 g/L M17 Agar karışımı, hazır haldeki 1 L dH₂O içerisine ilave edilerek elde edilen besiyeri ısıtılarak karıştırılır. Otoklavda 121°C’de 15 dk steril hale getirilir. Otoklav sonrasında 45-50°C’a soğutulup, steril petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri şeffaf ve kahverengi olup, 25°C’da pH’sı 7,2±0,2’dir (Terzaghi and Sandine 1975).

M17 Broth: Hassas terazide tartılan 42,5 g/L M17 Broth karışımı, hazır haldeki 1 L dH₂O içerisine ilave edilerek elde edilen besiyeri uygun kaplara dağıtılarak (tüp, erlen)

otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri şeffaf ve kahverengi olup, 25°C’da pH’sı 7,2±0,2’dir (Terzaghi and Sandine 1975).

Stok Besiyeri: 0,65g nutrient broth karışımına 36 ml gliserol ilave edildikten sonra toplam hacim 100 ml olacak şekilde saf su ilave edildi. Tam çözünme olması için manyetik karıştırıcıda karıştırılan besiyeri otoklavda steril edildi. Aseptik olarak 2 ml’lik steril eppendorf tüplere 1,2 ml konularak hazırlandı (Saygılı vd 2006).

Proteinaz K: İzolasyon kiti içerisinde hazır bir şekilde gelen proteinaz K’dan 200 µl alınarak steril eppendorf tüplere aktarıldı. Kullanılmak üzere oda sıcaklığında bekletildi.

1XTAE Tamponu: 100 ml 10XTAE’nin (Sigma) hacmi sdH₂O ile 1000 mL oluncaya kadar tamamlandı.

1XTBE Tamponu: 100 ml 10XTBE’nin (Sigma) hacmi sdH₂O ile 1000 mL oluncaya kadar tamamlandı.

%70’lik Etil alkol: 70 ml saf etil alkolün üzerine hacmi 100 ml oluncaya kadar saf su eklendi. -20°C’de muhafaza edildi.

20X Dimetil sülfoksit (DMSO): 2ml’lik steril eppendorf tüplere alınan, %100’lük DMSO (Sigma) kullanılıncaya kadar 25°C’de bekletildi.

6X yükleme tamponu: 100 ml yükleme tamponu için %100’lük gliserolden (Sigma-G9012) 40 ml alınarak, 0,1 g bromfenol blue (Sigma) ile karıştırıldı ve hacmi 1x TAE 100 ml’ye tamamlandı. Hazırlanan tampon amber şişe içerisinde güneş alması engellenerek, +4°C’de korundu.

10 x PCR tamponu: (Sigma) (100 mM Tris – HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ , %0,01 jelatin pH: 8,3) *Taq* DNA polimeraz ile birlikte gelmektedir.

Primerler: 27F - 1492R primer seti $MgCl_2$ (Sigma-M1028): 1M olan hazır çözelti 25 mM olacak şekilde steril saf su ile sulandırıldı.

dNTPs (Sigma): (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP – 10 mM) $-20^{\circ}C$ 'de muhafaza edildi.

Taq DNA polimeraz (Sigma)

Agaroz (Sigma-A5093)

DNA markır (Sigma): 1 kb'lık DNA marker.

Primer çalışma konsantrasyonu: Ticari olarak liyofilize halde alınan primerler kullanma kılavuzunda yazılan protokol doğrultusunda çözülerek ($C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$) formülü uygulanarak son konsantrasyonu 50 μM olacak şekilde hazırlandı.

Enzim aktivitesi için kullanılan çözeltiler

Substratın hazırlanışı

İçerisine 2 mM Na-fitat eklenen 100 mL 0,1 M asetat tamponu (pH 5,5) hazır hale getirilmiştir (Raghavendra and Halami 2009).

a. 2 mM Na-fitat çözeltisi

Sodyum asetat tamponu üzerine 0,132 g Na-fitat ilave edilmiştir.

b. 0,1 M Sodyum asetat tamponu

0,82 g sodyum asetat 100 mL distile su (dH_2O)’da tamamen çözündürülerek HCl ile pH 5,5’e ayarlanmıştır.

Reaksiyonu durdurucu çözeltinin hazırlanışı

Reaksiyonu durdurabilmek için %10’luk TCA (Trikloroasetik asit) kullanılmıştır. 10 g TCA 100 ml distile su (dH_2O)’da çözülerek hazırlanmıştır (Raghavendra and Halami 2009).

Renklendirme çözeltisinin hazırlanışı

Çözelti A: 5,73 mL sülfirik asit (%96’lık) 93,7 mL distile su içerisine eklenerek %5,5 (v/v) sülfirik asit çözeltisi hazır hale getirilmiştir.

Çözelti B: Çözelti A’da uygun bir oranda çözünmüş ve son hacim çözelti A ile 100 mL’ye sabitlenmiş 2,5 g amonyum molibdat hazırlanmıştır.

Çözelti C: Uygun oranda distile suda, 2,5 g demir sülfat çözünmüş ve son hacim distile su (dH_2O) ile 100 mL’ye tamamlanmıştır. İçerisine 1-2 damla sülfirik asit eklenmiştir.

Renklendirme çözeltisi: Bir hacim çözelti C, dört hacim çözelti B ile karıştırılarak renklendirme çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin uzun süre bekletilmemesi gerekir (Choi *et al.* 2001; De Angelis *et al.* 2003).

pH aktivitesi için kullanılan tamponlar

a. Tris-HCl tamponu

pH 7,0-9,0 Aralığındaki fitazın aktivitesini belirlenmesi için kullanılmıştır. 0,121 g Trizma base 10 mM Tris-HCl tamponu için tartılmış ve 100 ml suda çözünerek hazırlanmıştır. Uygun pH değerini elde etmek üzere konsantre NaOH ve/veya HCl çözeltisi kullanılmıştır.

b. Sodyum asetat tamponu

pH 2,0-6,0 aralığındaki fitazın aktivitesini belirlemek nedeniyle kullanılmıştır. 0,82 g sodyum asetat 0,1 M asetat tamponu için tartılmış ve 100 ml dH₂O ile tamamlanmıştır. Optimum pH değerlerini ayarlayabilmek için HCl ve/veya 0,1 M'lık NaOH kullanılmıştır.

c. Karbonat tamponu

pH 10-11 Aralığındaki fitazın aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. 0,105 g sodyum karbonat 10 mM Karbonat tamponu için tartılmış ve 100 ml distile su ile üzeri tamamlanmıştır. Uygun pH değerlerini ayarlamak üzere 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikroorganizma izolasyonu ve identifikasyonu

Kaşar peyniri örneğinden 10 g tartılıp 100 ml serum fizyolojik tuzlu su içerisinde vorteks ile homojenize edilmiştir. Dilüsyon işlemi ile örnekten 1'er ml alınarak içerisinde 9 ml fizyolojik tuzlu su bulunan cam tüplere aktarım yapılmıştır. Vorteksleme

işlemi yapıldıktan sonra 10^{-6} 'dan 0,1 ml alınarak bakterinin nutrient agara yayma yöntemi ile aktarımı gerçekleştirilmiştir. 35°C'de 24-48 saat boyunca inkübe edildikten sonra tek kolonilerden çizim usulü ekim yapılarak bakteri saflaştırılmıştır.

3.2.2. Morfolojik özelliklerin belirlenmesi

Bakterilerin morfolojileri boyutları çok küçük olduklarından dolayı bireysel yapıları sadece mikroskoplarla belirlenebilir. Bu nedenle, katı ya da sıvı besiyerlerinde saf bir şekilde geliştirilen hazırlanmış bakteri preparatları spesifik boyalar aracılığıyla işlem yapılarak inceleme yapılır. Mikroskoptaki incelemelerde, bakterilerin boyutları, spor durumu, boyanma özelliği (Gram (-) veya (+), vb.) gibi özelliklerinin varlığı incelenir (Arda 2000; Harley and Prescott 2002).

a. Hücre morfolojisinin belirlenmesi: Her bir izolattan örnek hazırlanarak kristal violet ile basit boyama yapılmış ve mikroskop altında görüntülerine bakılarak sonuçlar elde edilmiştir (Temiz 2000; Harley and Prescott 2002).

Bakteri izolatlarının hücre duvarlarındaki farklılığın belirlenmesi için gram boyama testi yapılmıştır (Tarakçıoğlu 2016). Bu testte aşağıdaki yöntem kullanılmıştır.

- a) Lam üzerine bir damla saf su aktarılır ve daha sonra üzerine besiyerinde 24 saat geliştirilen bakterilerden bir öze dolusu alınarak iyice yayılır.
- b) Ateşten geçirilerek fıkse edilir.
- c) İlk olarak kristal viyoleto boyası ile 1 dk muamele edilir ve saf su ile 30 sn yıkanır.
- d) Lügol ile 1 dk muamele edilir ve %96'lık etil alkol ile yıkanır.
- e) Tekrar saf sudan geçirilerek son kez safranin boyası uygulanır.
- f) Preparat yıkanıp kurutulur.
- g) Mikroskop altında incelenir.

3.2.3. Çalışmada kullanılan bakteri kültürlerinin muhafazası

Her bakterinin 24 saatlik saf kültüründen bir lop alınarak, içerisinde 500 µl %30'luk gliserol ve 500 µl LB Broth (1 L dH₂O'ya 10 g tryptone, 10 g NaCl ve 5 g yeast extract ilave edilerek hazırlanacaktır.) bulunan eppendorf tüplere aktarılıp etiketlenir. Vorteks cihazında vortekslenerek -80°C'de sonraki çalışmalar için muhafaza edilir.

3.2.4. Mikroorganizmanın moleküler tanılanması

3.2.4.a. Bakteri izolatların DNA izolasyonu

İzolatların DNA'ları bakteri DNA izolasyon kiti (Qiagenden uyarlanan protokol) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu aşamalar;

- M17 agarlarda geliştirilen bakterilerden bir öze dolusu toplanarak steril eppendorf tüplerine alındı.
- Toplanan tüplere 200µl Lizozim + trisHCL çözeltisi eklendi.
- Bu karışım güzelce vorteks edilerek homojen bir çözünme olması sağlandı.
- Vorteks'lenen karışımlar 45 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Bu sürede her 15 dakikada bir vorteks yapıldı.
- İnkübasyon sonunda örnekler 12000rpm'de 5 dakika 24°C'de santrifüj edildi.
- Santrifüjlenen örnekler sıvı kısmı dökülerek cidara yapışan pelet kısım bırakıldı.
- Örnekler robotun bölümlerine dizilerek izolasyon başlatıldı.

0,6 g agaroz, 1XTBE tamponuna aktarıldı. Mikrodalgada elde edilen karışım şeffaf bir görünüm alıncaya kadar kaynatıldı. El yakmayacak kadar soğutulan agaroz jele 0,6 µl red kimyasalı eklenerek, içerisine tarakların yerleştirildiği elektroforez jel küvetine döküldü. 15-20 dk sonra jelden taraklar dikkatli bir şekilde çıkarıldı. 1XTBE tamponu

jel yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde tankın içine yerleştirildi. Marker ve DNA yüklemesi yapıldıktan sonra %1'lik konsantrasyona sahip agaroz jelde DNA yürütüldü.

3.2.4.b. 16S rRNA bölgesinin PCR yardımı ile çoğaltılması

Bakterilerin sistematigi açısından önemli bir yere sahip olan 16S rRNA'nın sentezlendiği bölge seçilmiş ve evrensel primerler (27F forward 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'; 1492R reverse 5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3') kullanılarak laboratuvar ortamında çoğaltılmıştır.

PCR reaksiyonun hazırlanması: 30 µl'lik reaksiyonda; aşağıdaki karışım hazırlanmıştır.

- a) 3 µl 10 x PCR tamponu
- b) 0,6 µl dNTPs
- c) 0,3 µl 50 µM Forward primer
- d) 0,3 µl 50 µM Reverse primer
- e) 1,2 µl DMSO
- f) 1,8 µl MgCl₂
- g) 0,3 µl 5 unit/µl Taq DNA polimeraz
- h) 21,5 µl steril saf su

Son olarak karışıma 1 µl kalıp DNA ilave edilerek son hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır (Barış 2009).

PCR programı: PCR reaksiyonu hazırlanan örnek materyal ile aşağıdaki safhalar olacak şekilde bir programda çalışılmıştır.

- a) 95°C'de 120 saniye denatürasyon sonrasında
- b) 40 döngü olacak şekilde 94°C'de 60 saniye denatürasyon
- c) 53°C'de 60 saniye bağlanma

- d) 2°C’de 120 saniye uzama basamakları ve sonrasında
- e) 72°C’de 5 dakika uzama (Barış 2009).

16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi: 1,8 gr agaroz üzerine 120 ml 1XTAE tamponu eklendi. Mikrodalga fırınında elde edilen karışım şeffaf bir görünüm alıncaya kadar kaynatıldı. 50°C’ye veya el yakmayacak kadar soğutulan agaroz jele 0,6 µl jel red kimyasalı eklenerek, içerisine tarakların yerleştirildiği elektroforez jel küvetine döküldü. Belli bir süre beklenerek donduğu anlaşılan jelden taraklar dikkatli bir şekilde çıkarıldı. 1XTAE tamponu jel yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk kuyucuğa, DNA markerından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D7058) 8 µl yüklendi. Diğer kuyucuğa örnek yüklendi. PCR örneği %1,5’lik agaroz jelde yürütüldü.

Elektroforez jel düzeneği; 90 volt akımda 60 dakika yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel, UV ışık sistemi altında görüntülendi ve bilgisayar ortamında analiz edildi (Barış 2009).

3.2.4.c. DNA dizi analizlerinin alınması ve sonuçların değerlendirilmesi

Sekans analizi sonuçları BioEdit ile analiz edilerek Fasta formatına çevrildi. Primerler bulunup ve öncesindeki kısımlar çıkarıldı. Daha sonra aradaki her iki taraftan okunan kısım kontrol edilerek düzenlendi NCBI veri bankasında sekans sonuçları karşılaştırıldı.

3.2.5. Bakterilerin inokülasyonu

M17 Agar’da gelişme gösteren bakteriler, M17 Broth’a inoküle edilerek bakterilerin sıvı kültür ortamına aktarılması sağlanacaktır. 35°C’de 120 saat etüvde inkübasyona bırakılacaktır.

3.2.6. Enzim aktivitesinin ölçülmesi

Fitaz aktivitesi ölçülürken her basamakta elde edilen süpernatantların hepsinden aktivite tayini yapılmıştır. Fitaz enziminin aktiviteye sahip olduğu aralıklar tespit belirlenmiştir. Aktivite tahini hesaplanırken 100 µL enzim çözeltisi üzerine 250 µL substrat eklendikten sonra vorteks ile karıştırılır daha sonra 10 dakika 50°C'ye ayarlanmış su banyosunda reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyonu durdurmak için 500 µL %10'luk TCA eklenmiştir. 15 dk oda sıcaklığında bekletme işlemi yapıldıktan sonra tüplere 500 µL renklendirme çözeltisi ilave edildi. 15 dakika inkübasyondan sonra 3200 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra örnekler kör kullanılarak 700 nm'de spektrofotometre cihazında ölçüm işlemi yapılmıştır.

3.2.6.a. Enzimin optimum pH değerinin saptanması

Elde edilen enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin saptanması için karbonat (pH 10,0-11,0), Tris (pH 7,0-9,0), sodyum sitrat (pH 4,0-6,0), ve asetat (pH 2,0-3,0), tampon çözeltileri kullanılarak farklı pH değerlerinde olan (pH 2,0-11,0) ve içerisinde 2 mM sodyum fitat ihtiva eden substrat çözeltisi hazırlanmıştır. Aktivite tayini yapmak için 100 µL enzim ve 250 µL substrat 2 ml'lik tüpte vorteks ile karıştırılmıştır. Ardından 50°C'ye ayarlanmış su banyosunda 10 dakika reaksiyona girmesi beklenmiştir. Reaksiyonu durdurmak amacıyla 500 µL %10'luk TCA ilave edilmiştir. Su banyosundan alınan tüplere 500 µL renklendirme çözeltisi ilave edildikten sonra 15 dakika beklenmiş ve sonrasında örnekler 4000 devir/dakikada 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj yapıldıktan sonra örnekler kör'e karşı 700 nm'de spektrofotometrede ölçümü yapılmıştır.

3.2.6.b. Enzimin optimum sıcaklık değerinin saptanması

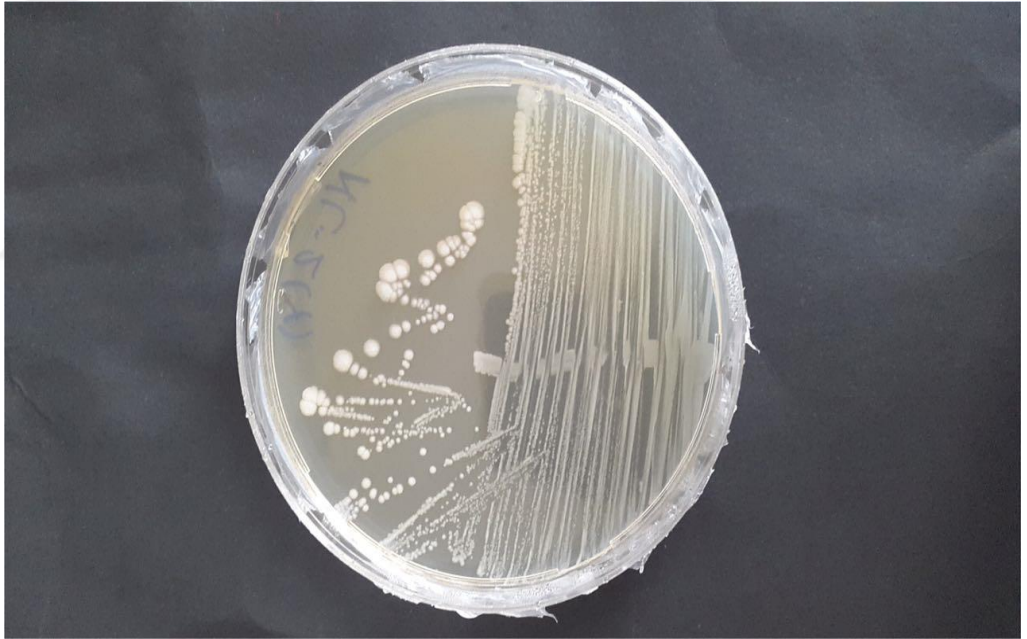
Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi için 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C'lik sıcaklıklar seçilmiştir. Sıcaklık ölçümlerinin saptanması için su banyosu kullanılmıştır. Aktivite tayininin yapılabilmesi için 100 µL enzim ve 250 µL substrat karıştırılarak standart aktivite ölçümü yapılmıştır.



4. ARAşTIRMA ve BULGULAR

4.1. Kültür zelliklerinin Belirlenmesi

Bakterinin kültürel özelliklerini incelemeye, bunların katı (M17 Agar) ve her bir izolatın olgun koloni oluşturduğu sürede sonuçlar alınmıştır. Ayrıca koloni görüntüsü şekil 4.1’de gösterilmiştir. Kültüre alınan bakteri ze yardımıyla çizgi ekim yöntemi kullanılarak çizilmiştir. Burada saf koloni yapıları incelenmiş ve yapılan çalışmaya bu kolonilerden devam edilmiştir.

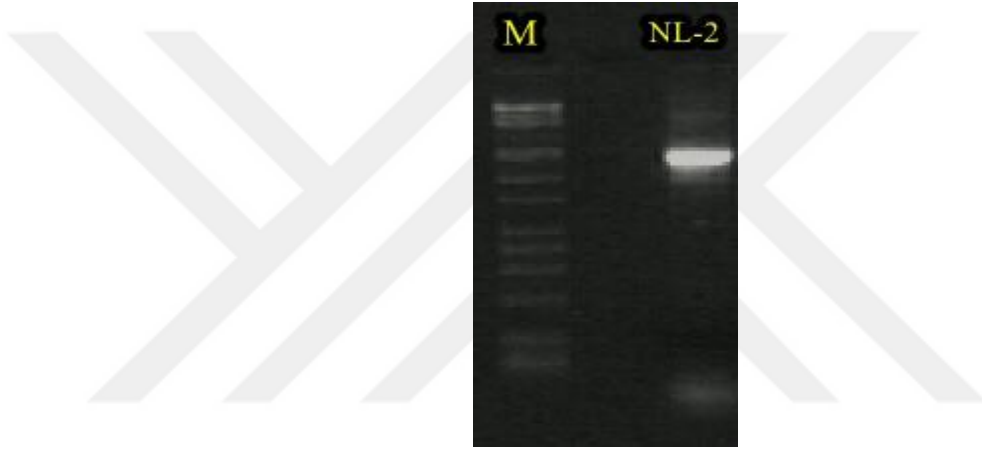


şekil 4.1. *Lactobacillus brevis* bakterisinin koloni görünümü

4.2. Moleküler Yöntem ile *Lactobacillus brevis*'in Tanılanması

4.2.1. DNA izolasyon sonucu

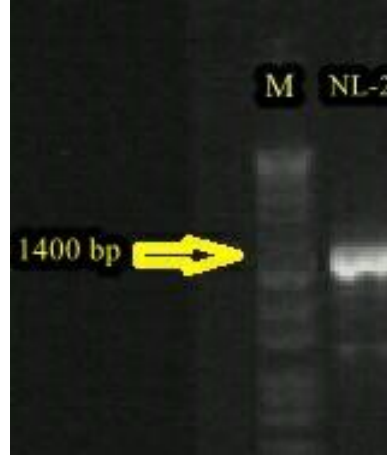
Lactobacillus brevis izolatının genomik DNA izolasyonu bölüm 3.2.4.a'da belirtilen protokole göre herhangi bir değişiklik yapılmadan uygulanmıştır. DNA izolasyon sonuçları Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. *Lactobacillus brevis* (NL-2)'in DNA izolasyon sonucu elektroforezde görünümü

4.2.2. PCR sonuçlarının jel görüntüsü

Lactobacillus brevis izolatından elde edilen genomik DNA'lar kullanılarak kurulan PCR reaksiyonları sonucu beklenen büyüklük olan 1400-1500 bp büyüklüğünde olduğu Şekil 4.3'te görülmektedir. İşaretli olan bölge 1400 bp büyüklüğündedir.



Şekil 4.3. *Lactobacillus brevis* (NL-2)'in PCR sonucu jel görüntüsü

4.2.3. Dizi analizi sonuçları

PCR sonucunun 16S rRNA gen gen bölgesinin tespitini sağlamak için dizi analizi (sekanslama) yapan şirkete örnekler gönderilmiştir. Şirketten gelen veriler doğrultusunda blastlama işlemi sonucu oluşan 16S rRNA dizisi Şekil 4.4'te belirtilmiştir.

> *Lactobacillus brevis*

```
GAATGACGTGCTTGCACTGATTTCAACAATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAAT
CTGCCAGAAGCAGGGGATAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGG
ATTTGTTTGAAAGGTGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGCGTATTAGTTAGTTGGTGAG
GTAAAGGCCACCAAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAG
ACACGGCCCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGA
GCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGA
GAGTAACTGTTCAAGGGTTGACGGTATTTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAG
TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAG
AGGACAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGATGG
AAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTGTATAGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAG
CGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCG
```

CCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACC
TTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGAGATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGT
GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCTTAT
TATCAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAG
TTGCGAAGTCGTGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGC
CTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
ACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAA

Şekil 4.4. *Lactobacillus brevis* izolatından 16S rRNA gen bölgesine ait dizi analizi sonucu

4.3. Fitaz Aktivitesi Sonuçları

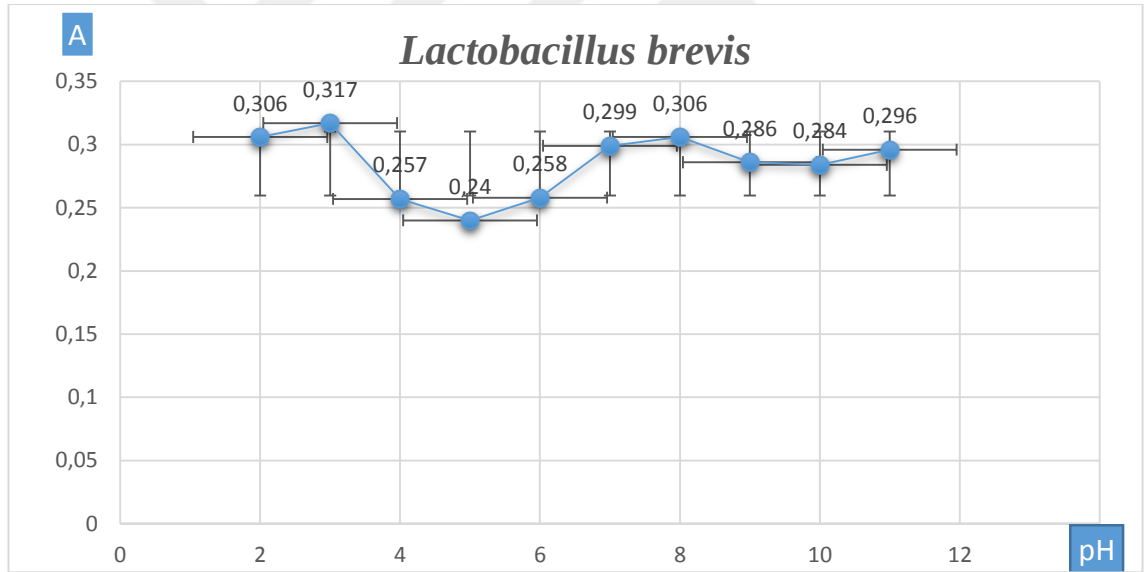
İzolasyonu ve tanılması yapılan *Lactobacillus brevis*'in absorbans değeri spektrofotometrede 0,318 olarak ölçülmüştür. Optimum sıcaklık ve pH değeri için farklı sıcaklık ve pH değerlerinde aktivitesi ölçülmüş, aktivite sonuçları aşağıda gösterilmiştir.

4.3.1. Fitaz enziminin optimum pH sonuçları

Lactobacillus brevis'den üretilip saflaştırılan fitaz enziminin enziminin optimum pH'sını belirlemek için 3 kez ölçüm yapılmıştır (Çizelge 4.1). Optimum pH için, pH 2,0'dan 11,0'a kadar on farklı pH ortamında çalışılmıştır. pH 2,0-6,0 arası asetat, pH 7,0-9,0 arası Tris / HCl ve pH 10,0-11,0 arasında karbonat tamponları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar ile aktivitesi hesaplanmış ve "Aktivite-pH" grafikleri çizilmiştir. Excel programında yapılan sonuçlar Şekil 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Lactobacillus brevis*'in optimum pH absorbans (A) değerleri

pH	1. DENEME (A)	2. DENEME (A)	3. DENEME (A)	ORTALAMA (A)
2	0,304	0,308	0,306	0,306
3	0,322	0,325	0,305	0,317
4	0,26	0,262	0,251	0,257
5	0,238	0,227	0,255	0,24
6	0,258	0,26	0,258	0,258
7	0,291	0,312	0,294	0,299
8	0,305	0,309	0,304	0,306
9	0,275	0,318	0,266	0,286
10	0,286	0,283	0,283	0,284
11	0,299	0,303	0,287	0,296



Şekil 4.5. *Lactobacillus brevis*'den elde edilen ekstraselüler fitaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

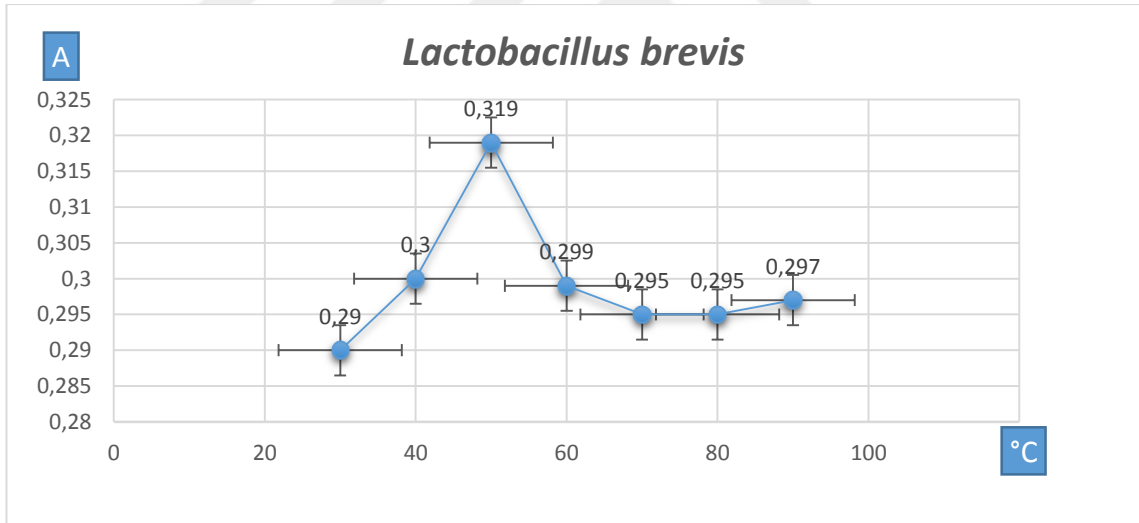
4.3.2. Fitaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları

Lactobacillus brevis'den elde edilip saflaştırılan fitaz enzimi optimum sıcaklıklarını tespit etmek için gerekli ölçümler yapılmıştır (Çizelge 4.2). Elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplanmış ve “Aktivite-°C” grafikleri çizilmiştir. Elde edilen bulgulara göre

Lactobacillus brevis'e aitt fitaz enziminin optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur. *Lactobacillus brevis*'den elde edilen fitaz enzimi optimum sıcaklık sonuçları Excel programı ile yapılmış olup, sonuçlar Şekil 4.6'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *Lactobacillus brevis*'in optimum sıcaklık absorbans (A) değerleri

SICAKLIK	1.DENEME	2.DENEME	3.DENEME	ORTALAMA
30	0,296	0,285	0,289	0,29
40	0,303	0,3	0,297	0,3
50	0,32	0,322	0,317	0,319
60	0,301	0,299	0,297	0,299
70	0,297	0,295	0,295	0,295
80	0,296	0,296	0,294	0,295
90	0,298	0,299	0,295	0,297



Şekil 4.6. *Lactobacillus brevis*'den elde edilen ekstraselüler fitaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji laboratuvarlarında bulunan kültür koleksiyonundaki yaklaşık 50 izolat arasından yalnızca bir tane *Lactobacillus brevis* bakterisi tanımlanmıştır. *Lactobacillus brevis* bakterisini elde edebilmek için öncelikle orijini olduğu taze kaşar peynirinden dilüsyon yöntemi ile seyreltme yapılmıştır.. Her bir tüpe 1 ml örnek aktarılacak sonuncu tüp olan 10^{-6} 'dan 0,1 ml örnek alınıp Nutrient Agar'a yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. 35°C'de 24-48 saat inkübasyonda tek koloni oluşumu gözlenmiş daha sonra bir öze yardımıyla tekrar saflaştırma için ekim yapılmıştır.

Lactobacillus brevis'in koloni özelliklerine bakıldığında; küçük yuvarlak yapılı, krem renkli, pürüzsüz parlak ve pigment içermeyen opak yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan Gram boyama yöntemi ile *Lactobacillus brevis*'in test sonucu mor renkte görüldüğü tespit edilmiş ve Gram (+) bir bakteri olduğu belirlenmiştir.

Lactobacillus brevis'i moleküler olarak tanılamak için öncelikle DNA izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. QIAGEN bakteri izolasyon kiti ile protokol uygulanarak izolasyon işlemi yapılmıştır. Bakterilerin sistematigi açısından önemli bir yere sahip olan 16S rRNA'nın sentezlendiği bölge seçilerek evrensel primerler yardımıyla PCR protokolü ile bölgeler çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR sonuçları araştırma ve bulgular bölümünde Şekil 4.3'te verilmiştir.

Lactobacillus brevis bakterisinin fitaz enzimi aktivitesi ve aktivitesini önemli ölçüde etkileyen sıcaklık ve pH değerleri farklı değerlerde ölçülmüş, optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri çalışılmıştır. *Lactobacillus brevis*'ten saflaştırılan fitaz enziminin optimum pH'sını saptamak amacıyla pH 2,0-11,0 aralığında aktivite ölçümü yapılmıştır. pH 2,0-6,0 Aralığı için 0,1 M'lık asetat tamponu, pH 7,0-9,0 Aralığı için 10mM'lık Tris/HCl tamponu ve pH 10,0-11,0 Aralığı için ise 10 mM'lık karbonat tamponları ile enzimin gösterdiği aktivite spektrofotometrede ölçülmüştür (Saribuğa 2013).

Lactobacillus brevis'ten ekstraselüler olarak üretilen fitazın optimum aktiviteye pH 3,0'de sahip olduğu belirlenmiştir.

Günümüze kadar fitazla yapılan değişik çalışmalarda literatüre farklı optimum pH sonuçları eklenmiştir. Sümengen *et al.* (2012), *Lactobacillus brevis* suşundan izole edilen fitazın optimum aktivitesini pH 3,4' te gösterdiğini bildirmişlerdir. Raghavendra *et al.* (2010), izole ettikleri *Lactobacillus rhamnosus* suşunda fitazın optimum aktivitesini pH 2,5 olduğunu bildirmişlerdir. Sümengen vd (2013), *Lactobacillus plantarum* suşundan izole edilen fitazın optimum aktivitesini pH 3,4'te gösterdiğini bildirmişlerdir. Tomschy *et al.* (2002), *Aspergillus niger* NRRL 3135 küfünden izole ettikleri fitaz enziminde optimum aktiviteyi pH 2.5 ve pH 5.0-5.5'da gösterdiğini bildirmişlerdir. Zamudio *et al.* (2001), *L. plantarum* NRRL B-4496'den elde ettikleri fitazın optimum aktivitesini pH 5.5 olarak bildirmişlerdir. *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1'den izole edilen fitaz enziminin en iyi aktivitesini pH 4.0'da gösterdiğini, *L. pentosus* CECT4023'dan temin edilen fitazın en iyi aktivitesi pH 5.0'te gösterdiğini saptamışlardır (De Angelis *et al.* 2003; Palacios *et al.* 2005). (Luechai and Dharmstithi, (2010), *Lactobacillus plantarum* KV1'den izole ettikleri fitaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği pH değerini 5.5 olarak bildirmişlerdir. Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada *Lactobacillus brevis* suşundan izole edilen ekstraselüler (hücre dışı) fitaz enziminin göstermiş olduğu en iyi aktivite pH'sı 3.0 olup, yukarıdaki çalışmalardan elde edilen sonuçlara yakın olduğu görülmüştür.

Lactobacillus brevis'in fitaz enziminin optimum sıcaklığını saptamak için 10-90°C aralığında spektrofotometrede ölçümler yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda optimum sıcaklık 50°C olarak görülmüştür. En düşük aktivite gösterdiği sıcaklık ise 30°C'de görülmüştür. Analizlerde kullanılan substrat optimum aktivitenin gerçekleştiği pH 5,5 sodyum asetat tamponundan hazırlanmış ve 10 dakika inkübasyon süresinden sonra aktivite değeri bulunmuştur.

Zamudio *et al.* (2001), *Lactobacillus plantarum* suşundan izole edilen fitazın optimum aktivitesini 65°C’de gösterdiğini bildirmişlerdir.

Yapmış olduğum bu çalışmada; *Lactobacillus brevis* bakterisinin optimum pH’sı 3,0 olarak bulunmuş olup, en düşük aktivite gösterdiği pH değeri ise 4,0 olarak belirlenmiştir. Optimum sıcaklık değeri ise 50°C olup en düşük aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 30°C olarak bulunmuştur.

Bu sonuçlar dikkate alındığında, *L. brevis* ekstraselüler enzimi 30°C’den sonra inişli çıkışlı bir aktivite göstermesine rağmen yüksek bir aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu özelliği ile termofil bir bakteri olduğu görülmektedir (Şekil 4.6). Literatür verileri ile karşılaştırıldığı zaman *Lactobacillus brevis*’ten elde edilen fitazın en yüksek optimum aktivite sıcaklıklarına sahip olduğu tespit edilmiştir. *Lactobacillus brevis* fitaz enziminin elde edilen bütün pH değerleri dikkate alındığı zaman enzimin asidik pH koşullarında en iyi aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir.

Dengesiz beslenen insanlar, yüksek oranda tahıl yiyenler, vejeteryanlar, gelişmemiş ülkelerde mayasız ekmek yiyen insanlar, tükettikleri fitat içeriği yüksek olan tahıl, baklagil ve soya proteinlerince zengin besinlerden dolayı ortaya çıkan Zn^{+2} , Fe^{+2} , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} ve bakır gibi minerallerin alınımının negatif etkisinin engellenebileceği düşünülmektedir. Fitik asitin negatif etkilerinin yanında antikanserojenik (prostat kanseri, kolon kanseri, göğüs kanseri, kan ve kemik iliği kanseri, karaciğer kanseri, pankreas kanseri, rabdomiyosarkom), antioksidan, antimutajenik, hipokolesterolemik, hipolipidemik, kolesterolü düşürücü, diş çürümesini önleyici, pıhtılaşmayı önleyici, böbrek taşı oluşumunu önleyici, HIV, diyabet, kalp rahatsızlıkları ve obezite gibi hastalıkları önleyici etki etmesi, Parkinson ve Alzheimer hastalığının tedavisinde, besinlerdeki yüksek fitik asit içeriğinin göz önünde tutulması gereği bilim dünyasında ön plana çıkmaktadır.

Bu açıdan üstün fitaz enzim aktivitesi gösteren *Lactobacillus brevis*’in endüstriyel açıdan değerlendirilmesi kaçınılmazdır. Basit mideli hayvanlar tarafından yeterince

yararlanılamayan yem maddelerinin yapısında bulunan fitik asidi hidrolize eden mikrobiyal fitaz enzimi, nişasta ve proteinin sindirimine olanak sağlar. Bunun sonucunda karma yemin ham protein, mineral ve enerjisinden yararlanmayı arttırmasıyla birlikte maddi açıdan olduğu gibi hayvansal gübrelerden kaynaklanan kirliliğin azalması bakımından da yararlı olacağı ileri sürülebilir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre; *Lactobacillus brevis*'in ürettiği ekstraselüler fitaz enziminin sahip olduğu karakteristik özellikleri nedeniyle endüstriye kazandırılabilceğı, gıda sektöründe starter kültür olarak kullanılabileceğı çalışmamızla teyit edilmiştir. Aynı zamanda *Lactobacillus brevis*'in fitaz enzimi üretimi üzerine yapılan çalışmaların azlığı nedeniyle bu çalışmanın öncü bir çalışma niteliğinde olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Açikel, Y. ve B. Çelebi, 2006. "R. delemar ile Lipaz Üretimi." TÜBİTAK Projesi, MİSAG-282.
- Angel, R., Tamim, N. M., Applegate, T. J., Dhandu, A. S., and Ellestad, L. E., 2002. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. *The Journal of Applied Poultry Research*, 11(4), 471-480.
- Anonim, 2016a. <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F889433CFFA79D6F5E6C1B43FF2AE88F745E500DEF>. (16.12.2016)
- Anonim, 2016b. <http://www.biyolojidersnotlari.com/biyoloji-canlilarin-temel-bilesenleri-organik-bilesikler.html>. (24.12.2016)
- Anonim, 2016c. Megep Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Geliştirilmesi Projesi, Gıda Teknolojisi, Enzimlerin Özellikleri.
- Anonim, 2017a. <http://www.biyodoc.com/enzim/2.PNG>. (05.01.2017)
- Anonim, 2017b. <http://evrenbilgisi.blogspot.com.tr/2013/01/enzimler-veozellikleri.html>. (05.01.2017)
- Anonim, 2017c. <http://www.worthington-biochem.com/introbiochem/introEnzymes.html>. (11.01.2017)
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No: 46, 548s.
- Aşan, M., 2007. "Mikrobiyal Fitazlar, Uygulama Alanları ve Biyoteknoloji." Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimler Dergisi 13: 147-155.
- Aziz, G., Nawaz, M., Anjum, A. A., Yaqub, T., Nazir, J., Khan, S. U., and Aziz, K., 2015. Isolation and characterization of phytase producing bacterial isolates from soil. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(3).
- Barış, Ö. 2009. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlatışı Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu Ve Tanısı. Doktora Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Atatürk Üniversitesi.
- Baruah, K., Sahu, N. P., Pal, A. K., Debnath, D., Yengkokpam, S., and Mukherjee, S. C., 2007. Interactions of dietary microbial phytase, citric acid and crude protein level on mineral utilization by rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), juveniles. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(2), 238-249.
- Bitar, K., and Reinhold, J. G., 1972. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf, and man. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 268(2), 442-452.
- Blank, G. E., Pletcher, J., and Sax, M., 1971. The structure of myo-inositol hexaphosphate dodecasodium salt octatriacontahydrate: a single crystal x-ray analysis. *Biochemical and biophysical research communications*, 44(2), 319-325.
- Bohn, L., Meyer, A. S., and Rasmussen, S. K., 2008. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(3), 165-191.
- Brinch-Pedersen, H., Olesen, A., Rasmussen, S. K., and Holm, P. B., 2000. Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) for constitutive accumulation of an *Aspergillus* phytase. *Molecular Breeding*, 6(2), 195-206.
- Brocades, G., 1991. "DNA sequence encoding phytase." Pat. EP 420: 358.

- Chaoui, A., Faid, M., and Belhcen, R., 2003. Effect of natural starters used for sourdough bread in Morocco on phytate biodegradation. *Eastern Mediterranean Health Journal*, Vol. 9, Nos, 1/2.
- Choi, Y. M., Suh, H. J., and Kim, J. M., 2001. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *Journal of Protein Chemistry*, 20(4), 287-292.
- De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M. R., McSweeney, P. L., Faccia, M., Giovine, M., and Gobbetti, M., 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 259-270.
- Ellestad, L. E., Angel, R., and Soares, J. H., 2002. Intestinal phytase II: a comparison of activity and in vivo phytate hydrolysis in three teleost species with differing digestive strategies. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(3), 259-273.
- Garrett, S. T. 2009. Professional development for the integration of biotechnology education (Doctoral dissertation, Queensland University of Technology).
- Greiner, R. and Farouk, A. E., 2007. "Purification and characterization of a bacterial phytase whose properties make it exceptionally useful as a feed supplement." *The Protein Journal* 26(7): 467-474.
- Harley, J.P. and Prescott, L.M., 2002. Laboratory exercises in microbiology. Fifth Edition New York: The McGraw-Hill Companies, 466p.
- Hooper, N. and Hames, D., 2005. *Biyokimya. Biyokimya ve Mikrobiyoloji* Leeds Üniversitesi. İngiltere. Nobel Yayın Dağıtım 3. Baskı. 83s.
- Igbasan, F. A., Männer, K., Miksch, G., Borriss, R., Farouk, A., and Simon, O., 2000. Comparative studies on the in vitro properties of phytases from various microbial origins. *Archives of Animal Nutrition*, 53(4), 353-373.
- Isbrandt, L. R., and Oertel, R. P., 1980. Conformational states of myo-inositol hexakis (phosphate) in aqueous solution. A carbon-13 NMR, phosphorus-31 NMR, and Raman spectroscopic investigation. *Journal of the American Chemical Society*, 102(9), 3144-3148.
- Iupac-Iub (Commission on Biochemical Nomenclature), 1977. Nomenclature of Phosphorus Containing Compounds of Biochemical Importance. *Eur. J. Biochem.*, 79:1-9.
- Johnson, L. F., and Tate, M. E., 1970. The Structure Of Myo- Inositol Pentaphosphates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 165(1), 526-532.
- Kang, M., Lim, S. K., Park, M. J., Song, J. H., Oh, Y. J., Choi, J. H., and Park, H. W., 2015. Effects of brown rice diets inoculated with *Lactobacillus sakei* Wikim001 having phytase activity on the osteoporosis in ovariectomized mice model. *Food Science and Biotechnology*, 24(4), 1391-1396.
- Karademir, A., Akgül, M., ve Tutuş, A., 2002. Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5(1).
- 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(6), 2079-2085.
- Kerovuo, J., and Tynkkynen, S., 2000. Expression of *Bacillus subtilis* phytase in *Lactobacillus plantarum* 755. Letters in applied microbiology, 30(4), 325-329.
- Kim, D. H., Oh, B. C., Choi, W. C., Lee, J. K., and Oh, T. K., 1999. Enzymatic evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* phytase as a feed additive. Biotechnology Letters, 21(11), 925-927.
- 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(1), 2-7.
- Konietzny, U., and Greiner, R., 2004. Bacterial phytase: potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. Brazilian Journal of Microbiology, 35(1-2), 12-18.
- Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P., and Becker, K., 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. Food Chemistry, 120(4), 945-959.
- Lehmann, M., Kostrewa, D., Wyss, M., Brugger, R., D'Arcy, A., Pasamontes, L., and van Loon, A. P., 2000. From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase. Protein Engineering, 13(1), 49-57.
- Lei, X., and Stahl, C., 2001. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. Applied Microbiology and Biotechnology, 57(4), 474-481.
- Lei, X. G., and Porres, J. M., 2003. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. Biotechnology letters, 25(21), 1787-1794.
- Lei, X. G., Porres, J. M., Mullaney, E. J., and Brinch-Pedersen, H., 2007. Phytase: source, structure and application. In Industrial enzymes (pp. 505-529). Springer Netherlands.
- Lelliott, R. A. and Stead D. E., 1987. Methods for The Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blacwell Scientific Publications. p216.
- Luechai, S., and Dharmsthiti, S. C. (2010). Cultivation of *Lactobacillus plantarum* KV 1 in Whey-Containing Medium for Use as Starter in Vegetable Fermentation. International Journal of Biotechnology and Biochemistry, 6(6), 877-888.
- Maenz, D. D., and Classen, H. L., 1998. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. Poultry Science, 77(4), 557-563.
- Mullaney, E. J., Daly, C. B., Kim, T., Porres, J. M., Lei, X. G., Sethumadhavan, K., and Ullah, A. H., 2002. 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(4), 1016-1020.
- Nelson, D. L. and Cox, M. M., 2004. "Lehninger Principles of Biochemistry, Chapter 6. W. H. Freeman, Fourth Edition."
- Palacios, M. C., Haros, M., Rosell, C. M., and Sanz, Y. (2005). Characterization of an acid phosphatase from *Lactobacillus pentosus*: regulation and biochemical properties. Journal of Applied Microbiology, 98(1), 229-237.
- Palacios, M.C., Haros, M., Sanz, Y., Rosell, C.M., 2008. Selection of lactic acid bacteria with high phytate degrading activity for application in whole wheat breadmaking. LWT 41, 82–92.

- Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C. R., Rodriguez-Leon, J. A., and Soccol, V. T., 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource technology*, 77(3), 203-214.
- Pandey, A., and Ramachandran, S., 2006. *Enzyme Technology: General Introduction*, (A. Pandey, C. Webb, C.R. Soccol and C. Larroche, editörler), Springer Science and Business Media, Inc. And Asiatech Publishers Inc., New York, p 1-11.
- Pattinson, W., Van Beuzekom, B., and Wyckoff, A. 2001. *Internationally Comparable Indicators on Biotechnology: A Stocktaking, A Proposal for Work and Supporting Material*. Statistics Canada, Science, Innovation and Electronic Information Division.
- Pavlova, S. I., Kilic, A. O., Kilic, S. S., So, J. S., Nader- Macias, M. E., Simoes, J. A., and Tao, L., 2002. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *Journal of Applied Microbiology*, 92(3), 451-459.
- Pfeffer, M. 1872. Comprehensive study of aleurone grains, identification of globoid and approximation of its chemical nature. *Johrb. Wiss. Bot.* 8:429- 574.
- Pidoux, M., 1989. The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 5(2), 223-238.
- Raghavendra, P., and Halami, P. M., 2009. Screening, selection and characterization of phytic acid degrading lactic acid bacteria from chicken intestine. *International journal of food microbiology*, 133(1), 129-134.
- Raghavendra, P., Rao, T.S.C., and Halami, P. M., 2010. Evaluation of beneficial attributes for phytate-degrading *Pediococcus pentosaceus* CFR R123. *Beneficial Microbes*, Vol.1, Nr.3, p: 259-264.
- Reale, A., Mannina, L., Tremonte, P., Sobolev, A.P., Succı, M., Sorrentino, E., and Coppola, R., 2004. Phytate Degradation by Lactic Acid Bacteria and Yeasts during the Wholemeal Dough Fermentation: a 31P NMR Study. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 6300–6305.
- Rodriguez, E., Porres, J. M., Han, Y., and Lei, X. G., 1999. Different Sensitivity of Recombinant *Aspergillus niger* Phytase (r-PhyA) and *Escherichia coli* pH 2.5 Acid Phosphatase (r-AppA) to Trypsin and Pepsinin Vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 365(2), 262-267.
- 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(1), 105-112.
- Sáez, M. J., Gómez Niño, A., and Carretero, A. 2008. Matching society values: students' views of biotechnology. *International Journal of Science Education*, 30(2), 167-183.
- Sarıbuğa, E., 2013. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus* Bakterilerinden Fitaz Enziminin Kısmen Saflaştırılması Ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Fen bilimleri enstitüsü, Atatürk üniversitesi.
- Saygılı, H., Şahin, F., ve Aysan, Y., 2006. "Fitobakteriyoloji." Meta Basım Matbaacılık, İzmir, Türkiye.

- Schulze, E., Winterstein, E., 1896. "Phytates in Cereals and Legumes." *Physiol. Chem.* 40:120.
- Scott, J. J., Loewus, F.A., 1986a. "Phytate metabolism in plants. In: Graf E, editor. *Phytic Acid: Chemistry and Applications* " Minneapolis, MN: Pilatus Press: 23-42.
- Suzuki, U., Yoshimura, K., and Takaishi, M., 1907. About the enzyme 'phytase', which splits 'anhydro-oxy-methylene diphosphoric acid". *Bulletin of the College of Agriculture, Tokyo Imperial University*, 7, 503–512 (in German).
- Sümengen, M., Dincer, S., and Kaya, A., 2013. Production and characterization of phytase from *Lactobacillus plantarum*. *Food Biotechnology*, 27(2), 105-118.
- Sümengen, M., Dincer, S., and Kaya, A., 2012. Phytase production from *Lactobacillus brevis*. *Turkish Journal of Biology*, 36(5), 533-541.
- Tang, A. L., Wilcox, G., Walker, K. Z., Shah, N. P., Ashton, J. F., and Stojanovska, L., 2010. Phytase Activity from *Lactobacillus* spp. in Calcium- Fortified Soymilk. *Journal of food science*, 75(6), M373-M376.
- Tarakçıoğlu, S., 2016. Erzurum Ilıca Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve *Bacillus Thermoamylovorans* ST-10 İzolatından Lipaz Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterisasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fenbilimleri Enstitüsü Atatürk Üniversitesi.
- Temiz, A., 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- Terzaghi, B. E., and Sandine, W. E., 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied microbiology*, 29(6), 807-813.
- Tomschy, A., Brugger, R., Lehmann, M., Svendsen, A., Vogel, K., Kostrewa, D., Lassen, S., Burger, D., Kronenberger, Van Loon, A. P. G. M., Pasamontes, L., Wyss, M., 2002. Engineering of phytase for improved activity at low pH, *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1907–1913.
- Tran, T. T., Mamo, G., Mattiasson, B., and Hatti-Kaul, R. 2010. A thermostable phytase from *Bacillus* sp. MD2: cloning, expression and high-level production in *Escherichia coli*. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 37(3), 279-287.
- Truter, M. R., and Tate, M. E., 1970. Crystallographic studies of hydrates of dodecasodium myo-inositol hexaphosphate (phytic acid). *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic*, 70-71.
- Ullah, A. H., and Phillippy, B. Q., 1994. Substrate selectivity in *Aspergillus ficuum* phytase and acid phosphatases using myo-inositol phosphates. *Journal of agricultural and food chemistry*, 42(2), 423-425.
- Vohra, A., and Satyanarayana, T., 2003. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Critical reviews in biotechnology*, 23(1), 29-60.
- Wise, A. L. A. N., and Gilbert, D. J., 1982. Phytate hydrolysis by germfree and conventional rats. *Applied and environmental microbiology*, 43(4), 753-756.
- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Remy, 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., Remy, R., Tessier, M., Kronenberger, A., Middendorf, A., Lehmann, A., Scnoebelen, L., Rothlisberger, U., Kuszniir, E., Wahl, G., Muller, F., Lahm, H. W., Vogel, K., 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(2): 359-366.
- Yanke, L. J., Bae, H. D., Selinger, L. B., and Cheng, K. J., 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology*, 144(6), 1565-1573.
- Zamudio, M., Gonzales, A., and Medina, J.A., 2001. *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. *Letters in Applied Microbiology*, 32, 181-184.
- Zeren, B., 2015. Topraktan İzole Edilen *Bacillus megaterium* EBD 9-1 Suşundan Fitaz Geninin *E. coli*'de Klonlanma çalışmaları. Yüksek lisans tezi, Fen bilimleri enstitüsü, Uludağ üniversitesi.
- Zotta, T., Ricciardi, A., and Parente, E., 2007. Enzymatic activities of lactic acid bacteria isolated from Cornetto di Matera sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 165– 172.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı: Osman

Soyadı: MALKOÇ

Doğum Tarihi: 01.10.1993

Doğum Yeri: Köprübaşı/Trabzon

Medeni Hali: Bekar

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lise : Köprübaşı Lisesi - Köprübaşı/Trabzon (2008)

Lisans : Atatürk Üniversitesi
Ziraat Fakültesi (2011-2015)

Yüksek Lisans: Atatürk Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü (2015-2017)

İŞ TECRÜBESİ

Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü (2014) – Stajyer – Trabzon