

**SICAK SU KAYNAKLARINDAN TERMOFİLİK
FİLAMENTLİ FUNGUSLARIN İZOLASYONU,
TANILANMASI VE FİTAZ ENZİMİ
ÜRETİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Derya BERİKTEN
Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Aralık, 2013

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Derya BERİKTEN'in “Sıcak Su Kaynaklarından Termofilik Filamentli Fungusların İzolasyonu, Tanılanması ve Fitaz Enzimi Üretimlerinin Araştırılması” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 22.11.2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı		İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. MERİH KIVANÇ		
Üye	: Prof. Dr. AHMET ASAN	
Üye	: Prof. Dr. HAYRETTİN TÜRK	
Üye	: Doç. Dr. ALEV HALİKİ UZTAN	
Üye	: Doç. Dr. NALAN SARIÖZLÜ	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

SICAK SU KAYNAKLARINDAN TERMOFİLİK FİLAMENTLİ FUNGUSLARIN İZOLASYONU, TANILANMASI VE FİTAZ ENZİMİ ÜRETİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Derya BERİKTEN

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Merih KIVANÇ

2013, 198 sayfa

Bu çalışmada sıcak su kaynaklarından termofilik filamentli fungusların izolasyonu, morfolojik ve moleküler tekniklerle identifikasyonu ve fitaz enzimi üretimi yeteneklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Kütahya ilinde bulunan 12, Afyon ilinde bulunan 4 kaplıcadan 2008 ve 2009 yıllarında birer kere örnekleme yapılmıştır. Bu sıcak su kaynaklarından alınan 47 farklı sıcak su örneğinden yapılmış olan izolasyon işlemleri sonucunda toplam 137 adet fungus izolatu elde edilmiştir. Bu izolatlardan 25 tanesinin termofilik olduğu yapılmış olan sıcaklık testleri ile belirlenmiştir. Termofilik fungus izolatlarının morfolojik ve ITS, 26-28S rDNA'nın D1/D2 bölgelerine dayalı moleküler tanılamaları gerçekleştirilmiştir. Fitaz enzimi tarama çalışmaları ile seçilen *Thermomyces lanuginosus* kullanılarak katı faz fermentasyon (KFF) yoluyla fitaz enzimi üretimi gerçekleştirilmiştir. Klasik yöntem ve cevap yüzey yönteminin merkezi bileşke tasarımı fitaz üretiminin optimizasyonunda kullanılmıştır.

Morfolojik ve moleküler identifikasyonlar sonucunda termofilik fungus izolatlarının *Myceliophthora thermophila*, *Myceliophthora hinnulea*, *Melanocarpus albomyces*, *Rhizomucor pusillus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Scytalidium thermophilum*, *Talaromyces thermophilus*, *Thielavia terrestris* ve *Malbranchea cinnamomea* türlerinin üyeleri olduğu saptanmıştır. Bu tanılama çalışmaları ile Kütahya ve Afyon illerindeki sıcak su kaynaklarındaki termofilik funguslar ilk kez ortaya konmuştur.

Fitaz enziminin üretiminde kullanılmış olan optimizasyon stratejisi geleneksel ve istatistiksel yöntemlerin bir kombinasyonunu oluşturmuştur. Maksimum fitaz aktivitesi substrat olarak pirinç kepeğinin kullanılması ile elde edilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi elde edilmesini sağlayan parametrelerin optimum seviyeleri %70 nem, 7 gün fermentasyon süresi, %40 inokulum büyüklüğü, 55 °C inkübasyon sıcaklığı, 7,5 başlangıç pH, %30 havalandırma alanı, 5 günlük aşı kültür, %1 süktroz, 2,5 mM ZnSO₄ olarak belirlenmiştir. Uygulanan optimizasyon çalışmaları sonucunda fitaz aktivitesinde 10,83 kat artış sağlanmıştır (0,30 – 3,248 U/ml/dk) ve spesifik fitaz aktivitesi 8,97 U/mg olarak belirlenmiştir. SDS-PAGE ile *T. lanuginosus* fitaz enziminin molekül ağırlığının ~30 kDa oluşturduğu belirlenmiştir ve zimogram analizi bu bandın fitaz enzimine ait olduğunu doğrulamıştır.

Anahtar Kelimeler: Termofilik fungus, Moleküler identifikasyon, Sıcak su kaynakları, Fitaz, Cevap yüzey yöntemi

ABSTRACT**PhD Thesis****ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THERMOPHILIC
FILAMENTOUS FUNGI FROM HOT SPRING WATERS AND
RESEARCHING OF THEIR PHYTASE PRODUCTION****Derya BERİKTEN****Anadolu University Graduate School of Sciences****Biology Programme****Supervisor: Prof.Dr. Merih KIVANÇ****2013, 198 pages**

This study focused on the isolation of thermophilic filamentous fungi from hot spring waters, characterization of morphologic and molecular technique and researching of their phytase production capabilities. The sampling was performed one time of year 2008 and 2009 from 12 hot spring in Kütahya and 4 hot spring in Afyon. Totally 137 fungus isolates were obtained as the results of the isolation procedures from 47 different hot water samples taken from hot spring waters. It was determined by temperature tests that 25 of them from these isolates were thermophilic. Morphologic and molecular identification based on ITS, D1/D2 region of 26-28S rDNA of thermophilic isolates was carried out. Phytase enzyme production by using *Thermomyces lanuginosus* which is selected by phytase screening studies was carried out by solid state fermentation (SSF). Classical approach and Central composite design (CCD) of response surface methodology were applied for the optimization of phytase production.

As a result of the morphologic and molecular identifications it was determined that thermophilic fungi isolates were the members of *Myceliophthora thermophila*, *Myceliophthora hinnulea*, *Melanocarpus albomyces*, *Rhizomucor pusillus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Scytalidium thermophilum*, *Talaromyces thermophilus*, *Thielavia terrestris* ve *Malbranchea cinnamomea* species. Thermophilic fungi of hot spring waters of Kütahya and Afyon provinces were exhibited with these identification studies for the first time.

Optimization strategy which was used to production of phytase was constituted a combination of traditional and statistical methods. Maximum pyhtase activity was achieved by using rice bran. The optimum levels of variables that supported maximum enzyme activity were moisture 70%, culture time 7 days, inoculum size 40%, culture temperature 55 °C, initial pH 7,5, aeration area 30%, age of seeding culture 5 days, sucrose 1%, ZnSO₄ 2,5 mM. An overall 10,83-fold enhancement in phytase activity (0,30 to 3,248 U) was attained due to the optimization and spesific phytase activity was determined as 8,97 U/mg. Molecular weight of *T. lanuginosus* phytase enzyme was determined as ~30 kDa by SDS-PAGE and zymogram analysis proved that this band belong to phytase enzyme.

Key words: Thermophilic fungus, molecular identification, hot spring water, phytase, response surface methodology.

TEŞEKKÜR

Doktoramın başlangıcından bitimine kadar, deneyimi ve bilgisi ile her türlü desteği sağlayan, yolumu açan ve yeniliklere açık, azimli tutumuyla her zaman örnek aldığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Merih KIVANÇ’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitesinde bulunan sayın hocalarım Prof.Dr. Hayrettin TÜRK ve Doç.Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ’e verdikleri destek nedeniyle teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım süresince gösterdikleri yardım ve desteklerinden ötürü mikrobiyoloji laboratuvarında çalışan tüm hocalarım ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu aşamaya gelirken, her zaman yanımda yer alan, annem, babam, kayınvalidem ve kayınpederime bana duydukları güvenden dolayı teşekkür ederim.

Tüm çalışmam süresince her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan, sonsuz sabrı ile her zaman yanımda olan sevgili eşim Tolga BERİKTEN’e çok teşekkür ederim.

Son olarak hayatıma girdiğinden beri beni daha güçlü yapan, sevgisiyle içimi ısıtan ve dünyanın en güzel duygusu olan anneliği bana yaşatan canım oğlum Berk’im varlığıyla bana verdiğin destek için sana çok teşekkür ederim.

Derya BERİKTEN

10.11.2013

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
 1. GİRİŞ	 1
1.1. Funguslar.....	4
1.1.1 Mikrofungusların Tanılanması.....	5
1.1.1.1. Morfolojik Tanılama.....	5
1.1.1.2. Moleküler Tanılama.....	6
1.1.2. Fungusların Yayılışı ve Sıcaklık Gereksinimleri.....	8
1.1.3. Termofilik funguslar.....	9
1.2. Enzimler.....	12
1.2.2. Enzimlerin Yapısı.....	14
1.2.3. Enzimlerin Çalışma Mekanizması.....	14
1.2.4. Enzimlerin Katalitik Özellikleri.....	15
1.2.5. Enzim kaynakları.....	16
1.2.6. Termostabil Fungal Enzimler.....	16
1.3. Fitaz Enzimi.....	17
1.3.1. Fitik Asit (Myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis dihidrojen fosfat).....	18
1.3.2. Fitazların Kullanım Alanları.....	22
1.3.2.1. Yem Katkısı Olarak Kullanımı.....	22
1.3.2.2. Gıdalarda Kullanımı.....	23
1.3.2.3. Myo-İnositol Fosfatların Hazırlanması	24
1.3.2.4. Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrisi.....	24
1.3.2.5. Toprak İyileştirmede Kullanımı.....	25
1.3.3. Fitazların Sınıflandırılması.....	25

1.3.3.1. Histidin Asit Fosfatazlar (HAF).....	25
1.3.3.2. β -Pervane Fitazlar (BPFhy).....	26
1.3.3.3. Sistein Fosfatazlar (SF).....	27
1.3.3.4. Mor Asit Fosfatazlar (MAF).....	27
1.3.4. Fitaz Kaynakları.....	27
1.3.4.1. Bitkisel Fitazlar.....	27
1.3.4.2. Mikrobiyal Fitazlar.....	28
1.3.4.2.1. Bakteriyel Fitazlar.....	28
1.3.4.2.2. Maya Fitazları.....	29
1.3.4.2.3. Fungal Fitazlar.....	29
1.4. Enzim Üretim Teknikleri.....	32
1.4.1. Katı Faz Fermentasyon.....	32
1.4.2. Katı Faz Fermentasyon ile Endüstriyel Enzim Üretimi.....	33
1.4.2.1. KFF ile Enzim Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar.....	33
1.4.2.2. KFF’de Kullanılan Katı Substratlar.....	34
1.4.2.3. KFF’da Enzim Üretimini Etkileyen Faktörler.....	35
1.4.2.4. KFF’nin Avantaj ve Dezavantajları.....	36
1.4.2.5. KFF ile Fitaz Enzimi Üretimi.....	38
1.5. Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) ile Optimizasyon.....	39
1.5.1. Yüksek-Dereceli Tasarımlar için Faktör Seviyeleri.....	40
1.5.2. Deney Sayısının ve Model Katsayıların Hesaplanması.....	41
1.5.3. CYY İçin Kullanılan Tasarım Modelleri.....	42
1.5.3.1. Box-Behnken Tasarımı (BBD).....	43
1.5.3.2. Merkezi Bileşke Tasarımı (CCD: Central Composite Design).....	43
1.5.4. Model Uygunluğunun Test Edilmesi.....	44
1.5.5. Model Uygunsuzluğu (Lack of Fit) Testi.....	44
1.5.6. Optimizasyon.....	45
1.5.7. CYY ile Fitaz Üretiminin Optimizasyonu.....	47
1.6. Enzim Üretim Çalışmalarında Temel Analizler.....	48
1.6.1. Enzim Aktivitesinin Tayini.....	48
1.6.2. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	49

1.6.2.1. Bradford (Boya-Bağlama) Yöntemi.....	49
1.6.3. Doğal Olmayan (Denatüre) Jel Elektroforezi: SDS- PAGE.....	50
2. MATERYAL VE METOT	51
2.1. Materyal.....	51
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	51
2.1.1.1. Potato Dextrose Agar Base (PDA) (1.10130, Merck).....	51
2.1.1.2. Maya Patates Çözülebilir Nişasta Agar (MPÇNA).....	56
2.1.1.3. Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (ME063, Himedia).....	56
2.1.1.4. Malt Ekstrakt Agar (MEA).....	57
2.1.1.5. %2 Malt Ekstrakt Agar (%2 MEA).....	57
2.1.1.6. Fitaz Enzimi Tarama Besiyeri.....	57
2.1.1.7. Fitaz Enzimi Üretim Tuz Solüsyonu (PSM tuzu).....	58
2.1.1.8. Glukoz Ortamı.....	58
2.1.1.9. Czapek Dox Agar (CZ).....	59
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar.....	59
2.1.2.1. Czapek Konsantresi (CK).....	59
2.1.2.2. Lacto-Pamuk Mavisi Destek Çözeltisi (LCB Destek Çözeltisi).....	59
2.1.2.3. Tris-acetate-EDTA (TAE) 50X.....	60
2.1.2.4. Liziz Tamponu.....	60
2.1.2.5. Substratın Hazırlanışı.....	61
2.1.2.6. 0,2 M Sodyum asetat tamponu.....	61
2.1.2.7. Reaksiyonu Durdurucu Çözeltinin Hazırlanışı.....	61
2.1.2.8. Renklendirme Çözeltisinin Hazırlanışı.....	61
2.1.2.9. Bradford Belirteç Solüsyonu 5X.....	61
2.1.2.10. 1,5 M Tris HCl (pH 8.8).....	62
2.1.2.11. 1M Tris-HCl (pH 6.8).....	62
2.1.2.12. %10 SDS.....	62
2.1.2.13. %10 Amonyum Persülfat (AMPS).....	62

2.1.2.14. % 12'lik Ayırma Jelinin Hazırlanışı.....	62
2.1.2.15. % 5'lik Yükleme Jelinin Hazırlanışı.....	63
2.1.2.16. Örnek Yükleme Tamponu (62,5 mM Tris (pH 6.8), %2 SDS, %10 gliserol, 0,72M 2-β-merkaptoetanol, %0,05 bromfenol mavisi).....	63
2.1.2.17. Yürütme Tamponu 5X (0,025M Tris, 0,192 M glisin, %0,1 SDS, pH 8.3).....	64
2.1.2.18. Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyama Çözeltisi (% 50 metanol, % 10 asetik asit, % 0,05 Coomassie Brilliant Blue R-250).....	64
2.1.2.19. Yıkama (bağlanmamış boyayı uzaklaştırma 'destaining') Çözeltisi (% 5 metanol, % 12,5 asetik asit, % 82,5 distile su).....	64
2.2. Metot.....	65
2.2.1. Su Örneklerinin Toplanması.....	65
2.2.2. Su Örneklerinin Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	65
2.2.3. Filamentli Fungusların İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	65
2.2.4. Tek Spor İzolasyonu ve Kültürlerin Muhafazası.....	66
2.2.5. Sıcaklık Testleri.....	67
2.2.6. Biolog Microstation Sistemi ile Karbonhidrat Testlerinin Belirlenmesi.....	67
2.2.7. Termofilik Fungusların Geleneksel Yöntemlerle Tanılanması.....	68
2.2.8. Termofilik Fungusların Moleküler Tanılanması.....	68
2.2.8.1. DNA izolasyonu.....	68
2.2.8.2. Moleküler Tanılamada Kullanılacak Gen Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonları.....	70
2.2.8.3. PCR Ürünlerinin saflaştırılması.....	71
2.2.8.4. Dizi Analizi.....	72
2.2.8.5. Dizilenen Gen Bölgelerinin Analizi.....	73

2.2.9. Fitaz Enzimi Üreten Türlerin Kültürel Ortamlarda Belirlenmesi.....	73
2.2.10. Katı Faz Fermentasyonu (KFF) Yoluyla Fitaz Üretimi.....	74
2.2.10.1. Aşı Kültürün Hazırlanması.....	74
2.2.10.2. Katı Faz Fermentasyon.....	74
2.2.10.3. Fitaz Enziminin Ekstraksiyonu.....	74
2.2.10.4. Fitaz Aktivitesinin Belirlenmesi için Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması.....	74
2.2.10.5. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	75
2.2.11. KFF Ortamında En İyi Fitaz Aktivitesine Sahip Türün Belirlenmesi.....	75
2.2.12. Fitaz Geninin Varlığının Moleküler Tekniklerle Taranması.....	76
2.2.13. Üretim Koşullarının KFF’de Üretilen <i>Thermomyces lanuginosus</i> ’un Fitaz Sentezi Üzerine Etkisi.....	77
2.2.13.1. Klasik Yöntemle Optimizasyon.....	77
2.2.13.1.1. Uygun Substrat Seçimi.....	77
2.2.13.1.2. Başlangıç Nem Düzeyinin Etkisi.....	78
2.2.13.1.3. İnokulum Miktarının Etkisi.....	78
2.2.13.1.4. Üretim Süresinin Optimizasyonu.....	79
2.2.13.2. Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) ile Optimizasyon.....	79
2.2.13.2.1. Deneysel Modelin Doğrulanması.....	80
2.2.13.3. Katkı Maddelerinin Etkisi.....	81
2.2.14. Optimum Aktiviteden Spesifik Aktivite Hesabı.....	82
2.2.14.1. Protein Konsantrasyonlarının Bradford Yöntemi ile Belirlenmesi.....	83
2.2.15. SDS-PAGE Yöntemi ile Enzimin Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi.....	84
2.2.15.1. SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması.....	84
2.2.15.2. Örneğin Hazırlanması, Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi.....	84

2.2.15.3. SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Görüntülenmesi.....	85
2.2.16. SDS-PAGE Jeline Zimogram Analizi.....	85
3. BULGULAR	87
3.1. Su Örneklerinin Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	87
3.2. Sıcak Su Kaynaklarından İzole Edilip Saflaştırılan Filamentli Funguslar.....	89
3.3. Sıcaklık Testleri.....	92
3.4. Biolog Microstation Sistemi ile Karbonhidrat Testleri.....	92
3.5. Termofilik Fungusların Geleneksel Yöntemlerle Tanılanması.....	101
3.5.1. <i>Talaromyces thermophilus</i> Stolk (1965).....	103
3.5.2. <i>Rhizomucor pusillus</i> (Lindt) Schipper (1978).....	105
3.5.3. <i>Myceliophthora hinnulea</i> Awao & Udagawa (1983).....	107
3.5.4. <i>Humicola insolens</i> Cooney & R. Emers. (1964).....	109
3.5.5. <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> Cooney & R. Emers. (1964).....	111
3.5.6. <i>Myriococcum albomyces</i> Cooney & R. Emers. (1964).....	113
3.5.7. <i>Malbranchea pulchella</i> var. <i>sulfurea</i> (Miehe) Cooney & R. Emers. (1964).....	115
3.5.8. <i>Myceliophthora thermophila</i> (Apinis) Oorschot (1977).....	117
3.5.9. <i>Thermomyces lanuginosus</i> Tsiklinkskaya (1899).....	119
3.5.10. <i>Thielavia terrestris</i> (Apinis) Malloch & Cain (1972).....	121
3.5.11. <i>Scytalidium thermophilum</i> (Cooney & R. Emers.) Austwick (1976).....	123
3.6. Termofilik Fungusların Moleküler Tanılanması.....	125
3.6.1. DNA İzolasyonu.....	125
3.6.2. İncelenen Gen Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonu ve Saflaştırılması.....	125

3.6.3. Saflaştırılmış PCR Ürünlerinden Dizi Analizi.....	127
3.6.4. Dizilenen Gen Bölgelerinin Analizi	128
3.7. Fitaz Enzimi Üreten Türlerin Kültürel Ortamlarda Belirlenmesi....	136
3.8. Katı Faz Fermentasyonu (KFF) Yoluyla Fitaz Üretimi.....	136
3.8.1. Kalibrasyon Grafiğinden Eğim Değerinin Belirlenmesi.....	136
3.8.2. KFF Ortamında En İyi Fitaz Aktivitesine Sahip Türün Seçilmesi.....	139
3.9. Fitaz Geninin Varlığının Moleküler Tekniklerle Taranması.....	139
3.10. KFF'deki Üretim Koşullarının <i>Thermomyces lanuginosus</i> 'un Fitaz Sentezi Üzerine Etkisi	141
3.10.1. Klasik Yöntemle Optimizasyon.....	141
3.10.1.1. Uygun Substrat Seçimi.....	141
3.10.1.2. Başlangıç Nem Düzeyinin Etkisi.....	142
3.10.1.3. İnokulum Miktarının Etkisi.....	142
3.10.1.4. Üretim Süresinin Optimizasyonu.....	143
3.10.2. Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) ile Optimizasyon.....	144
3.10.2.1. Deneysel Modelin Doğrulanması.....	150
3.11. Katkı Maddelerinin Etkisi.....	150
3.12. Spesifik Fitaz Aktivitesi.....	152
3.12.1. Kalibrasyon Grafiği.....	152
3.12.2. Protein Konsantrasyonu ve Spesifik Aktivite.....	153
3.13. Enzimin SDS-PAGE ve Zimogram Analizine Ait Bulgular.....	153
4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	156
KAYNAKLAR	181

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hekzafosfat ‘Fitik Asit’	19
1.2. Fitik Asit Şelatının Kimyasal Yapısı.....	20
1.3. Fitatın Fitaz Enzimi ile İnositol, Fosfat ve Diğer Elementlere Hidrolizi.....	22
1.4. Histidin asit fosfataz sınıfından olan <i>Aspergillus niger</i> fitaz A enzimini temsil eden üç boyutlu görüntü.....	26
1.5. Faktör dizilerinin fonksiyonu olarak cevapların olası davranışları.....	41
1.6. Maksimum nokta (a), minimum nokta (b) ve eğer noktası (c) için cevap yüzey grafikleri ve izohips eğrileri.....	46
3.1. Biolog sonuçları ile oluşturulan ağaç.....	97
3.2. <i>Talaromyces thermophilus</i> ’un (A-B). MPCNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D). mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; penicillus yapısı, konidyumları).....	104
3.3. <i>Rhizomucor pusillus</i> ’un (A-B). MPCNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D-E). Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu; sporangium ve rhizoid yapısı, sporangiosporlar).....	106
3.4. <i>Myceliophthora hinnulea</i> ’nın (A-B). MPCNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D). Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; Aleurospor oluşum tipleri ve hifler).....	108
3.5. <i>Humicola insolens</i> ’in (A-B). MPCNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D). Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; Aleurosporlar ve hifler).....	110
3.6. <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> ’nın (A-B). MPCNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D). Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; Genç ve olgun aleurosporlar ve hifler).....	112
3.7. <i>Myriococcum albomyces</i> ’in (A-B). MPCNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D-E-F). Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; havai, sürünücü ve batık hifler, genç ve olgun askokarplar).....	114
3.8. <i>Malbranchea pulchella</i> var. <i>sulfurea</i> ’nın (A-B). MPCNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D-E). Mikroskopik	

görünüşü (ışık mikroskobu 100x; üretken hif ve şişkinlikler, zincir ve tek tek blok benzeri sporlar).....	116
3.9. <i>Myceliophthora thermophila</i> 'nın (A-B). MPÇNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C). Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; konidyofor ve zincir şeklindeki konidyumlar).....	118
3.10. <i>Thermomyces lanuginosus</i> 'un (A-B). MPÇNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D). Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; Genç ve olgun aleurosporlar ve aleurphorlar).....	120
3.11. <i>Thielavia terrestris</i> 'in (A-B). MPÇNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D). Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; konidyumlar ve hifler üzerindeki konidyoforlar).....	122
3.12. <i>Scytalidium thermophilum</i> 'un (A-B). MPÇNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D). Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; Genç ve olgun aleurosporlar ile hifler).....	124
3.13. Genomik DNA izolasyon sonucu.....	125
3.14. Kısmi ITS1-5.8S-ITS2 bölgesine ait PCR sonucu.....	126
3.15. D1/D2 bölgesine ait PCR sonucu.....	126
3.16. İncelenen izolatların ITS dizilerine dayalı filogenetik ilişkilerinin incelenmesi.....	134
3.17. İncelenen izolatların D1/D2 dizilerine dayalı filogenetik ilişkilerinin incelenmesi.....	135
3.18. Fitaz tarama ortamında gerçekleştirilmiş olan tarama sonucu görünüşü.....	138
3.19. Fitaz aktivitesi için kalibrasyon grafiği.....	138
3.20. Kısmi 3-phytaseA bölgesine ait PCR sonucu.....	140
3.21. Fitaz sentezine bazı substratların etkisi.....	142
3.22. KFF'da başlangıç nem düzeyinin fitaz aktivitesi üzerine etkisi.....	143
3.23. KFF'da inokulum miktarının fitaz aktivitesi üzerine etkisi.....	143
3.24. KFF kültürlerinde üretim süresinin fitaz aktivitesine etkisi.....	144
3.25. Fitaz aktivitesine aşı kültürün yaşı ve sıcaklığın etkilerini gösteren cevap yüzey grafiği.....	148
3.26. Fitaz aktivitesine aşı kültürün yaşı ve havalandırma alanının etkilerini gösteren cevap yüzey grafiği.....	149
3.27. Fitaz aktivitesine inkübasyon sıcaklığı ve havalandırma alanının	

etkilerini gösteren cevap yüzey grafiği.....	149
3.28. Fitaz enzimi üretimine çeşitli katkı maddelerinin etkisi.....	152
3.29. Protein miktarlarının belirlenmesi için hazırlanan kalibrasyon grafiği.....	153
3.30. Fitaz enziminin SDS-PAGE (solda; M: protein moleküler ağırlık markırı; 1, 2, 3, 4. sütunlar optimizasyon öncesi, 5. sütun optimizasyon sonrası enzim ekstresi) ve Zimogram Sonucu (Sağda; M: protein moleküler ağırlık markırı; 1 ve 2. sütunlar optimizasyon öncesi, 3. Sütun optimizasyon sonrası enzim ekstresi).....	155

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Termofilik Fungusların Taksonomik Özellikleri ve Sıcaklık Gereksinimleri	13
1.2. Baklagil, tahıl ve meyvelerdeki fitik asit miktarları.....	21
1.3. Çeşitli mikrobiyal fitazlar ve biyokimyasal özellikleri	31
2.1. Kütahya'daki bölgelerden 1. izolasyonda alınan sıcak su örnekleri ve özellikleri.....	52
2.2. Kütahya'daki bölgelerden 2. izolasyonda alınan sıcak su örnekleri ve özellikleri.....	53
2.3. Afyon'daki bölgelerden 1. izolasyonda alınan sıcak su örnekleri ve özellikleri.....	54
2.4. Afyon'daki bölgelerden 2. izolasyonda alınan sıcak su örnekleri ve özellikleri.....	55
2.5. Tarımsal artıkların kimyasal özellikleri.....	55
2.6. Türlerin tanımlanmasında kullanılan primerler.....	71
2.7. Dört Bağımsız Değişkenin CYY'de Kullanılan Farklı Değerleri.....	80
2.8. CYY ile Fitaz Üretiminin Optimizasyonunda Kullanılan Deney Planı.....	81
3.1. Kütahya'daki bölgelerden alınan sıcak su örneklerinin kimyasal özellikleri.....	87
3.2. Afyon'daki bölgelerden alınan sıcak su örneklerinin kimyasal özellikleri....	88
3.3. Birinci izolasyon çalışmasında mikrofungus elde edilen bölgeler ve sıcak su örnekleri.....	90
3.4. İkinci izolasyon çalışmasında mikrofungus elde edilen bölgeler ve sıcak su örnekleri.....	91
3.5. Sıcaklık Testi Sonuçları (#: 1 cm'den küçük mikrokoloni; termofilik türler gri vurgulama ile belirtilmiştir).....	93
3.6. Karbonhidrat testi sonuçları.....	98
3.7. Termofilik fungus izolatlarının morfolojik tanılama sonuçları.....	102
3.8. Dizi analizi gerçekleştirilen izolatların belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri.....	130
3.9. Termofilik fungusların fitaz tarama sonuçları.....	137
3.10. Kültürel ortamda seçilmiş izolatlardan KFF ile elde edilen fitaz aktiviteleri.....	139

3.11. Dizi analizi gerçekleştirilen fitaz gen bölgesinin belirlenen en yakın Genozymes Project Public Genomes gen bankası temsilcisi.....	141
3.12. CYY ile optimizasyon deneyleri, tahmin edilen aktiviteler ve deneyler sonucunda gözlenen aktiviteler.....	145
3.13. Aktivite için tahmini regresyon katsayıları, ANOVA sonuçları.....	146
3.14. CYY için merkezi bileşke modeli sonuçlarının ANOVA tablosu.....	147
3.15. Çeşitli katkı maddelerinin KFF ile fitaz üretimi üzerine etkileri.....	151

1. GİRİŞ

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizörler olarak tanımlanırlar (Wiseman, 1987). Endüstriyel açıdan önemi bulunan pek çok reaksiyon, biyolojik ortamlarda çok daha kolay ılımlı koşullarda gerçekleşmektedir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir. İnsanlar gerçekte binlerce yıl öncesinden enzimlerden yararlanma gelmişlerdir. Örneğin alkol fermentasyonu, bira ve ekmek yapımı gibi işlemler ilk biyoteknolojik prosesler olarak tanımlanabilirler. Enzimlerin bulunuşu ve enzimolojinin gelişmesi paralelinde onlardan bilinçli bir şekilde yararlanma olanağı da ortaya çıkmıştır (Çetin, 1983).

Canlı sistemlerdeki enzim biyosentezi canlılığın devamı açısından büyük önem taşımaktadır. Canlılığın bütün evrelerinde sabit ya da değişken düzeylerde ayarlanan enzimatik aktiviteler sayesinde metabolizmanın düzenli bir şekilde yürümesi sağlanmaktadır (Jacob and Scudder, 1994).

Enzimlerin bulunuşu ve enzimolojinin gelişmesi paralelinde onlardan bilinçli bir şekilde yararlanma olanakları da ortaya çıkmıştır. Enzimlerin ilgili reaksiyonları ılımlı koşullarda çok hızlı ve spesifik bir biçimde katalizliyor olmaları, onların ayrıntılı enzimolojik araştırmaların paralelinde, çeşitli pratik uygulamalarda da kullanılmalarını da gündeme getirmiştir. Enzimlerin ticari olarak kullanımlarında, kullanım alanlarına göre özellikleri, dolayısıyla miktar ve maliyetleri önemli değişiklikler göstermektedir. Enzimlerden başlıca endüstriyel, tıbbi, bilimsel ve analitik amaçlı olmak üzere üç farklı alanda yararlanılmaktadır. Enzimler canlı materyallerden elde edilmek zorundadır. Ticari konularda daha ucuz olan önceliği alacağından dolayı bir kimyasal yöntem enzimatik yöntemle göre daha ucuz ise tercih edilecektir. Bu nedenle enzimlerin hangi kaynaktan olursa olsun yüksek miktarda üretilibilmeleri önem taşımaktadır (Palmer, 2001).

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü 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 edilebilmeleri gibi avantajları

bulunmaktadır. Bu nedenle enzimlerin endüstride kullanımı kaçınılmaz olmuştur (Wiseman, 1987). Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin üretiminde, mikroorganizma kullanımı artmıştır. Endüstriyel enzimlerin üretiminde kullanılan mikrobiyal gruplardan bir tanesini de genellikle ekstraselüler enzim salgılama yeteneğine sahip funguslar oluşturmaktadır (Demain ve Solomon, 1981).

Günümüz dünyasında, çeşitli biyorafinerilerde uygulanan proseslerin bir çoğu yüksek sıcaklıklarda stabil olabilen enzimleri içermektedir. Endüstriyel uygulamalarda termofiller ve termostabil enzimler oldukça önemlidir. Bu termostabil enzimler çoğunlukla mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bir enzim veya proteinin termostabil olarak tanımlanması için seçilen yüksek sıcaklıkta ($> 55^{\circ}\text{C}$) uzun bir yarı ömre sahip olması gerekmektedir. Termofilik organizmaların extrasellüler enzimleri genellikle yüksek termosabilite göstermektedir (Turner ve ark., 2007). Ökaryotik organizmalar içerisinde sadece fungusların çok az bir türü $50-60^{\circ}\text{C}$ 'ler arasındaki sıcaklıklarda yaşayabilmektedir. Termofilik funguslar toprakta, sıcak sularda, ölü bitki parçalarının yığınları üzerinde, tarım ve orman ürünlerinin yığınlarında ve diğer tüm sıcak, nemli ve aerobik bir çevrede bulunan organik materyaller üzerinde yaşayabilmektedirler. Bu ortamlarda yaşayabilmeleri amilazlar, proteazlar, lipazlar, selülozlar ve ksilanazlar gibi birçok termostabil enzimi salgılama yeteneğine sahip olmalarına bağlıdır (Maheshwari ve ark., 2000).

Bu enzimlerden bir tanesi de fitaz dır. Fitik asitin defosforilasyonu fitaz enzimleri (myo-inositol hexakisfosfat fosfohidrolaz, EC 3.1.3.8, EC 3.1.3.26, EC 3.1.3.72) tarafından katalizlenmektedir (Aşan, 2007; Sariyska ve ark., 2005; Polaina ve Maccabe, 2007). Tahıllar, baklagiller ve yağlı tohumlar hayvanlar alemi için temel besin kaynaklarındandır (Aşan, 2007). Fitik asit (myo-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakis-dihidrojen fosfat) ve fitat bu bitkilerin tohum, tane, kök ve yumrularında fosfat ile inositolün temel depo formudur (Aşan, 2007; Hidvegi ve Lasztity, 2002; Sariyska ve ark., 2005). Bitkisel beslenmenin önemli bir parçası olan Fitatın beslenme karşıtı etkisi ile yapısında bulunan fosfatın basit mideli hayvanlar ve insanlar tarafından çok az metabolize edilebilir olması sebebiyle,

defosforilasyonu hayvan ve insan beslenmesi açısından oldukça önemlidir (Aşan, 2007; Sariyska ve ark., 2005).

Fitik asidin defosforilasyonunu sağlayan fitazlar, son yıllarda özellikle beslenme, çevreyi koruma ve insan sağlığı açısından ön plana çıkmıştır. Yem üretimi, gıda işleme, kağıt yapımı ve bunlar gibi pekçok endüstriyel prosesinde yüksek sıcaklıklara dayanıklı termostabil fitazlara gereksinim olduğu belirtilmiştir (Lei ve ark., 2006; Turner ve ark., 2007).

Yapılan çalışmalarda mikrobiyal fitazlar içerisinde de termofilik fungusların ürettiği fitazların endüstriyel açıdan oldukça önemli olduğunu ve henüz bu enzimlerle ilgili yapılmış olan çalışmaların sınırlı sayıda kaldığını ortaya koymaktadır. Ayrıca farklı termofilik fungusların ürettiği fitaz enzimlerinin karakterizasyonu yapılmaya devam edilmekte ve henüz her açıdan ideal özelliklere sahip bir fitaz enzimi üretimi tam olarak gerçekleştirilememiştir. Türkiye'deki duruma bakıldığında bu konu üzerinde fazla durulmadığı görülmektedir. Birkaç tavuk işletmesinde verim arttırmak, tavuk kemik ve yumurta kabuklarını kalsiyum açısından zenginleştirmek amacıyla yemlere fitaz enzimi ilave edilmektedir. Fitaz enzimini Türkiye'de üreten firma bulunmamakta enzim yurt dışından ithal edilmektedir. Fakat son yıllarda çevre kirliliğine verilen önemin artmasıyla fosfor kirliliğine karşı yaptırımların giderek artacağı düşünülmektedir. Bu nedenle ülkemizde üretilecek, daha ucuz maliyetli ve ticari olarak kullanılabilecek özelliklere sahip fitaz enzimine gereksinim artacaktır. Ayrıca dünyada sıcak sulardan termofilik fungusların izolasyonuna ilişkin çalışma yok denecek kadar azdır. Türkiye'de ise bu konuyla ilgili bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Ekonomik açıdan bu denli önemli olan termostabil fitaz enziminin termofilik funguslar tarafından sentezlenebiliyor olması; Türkiye'deki termal sulardaki bu fungusların belirlenmesini, fitaz enziminin varlığının taranarak ortaya konmasını ve sentezledikleri fitaz enzimlerinin özelliklerinin belirlenmesini bilimsel olarak ön plana çıkarmaktadır. Bu çalışmada; Kütahya ve Afyon il sınırları içerisinde bulunan kaplıcalardan alınan sıcak su örneklerinden membran filtrasyon yöntemi ile termofilik fungusların izolasyonu, bu fungusların geleneksel ve moleküler yöntemlerle tanılanması, tanılanan funguslar arasında fitaz enzimini sentezleme yeteneğine sahip olanların kültürel ortamda belirlenmesi, kültürel ortamda belirlenen fitaz üretme yeteneğinin moleküler

biyolojik yolla doğrulanması, katı substrat fermentasyonu yoluyla fitaz üretimi, üretimin maksimum seviyede gerçekleştirilmesi için katı substrat fermentasyonunun optimizasyonu amaçlanmıştır.

1.1. Funguslar

Eukaryotik organizmalardan olan fungusların rRNA küçük alt ünitesine veya diğer moleküller üzerine dayalı soyağaçları ile sıkı bir filogenetik demet oluşturdukları görülmüştür. Fungusların üç büyük grubu göze çarpmaktadır: Filamentli funguslar (Küfler), Tek hücreli funguslar (Mayalar), Makroskobik funguslar (Şapkalı mantarlar). Fungusların habitatları oldukça çeşitlidir. Bazı funguslar aquatik olup tatlı sularda yaşarken, birkaçı ise denizlerde bulunmaktadır. Ancak fungusların çoğu karasaldır. Karasal olanlar toprak ve ölü bitki materyalleri üzerinde yaşarlar ve organik karbonun mineralizasyonunda önemli roller oynarlar. Bunların yanında fungusların bitki ve hayvan patojeni olanları da mevcuttur (Madigan and Martinko, 2010).

Funguslar besinlerini diğer canlıların hazırladığı organik bileşiklerden elde etmektedirler, yani heterotrofturlar. Funguslar besinlerini dışarıdan absorpsiyonla almaktadırlar. Bu durum monosakkaritler ve aminoasitler gibi basit bileşikler için geçerlidir. Polimerler gibi kompleks bileşikler ise önce dış ortama salınan sindirim enzimleri ile basit bileşenlere parçalandıktan sonra ozmoz veya özel taşınım mekanizmaları ile hücre içine almaktadırlar. Bu beslenme şeklinin bir sonucu olarak fungusların pek çok endüstriyel öneme sahip enzimlerin kaynağı olduğu ve yüksek miktarlarda ekstraselüler (hücre dışı) enzimleri sentezleme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir (Kaşık, 2010).

Mycota içinde yer alan organizmaların yaşam döngülerinde hem eşeyli hem de eşeysiz üreme safhaları yer almaktadır. Fungusların sınıflandırılmasında kullanılan temel kriterler, yaşam döngülerinin eşeyli safhasında oluşturdukları bu üreme yapılarıdır. Ancak eşeyli üreme yapıları özel koşullar altında oluşturulduğu için bazı fungusların eşeyli safhası ya henüz belirlenememiş ya da bazı funguslarda bu safha tamamen ortadan kalkmış olabilir. Bundan dolayı günümüzde funguslar iki şekilde sınıflandırılmaktadır. Bunlardan, fungusların yaşam döngülerinin eşeyli safhalarında oluşturdukları fruktifikasyon yapıları, eşeyli sporları ve tallus yapıları kriter alınarak gerçekleştirilen sınıflandırma

teleomorfik sınıflandırma olarak adlandırılır. Eşeyli üreme yapıları tesbit edilemediği için, bazı funguslar tallus yapıları ve eşeysiz sporları göz önüne alınarak sınıflandırılırlar, bu sınıflandırma biçimi ise anamorfik sınıflandırma olarak adlandırılır (Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008).

1.1.1 Mikrofungusların Tanınması

1.1.1.1. Morfolojik Tanılama

Fungusların tanınması ve buna bağlı olarak gerçekleştirilecek sınıflandırmada kullanılan temel kriterler, yaşam döngülerinin hangi safhasında oluşturdıklarına ve buna bağlı olarak oluşturdıkları üreme yapılarına bağlıdır. Anamorfik sınıflandırmada kullanılan yöntemlerin ortak özelliği gözlemlere dayalı olması, fazla zaman alması ve hata yapma olasılığının fazla olmasıdır. Bazı fungusların sınıflandırılmasındaki bu belirsizlik çoğu zaman aynı taksona iki farklı isim verilmesine hatta farklı organizmalara aynı isim verilmesine neden olabilmektedir (Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008). Morfolojik tanılama yapılırken tanılamada kullanılan besiyerinin cinside oldukça önemlidir. Çünkü morfolojik tanılama, incelenen fungus örneğinin her bir cins için özgün kültür ortamlarında gelişme yeteneklerine dayanmaktadır. Bu nedenle ilgili cinsler için kullanılması gereken besi ortamlarının doğru şekilde hazırlanması sonuçlar üzerinde birebir etkilidir. Tanılama yöntemlerinde pek çok fungus 25 °C’de 5-10 gün süre ile karanlıkta inkübe edilirken bazı funguslar özel inkübasyon koşullarına gereksinim duymaktadırlar. Örneğin; *Fusarium sp.* tipik spor gelişimini sıra ile değiştirilen karanlık/UV ışığı evreleri sonucunda oluşturmaktadır (Samson ve ark., 2010). Pek çok termofilik mikroorganizma doğal ortamlarda bulunabilmelerine karşılık pekçok laboratuvar besi ortamlarında kolayca gelişemezler. İlk zamanlarda pekçok ortam denenmiştir. Ancak bu ortamlardan çoğu termofiliklerin gelişimi için gerekli olan yüksek sıcaklıklarda kurumaktadır. Funguslar için sıklıkla kullanılan potato dekstroza agar’da yüzeyinin kuruması ile büzüşmektedir ve kullanışsız bir hal almaktadır. Dört standart ortam (Yeast starch agar, yeast-glukoz agar, oatmeal agar, czapek agar) termofilikler için oldukça kullanışlıdır ve bunlardan en çok kullanılanları Yeast starch agar (YpSs) ve yeast-glukoz agar (YG) dir (Cooney ve Emerson, 1964).

Kullanılan besi ortamında gelişen fungus, doğrudan ve mikroskop altında incelenerek doğrulanmalıdır. Makroskobik olarak; koloni çapı, rengi, tekstürü, arka yüzey rengi, çözünür pigment ve eksuda içerip içermediği gibi özellikler temel olarak değerlendirilen özellikler arasındadır. Bu aşamada miselleri, üreme yapıları ve sporilasyon tipi konidyofor yapısı, dallanma ve konidyojen karakterleri ve son olarak tüm yapıların boyutları ve yüzey tekstürleri gibi yapısal özellikleri hazırlanan preparatta mikroskobik olarak incelenen ayırt edici özelliklerdendir. Mikroskobik inceleme için hazırlanan preparat pamuk mavisi veya anilin mavisi gibi boya içeren laktik asit çözeltisi olabileceği gibi boyasız laktik asit çözeltisi kullanımı da bazı yapıların aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Preparat hazırlığı esnasında özellikle *Aspergillus* ve *Penicillium* gibi bol sporlu cinslerin hazırlanmasında, alkol kullanımı, konidiaların hidrofobik özellikte olmalarına dayalı olarak temiz bir mikroskobik görüntü sağlamaktadır (Samson ve ark., 2010; Klick, 2002).

Fungusların tanılanmasında morfolojik tanılama tek başına yeterli olmamaktadır. Hem tanılama hem de filogenetik çalışmalar için moleküler tekniklerden faydalanılmaya başlanmıştır. Morfolojik ve moleküler tanılama yöntemlerinin her ikisinde de tek spordan oluşmuş kültürler daha başarılı sonuçlar vermektedir. Ayrıca tek spor izolasyonundan sonra elde edilen kültürlerden yapılan çalışmalarda tekrar edilebilirlik daha kolay sağlanmaktadır. Bu da hem moleküler çalışmalarda hem de yeni metabolitlerin keşfinde oldukça önem taşımaktadır (Choi ve ark. 1999).

1.1.1.2. Moleküler Tanılama

Fungal sistematige geleneksel morfolojik yaklaşımlar temel oluşturmalarının yanında genellikle tür seviyesinde sıklıkla yanlışlıklar yapılmaktadır. Bunun başlıca nedenleri morfolojik karakterlere dayalı tanılama sisteminde tanılamayı sağlayan pek çok ögenin kişiden kişiye değişebilecek göreceli kavramlar olmasıdır. Bu şekilde bir ayrımı genus ve daha üst taksonomik seviyelerde yapmak mümkün olsa bile tür düzeyinde tanılamada büyük zorluklar yaşanmakta ve yapılan tanılamamanın doğruluğu konusunda şüpheler kalmaktadır. Bu nedenle son yıllarda moleküler araçların kullanımı kolay, ucuz, kullanışlı ve kesin sonuçlar verdiği için daha çok tercih edilmektedirler (Geiser, 2004).

Özgüllük ve duyarlılığından dolayı, PCR temelli yöntemler fungusların teşhisi için kullanışlı olmakta ve fungal suşların, türlerin ya da daha üst takson gruplarının belirlenmesi amacıyla kullanılabilmektedir. PCR aracılığıyla elde edilen bilgiler sayesinde mevcut taksonlar için spesifik oligonükleotid primerlerin tasarlanması mümkün hale gelmiştir. Protein sentezinin oldukça eski ve tüm organizmalarda ortak bir özellik olmasından dolayı organizmalar arasındaki evrimsel ilişkiyi ayırt edebilmek için rRNA'lar üstün moleküllerdir. rRNA eski, fonksiyonel olarak sabit, evrensel olarak yayılış gösteren (yaygın) ve filogenetik farkı, ölçülü bir şekilde koruyabilen bir moleküldür. Ayrıca rRNA gibi büyük bir moleküldeki olasılıkların sayısı oldukça fazladır ve iki dizi arasındaki benzerlikler filogenetik bir ilişkiyi işaret etmektedir. rRNA dizi analizlerinin sonuçları ve moleküler genetik çalışmalar organizmalar arasındaki doğru evrimsel ilişkileri yansıtacak şekilde filogenetik ağaçların elde edilmesini sağlamıştır (Bruns ve ark., 1991; Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008; Samson ve ark., 2010).

Funguslarda çekirdek rDNA (rRNA gen kümesi) ardışık tekrarlanan rDNA birimleri olarak organize olmuştur rRNA gen kümesi hem çekirdek hem de mitokondrilerde bulunur ve oldukça korunmuş ve değişken bölgelerden meydana gelir. Fungal çekirdek rRNA genleri her genomda birkaç yüz kopyası olan, ardışık tekrarlanan yapılar olarak düzenlenmiştir. Her bir birimde üç rRNA geni bulunmaktadır: küçük rRNA geni (18S vb.), 5.8S rRNA geni ve büyük rRNA geni (28S vb.). Gen kümesinin sonunda yer alan 5S rRNA geni ise fungal taksona bağlı olarak tekrarlayan birim içinde olabilir veya olmayabilir. 5.8S rRNA geni ise funguslarda mitokondriyal genomda bulunmaz. Korunmuş diziler büyük alt birim (LSU) ve küçük alt birim (SSU) genlerinde bulunur. Kodlanmayan iki değişken bölgeden meydana gelen ITS bölgesi, oldukça korunmuş küçük alt birim (SSU) ile 5.8S alt birimi arasında (ITS1 bölgesi) ve de büyük alt birim (LSU) rRNA genleri ile 5.8S alt birimi arasındaki bölgede (ITS2) yer almaktadır. ITS bölgesi 4 temel nedenle funguslarda moleküler karakterizasyon çalışmaları için özellikle kullanışlıdır:

1. ITS bölgesi nispeten küçüktür (500-800 bp) ve evrensel tek bir primer çifti (rRNA alt birimleri içindeki korunmuş bölgelerin komplementeri) kullanılarak PCR ile kolaylıkla çoğaltılabilir.

2. rDNA birimlerinin çok sayıda tekrarlarının olması nedeniyle, seyreltik ya da oldukça degrade olmuş DNA örneklerinden bile ITS bölgesi kolaylıkla çoğaltılabilir.

3. Morfolojik açıdan farklı türler arasında ITS bölgesi yeterince değişken olabilir ve bundan dolayı ITS-RFLP restriksiyon verileri genetik uzaklığı tahmin etmek için kullanılabilir böylece filogenetik ve sistematik analizler için karakterler sağlayabilir.

4. ITS türe özgü problemleri, bir kromozomal kütüphane oluşturmaya gerek kalmaksızın hızlı bir şekilde PCR ile üretilebilir.

Birçok araştırmacı dizilerin tekrarlayan birimler şeklinde olması ve türler arasında değişken, tür içinde benzer olma eğiliminde olmasından dolayı, türe özgü problemleri geliştirmek için dizileri ITS bölgesinden seçmektedir (Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008).

Yapılan bazı çalışmalarda termofilik fungusların ITS nükleotid dizi analizlerine dayalı tanılamaları gerçekleştirilmiştir (Lyons ve ark., 2000, İfrij ve Ögel, 2002). Son yıllarda yalnızca ITS bölgelerine dayalı olarak yapılan taksonomik çalışmalar yetersiz bulunmuş ve intronca zengin proteinleri kodlayan genlerin dizilenmesi tür düzeyinde tanılamamanın gerçekleştirilmesinde oldukça ön plana çıkmıştır. Ayrıca tür seviyesinde tanılamaya ulaşmada sadece ITS bölgelerinin yetersiz kaldığı durumlarda polifazik taksonominin oldukça başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Protein kodlayan gen olarak β -tübülin (benA) 3-6 ekson aralığı üç cins için (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*) uygun bulunmaktadır. *Aspergillus* ve teleomorfları için ilaveten kullanılan diğer bölgeler ise kalmodulin ve aktin dir (Houbraken ve ark., 2008, Hong ve ark., 2005). Ayrıca 26-28S (LSU) bölgesinin yüksek değişken kısmi sekanslarını içeren D1/D2 bölgesi termofilik ve termotolerant pek çok türün tanılanmasında kullanılmaktadır (Sharma ve ark., 2008).

1.1.2. Fungusların Yayılışı ve Sıcaklık Gereksinimleri

Kutuplardan ekvatora kadar, okyanusların derinliklerinden (4619 m) atmosferin üst tabakalarına (4950 m) kadar her ortamda funguslar bulunabilmektedirler. Bununla birlikte fungusların yayılışına, hangi tip ekolojik ortamda hangi türlerin faaliyet göstereceği konusunda etkin olan faktörler

bulunmaktadır. Bu faktörler iklim, bitki örtüsü, konaklar, toprak ve organik madde, mineral maddeler, vitaminler, pH, hava ve ışık olarak sayılabilmektedir. Özellikle iklimin diğer faktörleri de etkilediği düşünülürse fungusların yayılışında en önemli faktörün iklim olduğu ortaya çıkmaktadır. İklim özelliğini kazandıran sıcaklık, yağış, bağıl nem gibi faktörler funguslar için oldukça önemlidir (Kaşık, 2010).

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 arttığı bilinmektedir. Yüksek sıcaklıklar enzimlerin inaktive olmasına ve hayati faaliyetlerin durmasına yol açmaktadır (Kaşık, 2010).

Fungusların çoğunun sıcaklık istekleri 20-40 °C arasında değişmektedir. Bundan dolayı fungusların çoğu mezofilik karakterdedir. Mezofilik fungusların optimum gelişme sıcaklığı 25-30 °C arasındadır. 0-20 °C arasında gelişme gösteren fungusların az bir türü de psikrofilik olarak bilinmektedir. Buna karşın bazı funguslar ise termofilik özellik gösterirler (Kaşık, 2010). Termofilik funguslar minimum ve maksimum büyüme sıcaklıkları baz alınarak ayrımı yapılan termofilik ve termotolerant formları kapsamaktadır. Termofilik funguslar minimum 20 °C ya da üzeri ve maksimum 61,5 °C büyüme sıcaklığına sahiptirler. Termotolerant formların ise 20 °C 'nin altından yaklaşık 55 °C'ye kadar olan geniş bir büyüme sıcaklık aralığı vardır (Cooney ve Emerson, 1964; Maheshwari ve ark., 2000; Mouchacca, 2007).

1.1.3. Termofilik Funguslar

Ekstremofilik mikroorganizmalar; volkanların yüksek sıcaklıklarında, kutupların düşük sıcaklıklarında, çok düşük ve çok yüksek pH değerlerinde (pH 0-3 veya pH 10-12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-30) yaşamak için adapte olmuşlardır (Niehaus ve ark., 1999). Bu şekilde farklı ekolojik koşullarda yaşayan mikroorganizmalar termofilik, asidofilik, alkalifilik ve halofilik şeklinde sınıflandırılmıştır (Zeikus, 1979). Bu ekstremofilik mikroorganizma gruplarından bir tanesi de termofilik funguslardır. Ökaryotik organizmalar arasında yaklaşık olarak 50.000 den fazla tür kaydı bulunan

funguslardan yalnızca az sayıdaki fungus türü 40-45°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayabilme özelliğine sahiptir (Maheshwari ve ark., 2000). Sıcaklığa toleranslı olan bu funguslardan 30 tane tür termofilikler olarak ayrılmaktadırlar (Mouchacca, 2000).

Termofilik fungusların sınıflandırılması ve isimlendirilmesi zor ve karmaşıktır. İlk sınıflandırmalarda, İngilizce dışındaki dillerde yazılışları, tür adında karışıklıklara neden olmuştur. Bu nedenle fungusların bazı türleri birden fazla adla açıklanmış ve yeni sınıflandırma yapıldığında aynı fungus farklı adlar ile tanımlanmıştır. Örneğin, *Thermomyces lanuginosus*, *Humicola lanuginosa* gibi bir isimle de adlandırılmaktadır. Fungusların eşeyli ve eşeysiz evrelerine göre farklı isimler almaları da karışıklığa neden olmaktadır. Örneğin, *Sporotrichum* (*Chrysosporium*) *thermophile* eşeysiz evredeki adı, *Myceliophthora thermophile* ise eşeyli evredeki ismidir. Termofilik fungusların tanımlanmasının zorluğu termofilik ve termotolerans ayırımı ile daha da karmaşıklaşmıştır. Termofilik olarak tanımlanmış *Achaetomium thermophilum*, *Sordaria thermophila*, *Gilmaniella thermophila* türleri günümüzde termotolerant olarak bilinmektedir (Maheshwari ve ark., 2000). Termofilik funguslar güncel ve synonym isimleriyle Tablo 1.1'de verilmiştir.

Termofilik funguslar, Phycomycetes, Ascomycetes, Fungi imperfecti ve Mycellia sterilia'yı kapsayan çeşitli genustan oluşan fizyolojik olarak heterojen bir grubu oluşturmaktadırlar (Maheshwari ve ark., 2000).

Termofilik funguslar toprakta, sıcak sularda, ölü bitki parçalarının yığınları üzerinde, tarım ve orman ürünlerinin yığınlarında ve diğer tüm sıcak, nemli ve aerobik bir çevrede bulunan organik materyaller üzerinde yaşayabilmektedirler (Rajasekaran ve Maheshwari, 1993, Maheshwari ve ark., 2000). Yapılan çalışmalarda termofilik funguslar, jeotermal topraklardan (Redman ve ark., 1999), enfiyeden (Tansey, 1974), organik gübrelerden (Sarma ve ark., 2008; Hashimoto ve ark., 1972; Anastasi ve ark., 2005), tarım arazilerinden (Haliki, 1992) ve mantar kompostundan (Straatsma ve ark., 1994; Arifoğlu ve Ögel, 2000) izole edilmiştir. Aslında bu tür funguslar çevremizde çok yaygındır. Isısı 40-50° C olan sıcak sulardan, topraktan, sıcak havuzlardan, yağmur ormanlarının etrafından, çamurdan, ağaç yapraklarından, topraktan hem mezofilik hem de termofilik funguslar bir arada izole edilmiştir. Termofilik funguslar bu ortamlarda gelişebilmelerini, çoğunlukla selüloz ve ksilan içeren ortamın polisakkarit

bileşenlerini parçalayabilen termostabil polisakkarit-parçalayıcı enzimleri ile sağlamaktadırlar. (Maheshwari ve ark., 2000).

Araştırmalar termofilik fungus sporlarının çimlenmek için yüksek sıcaklığa gereksinim duyduklarını ancak yüksek sıcaklık gereksiniminin büyümeyi sürdürmek için kritik olmadığını göstermiştir. Termofilik fungusların bazı türleri mezofilik sıcaklıklarda gelişme özelliğine sahiptir. Buna karşılık, yüksek minimal sıcaklıkta gelişmelerinin asıl sebebi alışılmışın dışında membran akışkanlığına sahip olmamalarıdır. Crisan (1973) tarafında termofilik mantarların termofilik özelliklerini açıklayan bazı hipotezler öne sürülmüştür. Buna göre, mikro-organizmadaki yağ asitlerinin tipleri, üreme ısılarını belirlemektedir. Yüksek ısılarda hücresel yağların erimesi gerçekleşmekte ve hücrenin bütünlüğü kaybolmaktadır.

Çoğunlukla doymuş yağ asitleri içeren birçok hücrede üreme ısılarının yüksek olduğu görülmektedir. Termofilik mikroorganizmalar daha çok doymuş yağları içerdikleri için, yüksek ısılarda hücresel bütünlüklerini mezofiliklere göre daha iyi korumaktadırlar ve üreyebilmektedirler. Hücrelerdeki yağların en önemli kısmı hücre zarındaki fosfolipitlerdir. Yağ asitlerinin saturasyonundaki değişiklik hücre metabolizmasını etkilemektedir. Yüksek ısılarda hücre zarındaki sıvı miktarının düşmesine bağlı olarak geçirgenlik değişmektedir. Bu yönden bakıldığında, önerilen lipid çözünürlük hipotezi kabul edilebilir görülmektedir (Crisan, 1973).

Mezofilik ve termofilik mantarların hiflerinde ultrastrüktürel düzeyde yapısal farklılıklar ortaya konulmuştur. Termofiliklerin hepsinde olmasa da, bazılarında sitoplazmik zara bağlı yağ dolu cisimcikler görülmüştür. Bu yağ cisimciklerinin henüz tam anlaşılmamakla birlikte, termofili mekanizması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. İkinci bir hipotez de, temel metabolitlerin tekrar tekrar hızlı sentezi hipotezi olup termofillerin bilinen metabolik yollar dışında bir mekanizmaya sahip olmadıkları gerçeği ile örtüşmektedir (Crisan, 1973).

Termofilik bakterilerde de olduğu gibi, ribosomal düzenlemenin ve/veya konformasyonel değişikliklerin sebep olduğu bir veya iki adet hayati enzimin katalitik aktivitesini kaybetmesi minimal büyüme sıcaklığının önemli bir belirleyicisidir. Bunun yanısıra *Thermoascus aurantiacus* üzerinde yapılan bir çalışma 21 °C'de 24 saat bekletilen kültürün tekrar optimum sıcaklığına getirildiğinde gelişim göstermediğini ortaya koymuştur. Bu konu ile ilgili yeterli

bilgi elde edilene kadar termofilik fungusların miseliyal kültürlerinin canlılığını kaybetmeden buzdolabında veya subminimal sıcaklıklarda saklanabileceği düşünülmemelidir (Maheshwari ve ark., 2000).

Termofilik funguslar biyolojik dönüşüm prosesinde görev almaktadırlar ve endüstriyel olarak önemli pek çok metaboliti sentezleme yeteneğine sahiptirler. Bunlardan bir tanesi de termostabilite özelliğine sahip enzimleri dir (Mouchacca, 2007).

1.2. Enzimler

Enzimler canlı hücrede meydana gelen kimyasal tepkimeleri katalizleyen veya düzenleyen biyokatalizörlerdir. Organizmadaki organik moleküllerin yapımı, yıkımı, kas hareketleri ve solunum gibi fizyolojik olaylar enzimler yardımıyla yürütülmektedir. Bu sebeple hayat enzimatik tepkimelerin tümüdür denilebilir (Telefoncu, 1986).

Enzimler dört temel açıdan çok güçlü katalizörlerdir:

1. Enzimler son derece etkilidirler. Sıradan kimyasal katalizörlere göre tepkimeleri 108–1011 kez daha hızlı gerçekleştirebilmektedirler. Enzimler gösterdikleri bu hıza ulaşırken pH, sıcaklık, basınç açısından oldukça ılımlı koşullarda çalışabilmeyi mümkün kılarlar. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonlar fazla enerji gerektirmezler. Ayrıca en kolay bulunan, en ucuz, en emniyetli çözücü olan su içerisinde çalışmak enzimler için mümkün olmaktadır. Mesela amonyak elde etmek için kullanılan haber prosesinde azot bağlamak için 200-1000 atm basınç ve 500 °C sıcaklık gereklidir. Ama azot bağlayan bir bakterinin bu işlemi yaparken yüksek basınç ve sıcaklığa ihtiyacı yoktur.

2. Enzimler kimyasal katalizörlere göre çok daha değişik kimyasal reaksiyonları katalizleyebilirler.

3. Enzimler reaksiyonun tipine ve substrata son derece spesifiktirler. Böylece yüksek verim ve çok az sayıda yan ürün meydana gelir.

4. Enzimlerin çok çeşitli doğal kontrol mekanizmaları vardır. Enzimlerin aktivitesi, içinde bulundukları şartlara göre düzenlenebilir. Ayrıca kontrol edici küçük moleküller de enzimatik aktiviteyi azaltabilir ya da arttırabilir. Enzimler tepkimenin başlaması için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürürler. Bir enzim daima bir çeşit tepkimeyi kontrol eder. Hücre içinde üretilmelerine rağmen hücre

Tablo 1.1. Termofilik Fungusların Taksonomik Özellikleri ve Sıcaklık Gereksinimleri
(Maheshwari ve ark., 2000)

Fungus (Güncel Sınıflandırma)	Diğer isimleri	$t_{opt}^{\circ}\text{C}$	$T_{max}^{\circ}\text{C}$
<i>Canariomyces thermophila</i> Guarro & Samson		5	
<i>Chaetomium mesopotamicum</i> Abdullah & Zora		5	52
<i>Chaetomium thermophile</i> La Touche	<i>C. thermophilum</i> , <i>C. thermophilum</i>	45-55	58-61
<i>Coonemeria aegyptiaca</i> (Ueda & Udagawa) Mouchacca	<i>Thermoascus aegyptiacus</i> , <i>Paecilomyces aegyptiaca</i>	40	55
<i>Coonemeria crustacea</i> (Apinis & Chesters) Mouchacca	<i>Thermoascus crustaceus</i> , <i>Dactylomyces crustaceus</i> , <i>Paecilomyces crustaceus</i>	40	<60
<i>Coonemeria verrucosa</i> (Yaguchi, Someya et Udagawa) Mouchacca	<i>Thermoascus crustaceus</i>	30-40	55
<i>Corynascus thermophilus</i> (Fergus & Sinden) van Klopotek	<i>Thielavia thermophila</i> , <i>Myceliophthora fergusii</i> , <i>Chrysosporium fergusii</i>	50	60
<i>Dactylomyces thermophilus</i> Sopp	<i>Thermoascus thermophilus</i> , <i>Thermoascus aurantiacus</i>	40-45	
<i>Malbranchea cinnamomea</i> (Libert) van Oorschot & de Hoog	<i>Trichothecium cinnamomeum</i> , <i>Thermoidium sulfureum</i> , <i>Malbranchea pulchella</i> var. <i>sulfurea</i>	45	57
<i>Melanocarpus albomyces</i> (Cooney & Emerson) von Arx	<i>Myriococcum albomyces</i> , <i>Thielavia albomyces</i>	45	57
<i>Melanocarpus thermophilus</i> (Abdullah & Al-Bader) Guarro, Abdullah & Al-Bader	<i>Thielavia minuta</i> var. <i>thermophila</i>	35	50
<i>Myceliophthora hinnulea</i> Awao & Udagawa		40-45	>50
<i>Myceliophthora thermophila</i> (Apinis) van Oorschot	<i>Sporotrichum thermophilum/thermophile</i> , <i>Chrysosporium thermophilum</i> , <i>Myceliophthora indica</i> , <i>Corynascus heterothallicus</i>	45-50	55
<i>Myriococcum thermophilum</i> (Fergus) van der Aa		45	53
<i>Paecilomyces varioti</i> Bainier		50	55
<i>Rhizomucor miehei</i> (Cooney & Emerson) Schipper	<i>Mucor miehei</i>	35-45	57
<i>Rhizomucor pusillus</i> (Lindt) Schipper	<i>Mucor pusillus</i>	35-45	55
<i>Scytalidium thermophilum</i> (Cooney & Emerson) Austwick	<i>Torula thermophila</i> , <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> , <i>Humicola insolens</i>	40	58
<i>Stilbella thermophila</i> Fergus		35-50	55
<i>Talaromyces byssochlamydioides</i> Stolk & Samson	<i>Paecilomyces byssochlamydioides</i>	40-45	>50
<i>Talaromyces emersonii</i>	<i>Geosmithia emersonii</i> ; <i>Talaromyces duponti</i> , <i>Penicillium duponti</i>	40-45	55
<i>Talaromyces thermophilus</i>	<i>Penicillium duponti</i>	45-50	60
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	<i>Thermoascus aurantiacus</i> sensu Cooney & Emerson	49-52	61
<i>Thermomyces ibadanensis</i> Apinis & Eggins		42-47	61
<i>Thermomyces lanuginosus</i> Tsiklinskaya	<i>Humicola lanuginosa</i>	45-50	60
<i>Thermomyces stellatus</i> (Bunce) Apinis	<i>Humicola stellata</i>	40	50
<i>Thielavia australiensis</i> Tansey & Jack		35-40	50
<i>Thielavia pingtungia</i> Chen K.-Y. & Chen Z.-C.		40	>50
<i>Thielavia terrestris</i> (Apinis) Malloch & Cain	<i>Allescheria terrestris</i> , <i>Acremonium alabamensis</i>	40-45	52

dışında da etki gösterebilirler. Enzimlerin kontrol ettiği tepkimelerin çoğu çift yönlüdür. Genellikle protein yapılı olmalarından dolayı proteinlerin etkilendiği faktörlerden etkilenirler (Telefoncu, 1986).

Enzim aktivitesini etkileyen faktörler olarak ortam pH'sı, sıcaklık, substrat derişimi, zaman, çeşitli iyonların derişimleri (aktivatörler), ışık gibi faktörler sırlanabilir (Gözükara, 1997).

1.2.2. Enzimlerin Yapısı

Enzimlerde proteini oluşturan aminoasitlerin sayısı, diziliş sırası ve moleküllerin yapısı belirli bir düzen içindedir. Bu düzen enzimin substrata seçiciliğini sağlar. Bazı enzimler yalnızca proteinden oluşurken bazıları protein yanında protein olmayan bir kısım içerirler. Bu tip enzimlerde enzimin protein kısmına “Apoenzim”, denir. Koenzim ya da kofaktör enzime kovalent bağlıysa “Prostetik grup“ adı verilir. Koenzimler genellikle vitamin türevleri ve organik moleküllerden oluşur. Apoenzim ve koenzim birlikte “Holoenzim“ diye adlandırılır. Holoenzimin büyük bir kısmını apoenzim oluşturur. Apoenzim tek başına katalitik aktivite göstermez. Enzimin gerçek aktivitesi sadece koenzim ve apoenzim bir arada olduğunda gözlenir. Enzim molekülünün belirli bir bölgesinde belirli aminoasitlerin oluşturduğu bir kısım bulunur. Protein zincirinin bu bölgesi enzimin katalitik etkisinden sorumlu olup “Aktif bölge“ olarak tanımlanır. Substrat ve eğer varsa koenzim, bu merkeze hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar veya kovalent bağlar ile bağlanır. Substratın dönüşümüne katılan ve katalitik prosesi yürüten aminoasit yan zincirleri de aktif merkezi oluştururlar (Telefoncu, 1986).

1.2.3. Enzimlerin Çalışma Mekanizması

Enzimin hangi substratla çalışılacağını saptayan kısmı apoenzim kısmıdır. Apoenzim kısmıyla substrat arasında bir ilişki bulunmaktadır. Alman kimyacı Emil Fischer tarafından bunun kilit anahtar uyumu gibi olacağı savunulmuştur. Koenzim kısmı daha çok kimyasal bağa yakın olarak işlev gösterir, örneğin ester bağlarını parçalamaktadır. Enzimin apoenzim kısmı bir ya da birkaç yerinden

(aktif bölgelerden) substrat molekülüne yapışmakta ya da bağlanmakta (yani bir enzim-substrat kompleksi oluşturuyor) ve bu arada koenzim kısmı substrat üzerindeki bağlarla gerçek anlamda birleşmeye veya bağlanmaya giderek onu parçalamaktadır (Yavuz, 2005). İkinci bir model ise indüklenmiş uyum hipotezidir. Bu hipotezde ise enzim substratı olmadığı zaman serbest olarak bulunmaktadır. Ancak substratı ile buluşacak olursa enzim özel yapısını almakta ve substrat aktif bölgeye bağlanmaktadır (Shuler ve Karşı, 2002). 1913 yılında Michaelis-Menten enzim substrat ilişkisini incelemiş ve bugün kendi adı ile anılan eşitliği türetmiştir.

1.2.4. Enzimlerin Katalitik Özellikleri

Enzimler biyolojik reaksiyonları katalize ettikleri için biyokatalizörler sınıfına girmektedirler. Doğal enzimler molekül büyüklükleri bakımından genellikle kolloidal tanecikler sınıfına girmektedirler. Bu nedenle kimyasal kataliz yönünden enzimler mikro heterojen katalizörler olarak adlandırılabilirler. Bir enzim yüzlerce farklı atomlardan yapılmış bir kimyasal bileşiği etkilerken bu molekülün belirli bir bölgesini seçerek buradan bir veya iki atomu veya fonksiyonel bir grubu molekülün ana yapısını bozmadan koparmakta veya ilave etmektedir. Başka bir kimyasal bileşik substrat yapısına çok benzese ve bazı grupların yerleri hafifçe değişik olsa bile enzim bu iki maddeyi birbirinden ayırt edebilmektedir (Gözükara, 1997).

Enzimlerin katalitik aktiviteleri katalize ettikleri reaksiyon hızını tayin ederek saptanmaktadır. Enzim aktivitesi turnover sayısı ile belirlenmektedir. Turnover sayısı 1 mol aktif enzim tarafından 1 dakikada ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı olarak tanımlanmaktadır. Enzim örneklerinin spesifik aktivitelerini tanımlamak için turnover sayısı yerine “enzim birimi” veya “ünitesi” de kullanılmaktadır. Enzim birimi (U) dakikada 1 mikromol substrat dönüşümünü katalizleyen miligram enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır (Bailey ve Ollis, 1977).

1.2.5. Enzim Kaynakları

Endüstride kullanılan enzimler genellikle mikroorganizma kaynaklı olmalarının yanı sıra bitkisel ve hayvansal kaynaklı da olabilmektedir. Endüstriyel alanda kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman, 1987).

Hayvansal kaynaklı enzimler genellikle tavuk yumurtalarının beyazı, domuz midesi, pankreas, geviş getirenlerin karın bölgesi gibi yenilebilen organlardan izole edilebildiği için insan yiyeceklerinin hazırlanmasında da uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Bitkisel kaynaklardan elde edilen biyoteknolojik enzimler, yenilebilir bitkilerden elde edilebilmektedir. Toksik olmayan bu yiyeceklerin kaynaklarının güvenilirliği doğrulanmıştır. Mikrobiyal enzimler ise özel mikroorganizmalar tarafından üretilmektedirler. Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, ayrıca mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de belirlenmişlerdir. Mikrobiyal enzimler bakteriler, mayalar ve mikrofunguslar kullanılarak üretilmektedirler (John, 1987).

1.2.6. Termotabil Fungal Enzimler

1990’larda moleküler biyolojik tekniklerin kullanılması ve gelişmesi ile genetik analizlerin önünün açılması, rekombinant üretimin başlaması çarpıcı şekilde termotabil enzim alanındaki çalışmaların artmasına sebep olmuştur. Bu durum aynı zamanda termal çevrelerden birçok mikroorganizmanın izole edilmesini teşvik etmiştir. Çünkü bu mikroorganizmalar sayesinde elde edilecek enzimlerle, enzimatik biyoproses işlemlerinde belirgin bir artış sağlanabileceği düşünülmektedir. Termotabil enzimlerin başarılı şekilde ticarileştirilerek, analitik olarak kullanımına ilk örneklerinden birisi DNA amplifikasyonlarında kullanılan Taq-polimeraz’dır. Bu endüstriyel enzimlerin kullanımıyla ilgilenen diğer bir alan ise teknik ürünler veya proseslerin sıklıkla büyük çaplı üretimleridir. Endüstriyel kataliz reaksiyonlarında enzimlerin kullanımı işlevsellik için toksik metal iyonlarının kullanımını gerektirmemesinden dolayı daha avantajlıdır. Ayrıca

daha çevreci bir proses kullanımını sağlamaktadır. Termostabil enzimler endüstriyel proseslerin sıklıkla kısmen siddetli koşullarına karşı koyabilen güçlü bir katalizör alternatifi sunmaktadırlar (Turner ve ark., 2007).

Günümüz dünyasında, çeşitli biyorafinerilerde uygulanan proseslerin bir çoğu yüksek sıcaklıklarda stabil olabilen enzimleri içermektedir. Endüstriyel uygulamalarda termofiller ve termostabil enzimler oldukça önemlidir. Bu termostabil enzimler çoğunlukla mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bir enzim veya proteinin termostabil olarak tanımlanması için seçilen yüksek sıcaklıkta ($> 55\text{ }^{\circ}\text{C}$) uzun bir yarı ömre sahip olması gerekmektedir. Termofilik organizmaların extrasellüler enzimleri genellikle yüksek termosabilite göstermektedir. Termostabil enzimlerin biyoproseslerde seçilmesinin sebepleri organik solventlere yüksek tolerans, oda koşullarında uzun süre saklama, düşük kontaminasyon riski ve tabiki ham maddelerin ön işlemleri sırasında uygulanan yüksek sıcaklıklara karşı düşük aktivite kayıplarını sağlayan termostabilite dir. Ayrıca termostabilite kolay karışma, yüksek substrat çözünürlüğü, yüksek kütle transfer oranı gibi özellikleri de yanında getirmektedir (Turner ve ark., 2007).

Fitik asidin defosforilasyonunu sağlayan fitazlar, son yıllarda özellikle beslenme, çevreyi koruma ve insan sağlığı açısından ön plana çıkmıştır. Yüksek sıcaklıklara dayanıklı termostabil fitazlara yem üretimi, gıda işleme, kağıt yapımı ve bunlar gibi bir çok endüstriyel prosesde gereksinim olduğu belirtilmiştir (Lei ve ark., 2006; Turner ve ark., 2007).

1.3. Fitaz Enzimi

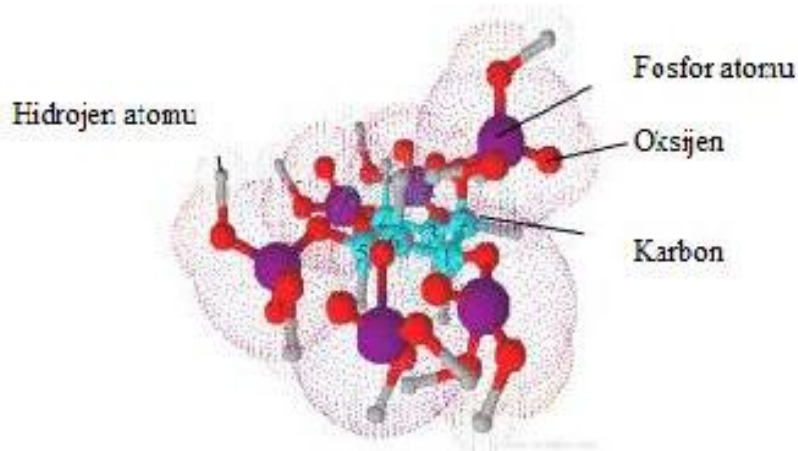
Fosfatazlar, birçok organo-fosfat bileşiklerindeki monofosfoester bağlarının parçalanmasını katalizleyen enzimlerdendir. Ancak bu enzimler fitik asit içindeki monofosfoester bağlarını hidrolize edemez. Fitik asidin (myo-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakis-dihidrojen fosfat) hidrolizi oldukça önemli olduğu için, fitik asidi hidrolizleyen enzim sınıfına fitazlar denmiştir. Son 20 yıldır fitazlar, beslenme, çevrenin korunması ve insan sağlığı açısından önemli enzimlerden birisi haline gelmiştir. Fitaz (myo-inositol hexakisfosfat fosfohidrolaz) myo-inositol hexakisfosfat'ın (fitik asit), inorganik mono fosfat ve düşük myo-inositol fosfatlar ve bazı durumlarda serbest myo-inositol'e hidrolizini katalizlemektedir.

Bu enzim kademeli olarak fitatın inositol merkezindeki ortofosfat gruplarını parçalamaktadır. (Sariyska ve ark., 2005; Polaina ve Maccabe, 2007).

Fitazlar, genellikle 40-100 kDa moleküler ağırlığa sahip olan monomerik protein olarak değerlendirilmektedir. Geniş substrat spesifikliği göstermekle birlikte, genellikle optimum pH ve sıcaklığı 4.5-6.0 ve 45-60 °C'dır. Fitazın kristal yapısı, 2.5 Å çözünürlükte tespit edilmiştir. Fitazın immobilizasyonu, thermostabilitesini arttırmak için bulunmuştur (Pandey ve ark, 2001).

1.3.1. Fitik Asit (Myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis dihidrojen fosfat)

Fitazın substratı olan fitik asitin (myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis dihidrojen fosfat, IP6) önemli bir miktarı tahıl ve baklagil tohumlarının olgunlaşması sırasında birikmekte olup (Sariyska ve ark., 2005) 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 (Feil, 2001). Bazı baklagil, tahıl ve meyvelerdeki fitik asit miktarları Tablo 1.2'de verilmiştir. Fitik asit; myo-inositol halkası ve buna bağlı inorganik fosfattan oluşan bir ester asidi olup tahıl, baklagil ve yağlı tohumlarda fosforun ana depo formudur (Şekil 1.1). Kimyasal formülü myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hekzadihidrojen fosfat'tır. Moleküler formülü, $C_6H_{18}O_{24}P_6$ ve moleküler ağırlığı 660.04 g mol⁻¹'dir (Kumar ve ark., 2010).



Şekil 1.1. Myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hekzafosfat 'Fitik Asit' (Bohn ve ark, 2008)

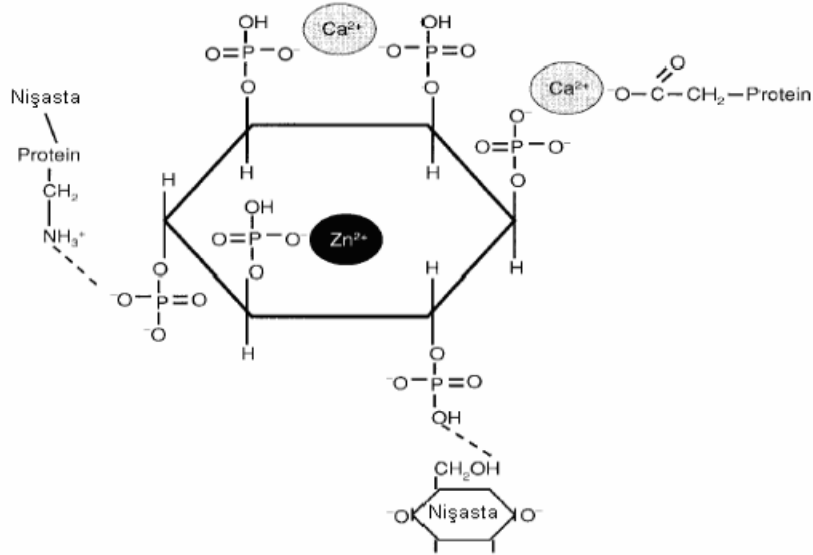
Fitik asit heksahidrik siklik alkol mezo-inositolün hekzafosforik esteridir. Fitik asitin tuzları fitat olarak tanımlanmaktadır. Fitat tohum çimlenmesi için fosfor ve enerji kaynağı olarak görev yapmasına rağmen, bağlı fosfor; insanlar, köpekler, domuzlar, kuşlar ve agastrik hayvanlarda barsak sindirim enzimi olan fitazın bulunmamasından dolayı çok az miktarda kullanılabilir (Kumar ve ark., 2010). Kanatlı, domuz ve balık rasyonlarında fitat fosforunun kullanılmamasından dolayı, bu canlıların yemlerine pahalı bir mineral olan fosfor ilave edilmektedir (Wodzinski ve Ullah, 1996). Bununla beraber bitkisel yemlerde bulunan ve kullanılmayan fitat fosforu gübre ile dışarı atılmaktadır. Bunun sonucunda yoğun hayvan yetiştiriciliği yapılan alanlarda çevresel kirlilik meydana gelmektedir. Topraktaki fazla fosfor göl ve denizlere taşınarak, ötrifikasyona sebep olmaktadır (Sariyska ve ark., 2005; Lei ve ark., 2006) ve akuatik organizmaların büyümesini uyarak insanlar için zararlı nörotoksinler üretilmektedir (Lei ve Porres, 2003).

Fitik asit merkez inositol halka yapısının etrafında altı fosfat grubundan ve geniş bir pH aralığında yüksek derecede negatif yüklü bir iyon dur. Oldukça negatif yüklü bir molekül olmasından dolayı divalent ve trivalent katyonlar (Ca^{+2} , Mg^{+2} , $\text{Fe}^{+2/+3}$, Zn^{+2} , Mn^{+2}) için çok yüksek afiniteye sahiptir. Ve bu pozitif yüklü iyonlarla şelat oluşturarak insanlar ve diğer monogastrik hayvanlarda ince bağırsakta metallerin emilimini azaltıp biyoyararlılığını negatif yönde etkilemektedir (Şekil 1.2) (Grenier ve ark., 2006; Chadha ve ark., 2004). Gelişmekte olan ülkelerde insanlardaki kalsiyum, demir ve çinko eksikliğinin yaygınlaşması, insan beslenmesinde kullanılan bitki kökenli temel gıdalar yoluyla alınan fitata dayandırılmaktadır (Manary ve ark, 2002).

Fitat; düşük ve yüksek pH değerlerinde non-spesifik fitat-protein kompleksleri oluşturmaktadır. Bu kompleks oluşumlar proteinlerin yapısını değiştirmekte ve sindirim enzimlerinin (α -amilaz, pepsin, tripsin gibi endojen proteazlar) proteinleri tanımasını engelleyerek proteinleri proteolitik sindirime karşı dirençli hale getirmektedir. Bu nedenle fitat içeren yemlerle beslenen monogastrik hayvanlarda düşük büyüme performansı görülmektedir. Fitat karbonhidratlarla da kompleks oluşturmaktadır ve bu kompleksler karbonhidratları daha az parçalanabilir hale getirmektedir (Kumar ve ark, 2010).

Ayrıca amilaz aktivitesi fitatın Ca^{+2} iyonu ile kompleks oluşturmasından dolayı inhibe olur ve bu da karbonhidrat parçalanmasını düşürücü etki yapmaktadır. Diğer taraftan diyabet hastaları tarafından tahıl ve baklagil içerikli diyetlerin uygulanması karbonhidratların glukoza dönüşümünün azalmasından dolayı düşük glisemik indekse sebep olmakta ve kan şekerinin kontrol altında tutulmasını kolaylaştırmaktadır. Fitat diğer besin maddelerinde olduğu gibi lipidler ile de kompleks oluşturmakta ve lipofitini meydana getirmektedir. Bu da bağırsaklarda metalik bir sabun oluşturarak ve lipidlerin yararlanabilirliğini azaltmaktadır (Kumar ve ark, 2010).

Fitik asitin negatif etkilerinin yanında antikanserojenik (kolon kanseri, göğüs kanseri, prostat kanseri, karaciğer kanseri, rabdomiyosarkom, pankreas kanseri, kan ve kemik iliği kanseri), antimutajenik, antioksidan, hipolipidemik, hipokolesterolemik, pıhtılaşmayı önleyici, diş çürümesini önleyici, böbrek taşı oluşumunu önleyici, kolesterolü düşürücü, Parkinson ve Alzheimer hastalığının tedavisinde, HIV, obezite, diyabet ve kalp rahatsızlıkları gibi hastalıkları önleyici etkileri olduğunun düşünülmesi nedeniyle besinlerdeki yüksek fitik asit içeriğinin göz önünde tutulması gereği ön plana çıkmaktadır (Vats ve Banerjee, 2004; Kumar ve ark, 2010).

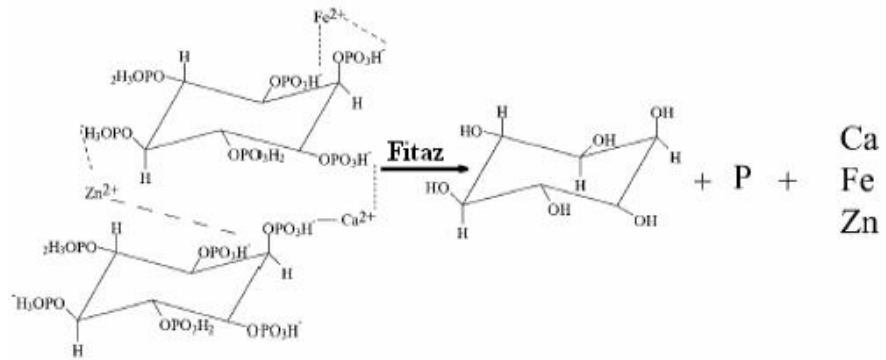


Şekil 1.2. Fitik Asit Şelatının Kimyasal Yapısı (Kornegay, 2001)

Tablo 1.2. Baklagil, tahıl ve meyvelerdeki fitik asit miktarları (Afinah ve ark., 2010)

Bitki türü	Yapısı	Fitik asit yüzdesi
Pirinç	Kepek	5,88
Susam	Kuru tohum	4,71
Bal kabağı	Embriyo	4,08
Ketentohumu	Kuru tohum	3,36
Kanola	Kuru tohum	2,50
Ayçiçeği	Embriyo	2,10
Hardal	Kuru tohum	2,00
Kaju	Embriyo	1,97
Kendir	Kuru meyve	1,74
Yerfıstığı	Kabuklu tohum	1,70
Domates	Tohum	1,66
Soyafasulyesi	Kuru tohum	1,55
Badem	Kuru embriyo	1,42
Patlıcan	Tohum	1,42
Fasulyeler	Kuru tohum	1,41
Antepfıstığı	Embriyo	1,38
Kavun	Tohum	1,36
Kivi	Taze meyve	1,34
Bakla	Kuru tohum	1,11
Salatalık	Çimlenmemiş tohum	1,07
Sorgum	Kuru tane	1,06
Kakao tanesi	Kuru tohum	1,04
Arpa	Kuru tane	1,02
Yulaf	Kuru tane	1,02
Buğday	Kuru tane	1,02
Bezelye	Kuru tohum	1,00

Fitin fosforunun değerlendirilebilmesi için fitik asit molekülünün hidrolize olması gerekmektedir. Fitin fosforunun hidrolizi; ıslatma, çimlendirme, bitkisel endojen fitaz enziminin zengin gıdaları kullanma, depolama, pişirme ve otoklavlama gibi yöntemlerle gerçekleştirilmektedir (Pekşen ve Artık, 2005). Ayrıca, taneli gıdaların dış kabuğun soyulması için öğütme işlemi yapılması ve fermantasyon işlemiyle maya ve laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan fitaz enzimi de yem ve yiyeceklerdeki fitat miktarını düşürmektedir (Midilli ve ark., 2003)



Şekil 1.3. Fitatın Fitaz Enzimi ile İnositol, Fosfat ve Diğer Elementlere Hidrolizi (Lei ve Porres, 2003)

1.3.2. Fitazların Kullanım Alanları

1.3.2.1. Yem Katkısı Olarak Kullanımı

Ruminantlar, rumenlerindeki mikrobial flora ile üretilen fitazlarla fitatı parçalarlar. Fitazların yardımıyla fitattan hidrolize olan inorganik fosfat hem mikroflora hem de ruminantlar tarafından kullanılmaktadır. Bu durum monogastrik hayvanlarda farklıdır. Domuz, balık, kümes hayvanları gibi monogastrikler, fitik asidi metabolize edemezler. Çünkü gastrointestinal fitazları yoktur. Dolayısıyla bunların fosfat ihtiyacını karşılamak için yemlerine inorganik fosfat eklenmektedir. Bu da maliyeti ve fosfat kirlilik problemlerini arttırmaktadır. Hayvan yemlerine fitaz eklenmesi fosfatın yem malzemesi içine geçmesini sağlamak ve gübredeki fosfat miktarını azaltmaktadır (Sariyska ve ark., 2005; Lei ve ark., 2006).

Fitaz enziminin çok çeşitli alanlarda kullanımı araştırılmıştır. Domuzların mısır ve buğday içeren yemlerine eklenen mikrobiyal fitazın P kullanılabilirliğini sırasıyla %38, %12 oranında arttırdığı (Dungelhof ve ark., 1994) ve gübreye geçen fosfat miktarını ise %60 oranında azalttığı bildirilmiştir (Nahm, 2002). Büyümekte olan domuzlarda yapılan bir çalışma mısır ve soya fasulyesi içerikli yemlere mikrobiyal fitaz eklenmesiyle Zn gereksiniminin 1/3 oranında düştüğünü göstermiştir (Revy ve ark., 2006). Broyler piliçlerinin beslenmelerinde de fitaz kullanımının aminoasit, Ca, Na, sialik asit ve fitat fosforunun çevreye salınımını belirgin şekilde azalttığı bildirilmiştir (Cowteson ve Acamovic, 2004). Su ürünlerinin üretiminde daha ucuz olduğu için bitki kaynaklı proteinler tercih edilmeye başlandığından beri sucul ortamlarda çevresel P kirliliği ön plana çıkmıştır. Balıkların basit midelerinden dolayı bu yemlerin defitinizasyonunun şart olduğu ve fitaz enziminin yetiştirilen balık türüne göre değişen pH ve sıcaklık değerlerine olan hassasiyeti ortaya konmuştur (Cao ve ark., 2007). Ticari olarak kullanılan 4 adet fitaz enzimi karşılaştırılmıştır ve hayvan yemi üretiminde karşılaşılabilecek ekstrem sıcaklık ve pH gibi koşullarda aktivitelerini büyük oranda kaybettikleri belirlenmiştir (Boyce ve Walsh, 2006). Çiftlik hayvanlarının yemlerinde *Aspergillus niger* fitazının başarılı bir şekilde kullanılabildiği rapor edilmiştir (Vats ve ark., 2009)

1.3.2.2. Gıdalarda Kullanımı

Fitaz enzimi yem katkısı olarak kullanılmasının yanı sıra gıda sanayinde de büyük potansiyele sahiptir. Tahıl, legüm ve soya proteinlerince zengin beslenme, fitat alınımlarında artışa neden olmaktadır. Vejeteryanlar, dengesiz ve yüksek oranda tahıl ile beslenenler, gelişmemiş ülkelerde mayasız ekmek tüketen insanlar ve soya kaynaklı mama tüketen bebekler fazla oranda fitat almaktadır (Simell ve ark., 1989). İnce bağırsakta parçalanmamış fitat Zn, Ca, Mg ve Fe absorpsiyonunu negatif olarak etkilemektedir. Ayrıca sindirim enzimlerini ve bazı proteinleri de inhibe eder. Tüm bu sebeplerle, gıda alanındaki çalışmalar, gıda işlemede teknik geliştirmenin yanı sıra bitki kökenli gıdaların besleyici değerinin artırılması üzerinde yoğunlaşmıştır. Ekmek yapım aşamalarında fitaz kullanımında başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Haros ve ark., 2001a). Haros ve arkadaşları (2001b) tarafından yapılan çalışmada, fungal fitazların tam buğday

ekmeğinin fermentasyonuna ve oluşan ekmeğin kalitesine olan etkilerine bakılmıştır. Fitazın ekmek yapımında oldukça olumlu etkileri olduğunu, ekmek yapım süresinin kısaldığını, ekmek miktarının arttığını, fitatın parçalanması ile besinsel bileşimin arttığını, fitazların endojen α -amilazı aktif hale getirmesi ile α -amilazıdan faydalanılmasını sağladığını ortaya koymuşlardır. Gıdaların işlenmesi sırasında fitaz ilavesi soya sütü gibi içeceklerin yapımında, tahıl kepeklerini parçalamada, bitkisel protein izolatlarının ve mısır ıslatma sıvısının hazırlanmasında kullanılmaktadır (Grenier ve Konietzny, 2006).

1.3.2.3. Myo-İnositol Fosfatların Hazırlanması

Transmembran sinyalizasyonunda ve intraselüler kaynaklardan kalsiyumun hareketini sağlamada büyük rol oynayan inositol fosfatlara ve fosfolipidlere olan ilginin artması, çeşitli inositol fosfatların hazırlanmasına yol açmıştır. Ayrıca myo-inositol fosfatların artrit ve 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 hekzafosfatın 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 (Siren, 1986).

1.3.2.4. Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrisi

Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde, bitki fitik asitinin uzaklaştırılması önemlidir. Termotabil fitaz, kağıt hamuru ve kağıt yapımı süresince fitik asiti parçalamada kullanılan yeni biyolojik ajandır. Fitik asitin enzimatik parçalanması ile mutajenik ve çok zehirli yan ürünler meydana gelmez. Bundan dolayı kağıt

hamuru ve kağıt yapımında fitazların kullanımı, temiz teknolojilerin gelişmesine yardımcı olmakla beraber çevreyi koruma açısından önem taşımaktadır (Liu ve ark., 1998).

1.3.2.5. Toprak İyileştirmede Kullanımı

Bazı topraklarda, fitik asit ve türevleri toplam organik fosforun %50'sini oluşturabilmektedir (Dalal, 1978). Mısır bitkisi için topraktaki fitik asitten fosforun kullanılabilmesinde fitazın etkisi araştırılmıştır. Araştırmacı, toprağa fitaz ilave edildiğinde fitinin parçalanma oranının artmasına bağlı olarak büyümeyi uyardığını bildirmiştir. Bu çalışma bitkilerin köklerinde fitaz geninin ekspresyonu ile transgenik bitkilerle topraktaki fosforun kullanılabileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır (Day, 1996).

1.3.3. Fitazların Sınıflandırılması

Fitatı parçalayan enzimler IUPAC-IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry) tarafından iki sınıfa ayrılmıştır: Fitatın D3 pozisyonundaki ortofosfatı uzaklaştıran 3-fitaz (myo-inositol-hekzakisfosfat 3-fosfohidrolaz, EC 3.1.3.8) ve myo-inositol halkasındaki L-6 (D-4) pozisyonundaki defosforilasyonu sağlayan 6-fitaz (myo-inositol-hekzakisfosfat 6-fosfohidrolaz, EC 3.1.3.26). Mikrobiyal fitazlar genellikle 3-fitaz sınıfında yer alırken bitkisel kökenli fitazlar 6-fitaz sınıfında yer almaktadır (Konietzny ve Greiner, 2002; Sariyska ve ark., 2005; Polaina ve Maccabe, 2007).

Fitaz enzimleri; optimum pH'larına göre alkali veya asit fitazlar, katalitik mekanizmalarına göre histidin asit fosfatazlar (HAF), β -pervane fitazlar (BPFhy), sistein fosfatazlar (SF) veya mor asit fosfatazlar (MAF) ve fitat hidrolizinin stereospesifitesine göre 3- veya 6- fitazlar olarak gruplandırılmaktadırlar (Polaina ve Maccabe, 2007).

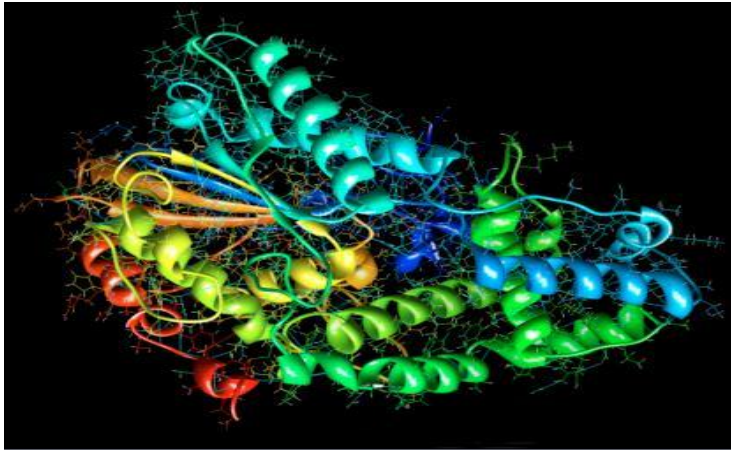
1.3.3.1. Histidin Asit Fosfatazlar (HAF)

HAF ların bütün üyeleri genel bir katalitik mekanizma ve genel bir aktif bölge motifi gösterirler. Bu tipteki fitazların aktif bölgeleri 3 boyutlu katlanmalar

sırasında amino asit dizisinin N ve C- uçlarının bir araya gelmesi ile oluşmaktadır. Bu uzak diziler bir araya gelerek tek bir katalitik merkez oluşturmakta ve bu da fosfomonoesterlerin iki adımda hidrolizlenmesi reaksiyonunu başlatmaktadır. Hem prokaryotic hemde ökaryotik histidin asit fitazlar (HAFhy) bilinmektedir. En çok bilinen prokaryotic HAFhy *Escherichia coli* fitazı, ökaryotik HAFhy ise *Aspergillus niger* ve *A.fumigatus* fitazlarıdır. Fungal fitazların doğru katlanmaları glikozilasyon ve disülfid bağları ile gerçekleşmektedir (Polaina ve Maccabe, 2007).

1.3.3.2. β -Pervane Fitazlar (BPFhy)

Bacillus amyloliquefaciens'in termostabil fitazının moleküler yapısı tanımlanmıştır. Bu fitat parçalayan enzim HAFhy sınıfından değildir. Ve hiçbir bilinen fosfataz grubuna girmeyen bir yapı göstermesinden dolayı az rastlanan yeni bir enzim sınıfı oluşturmaktadır. β -pervane fitaz ismi enzimin moleküler yapısının çoğunlukla β -yaprağından (β -sheet) oluşması ve beş yapraklı pervaneye benzemesinden gelmektedir (Polaina ve Maccabe, 2007).



Şekil 1.4. Histidin asit fosfataz sınıfından olan *Aspergillus niger* fitaz A enzimini temsil eden üç boyutlu görüntü

(<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAXD0AJ/fitase>)

1.3.3.3. Sistein Fosfatazlar (SF)

Anaerobik Rumen bakterisi olan *Selenomonas ruminantium*'un sahip olduğu fitaz sistein fitaz grubundandır. Bu tip fitazların en önemli özelliği aktif bölgelerinin substrat spesifikliğı sağlayan geniş ve derin bir cep halinde olmasıdır. Bu derin ve geniş cep fitik asitin tamamen fosforillenmiş olan inositol gruplarını içine alabilmektedir. Bu oldukça yüksek kapasiteli elektrostatik çevre bu gruptaki diğer enzimlerin aksine substrat olarak fitata uyum sağlamaktadır (Polaina ve Maccabe, 2007).

1.3.3.4. Mor Asit Fosfatazlar (MAF)

MAFların tüm üyeleri özel 7 metal-ligand amino asit seti içeren metallofosfoesteraz sınıfındadırlar. Bitkilerde, hayvanlarda, funguslarda ve bakterilerde bulunan geniş bir fosfataz grubudur. HAF ve SF lerde olduğu gibi bu gruptaki enzimlerin tümü substrat olarak fitatı kullanamamaktadırlar. Mor asit fitazların moleküler yapısı halen tam olarak aydınlatılamamıştır (Polaina ve Maccabe, 2007).

1.3.4. Fitaz Kaynakları

Genel olarak dört fitaz kaynağı vardır bunlar: bitkisel fitazlar, mikrobiyal fitazlar (fungal ve bakteriyel fitazlar), insanlar ve hayvanlarda ince barsak mukozasından salgılanan fitazlar ve kalın barsak ile ilişkili mikroflora tarafından endojen olarak üretilen fitazlar'dır (Kumar ve ark, 2010). Bu enzimlerin içerisinde endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalar için en uygun olanların mikrobiyal fitazlar olduğu bildirilmiştir (Grenier ve Konietzny, 2006; Polaina ve Maccabe, 2007; Bommarius ve Riebel, 2000).

1.3.4.1. Bitkisel Fitazlar

Fitaz enzimi, birçok bitkisel kaynaklardan izole edilip tanımlanmıştır. Bu kaynaklardan bazıları; pirinç, kolza tohumu, soya fasulyesi, mısır, buğday ve çavdardır. Bu bitkilerin yanında beyaz hardal, patates, marul, ıspanak, turp, çimen

ve zambak poleninden de fitaz elde edilmiştir. Ayrıca çavdar ve tritikale (buğday×çavdar melezi) gibi bitkisel kaynaklar asit fosfataz aktivitesine sahiptir. İstenilen özelliklere sahip fitaz kodlayan mikrobiyal genler, verimli fitaz düzeylerini arttırmak için bitkilerin içerisine konulup çoğaltılabilmektedir. (Kumar ve ark, 2010). Genel olarak fitaz kodlayan genler, özellikle *A. niger*, *Bacillus subtilis*, *A. fumigatus*, *E. coli* ve *Schwanniomyces occidentalis*'den elde edilmiştir. Bu genler çeşitli bitkilere aktararak verimli derecede fitaz üretebilen transgenik bitkiler elde edilmiştir (Grenier ve Konietzny, 2006).

1.3.4.2. Mikrobiyal Fitazlar

Mikrobiyal fitazlar funguslar, bakteriler, mayalar ve protozoonlardan izole edilmiştir (Aşan, 2007). Bu organizmalar içerisinde en yüksek fitaz aktivitesi funguslarda özellikle *Aspergillus* türlerinde belirlenmiştir (Tablo 1.3) (Polaina ve Maccabe, 2007). Yapılan bir tarama çalışmasında fitaz üretimi için topraktan 2000'den fazla mikroorganizma izole edilmiş ve elde edilen fitazlar içerisinde az sayıda görülen ekstraselüler fitaz üreticilerin filamentöz funguslar olduğu gözlenmiştir (Shieh ve Ware, 1968). Mikrobiyal fitaz enzimlerin birçoğu histidin asit fosfataz veya alkali fitaz alt ailesine bağlıdır ve kinetik, steriyospesifik ve biyokimyasal olarak önemli varyasyonlar göstermektedirler (Polaina ve Maccabe, 2007).

1.3.4.2.1. Bakteriyel Fitazlar

Bakterilerden izole edilen fitazlar glikozillenmemiş histidin asit fosfatazlar veya β -pervane yapısındaki alkali fitazlardır (Polaina ve Maccabe, 2007). Bakteriler arasında *E.coli*, *B. subtilis*, *Klebsiella terringa*, *Lactobacillus sp.*, *Pseudomonas spp.* büyüme evresinde ekstraselüler fitaz üreterek fitatı indirgeyebilirler (Kumar ve ark, 2010). Ayrıca *Aerobacter aerogenes* (Greaves ve ark, 1967) *Raoultella sp.* (Greiner ve ark, 1997), *Citrobacter braakii* (Kim ve ark, 2003), *Enterobacter* (Yoon ve ark, 1996) ve anaerobik rumen bakterilerinden özellikle *Selenomonas ruminantum*, *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella sp.*, *Mitsuokella multiacidus* (Yanke ve ark, 1998) ve *Mitsuokella jalaludinii* (Lan ve ark, 2002) de fitazı ürettikleri saptanmıştır.

1.3.4.2.2. Maya Fitazları

1984’de ilk rapor edilen fitaz mayadan elde edilmiştir (Nayini ve Markakis, 1984). Daha sonra birkaç maya suşunun fitatı hidroliz etme yeteneği olduğu gözlenmiştir. Maya fitazları arasında *Saccharomyces cerevisiae* özellikle ekmek yapımında büyük öneme sahiptir. *Pichia anomala* ve *Candida krusei* WZ-001’den hücreye bağlı fitazın üretimini bildirilmiştir (Vohra ve Satyanarayana 2001; Quan ve ark., 2001). Yüksek sıcaklık ve pH’da bile değişmeden aynen stabil kalmalarından dolayı bu gibi fitazlar gıda uygulamalarında büyük öneme sahiptirler. *P. anomala* (Vohra ve Satyanarayana, 2002), *Schwanniomyces castellii* (Segueilha ve ark., 1992) ve *Lactobacillus sanfranciscensis* (De Angelis ve ark., 2003)’den izole edilen fitazlar yüksek sıcaklıklara direnç göstermektedirler. Rekombinant teknolojisi aracılığıyla *E.coli* fitazının termal stabilitesinin arttırılmasında, maya olan *Pichia pastoris* kullanılmıştır (Rodriguez ve ark., 2000). Fitaz üreten denizel mayaların da olduğu rapor edilmiştir. Bu deniz mayaları henüz tam olarak karakterize edilmemiştir. Ancak filogenetik olarak *Hanseniaspora uvarum*, *Yarrowia lipolytica*, *Kadamaea ohmeri*, *Candida tropicalis* ve *C. carpophila* ile ilişkili oldukları, alkali fitaz üretebildikleri ve böylece denizel fosfor kirliliği biyoremediasyonunda uygulanabilecekleri ön görülmektedir (Hirimuthugoda ve ark., 2006).

1.3.4.2.3. Fungal Fitazlar

Funguslardan izole edilen fitazlar genellikle 3-fitazlardan olup histidin asit fosfatazlardır. Glikozillenmiş olan bu fitazlar, geniş bir çeşitliliğe sahip olan substrat grubunda aktiftirler. Günümüzde ticari olarak fitaz enzimi üretiminde toprak fungusu olan *Aspergillus* cinsi üzerinde durulmaktadır. Yaygın olarak kullanılan, ticari amaçlı üretilen fitaz kaynakları *A. niger*, *A.ficum*, *A.fumigatus*’dur (Wyss ve ark, 1999). *A. niger* PhyA ilk karakterize edilen ve ticarileştirilen fitaz enzimidir. 1,4 kb’lık DNA fragmentince kodlanan bu enzim 80 kDa moleküler ağırlığındadır. Fitik aside karşı yüksek bir afiniteye sahip olup çift optimum pH’lı (2,5 ve 5,0-5,5) ve 55-60 °C optimum sıcaklığa sahiptir (Han ve ark.,1999).

Fitaz geni üzerinde yapılan dizi analizi ve blast çalışmaları ile *Aspergillus fumigatus* fitazının, *A. niger* fitazı ile %66 dizi benzerliği göstermesine karşılık sıcaklık toleransının daha iyi olduğu belirtilmiştir (Pasamontes ve ark., 1997; Wyss ve ark., 1998b). Bu termotoleransın ısı denatürasyonundan sonra yeniden katlanma yeteneğinin yüksek olması ile alakalı olduğu bildirilmiştir. Termotoleransın ısı uygulamalarındaki tamponların spesifikliği ile de ayarlanabileceği kaydedilmiştir. Enzim geniş bir pH aralığına sahiptir ve az fosforillenmiş inositolfosfatlara karşı oldukça aktiftir. Buna karşın, fitata karşı spesifik aktivitesinin düşük olduğu bildirilmiştir (Polaina ve Maccabe, 2007). *A.fumigatus*, *Emericella nidulans*, *Myceliophthora thermophila* fitazlarının birçok fosfatlı bileşikler üzerinde önemli ölçüde aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Wyss ve ark., 1999). Quan ve arkadaşları (2004) hava kaynaklı fungus *Cladosporium sp.* FP-1'den düşük moleküler ağırlıklı (32.6 kDa) fitaz izole etmişlerdir. Bu enzim glikozillenmiş olup, optimum pH'sı 3,5, optimum sıcaklığı 40 °C olarak belirlenmiştir (Quan ve ark., 2004). Neves ve arkadaşları (2011) tarafından *Lichtheimia blakesleeana*'nın fitaz ürettiği saptanmıştır. Ayrıca endofitik funguslardan olan *Fusarium verticillioides* ve *Rhizoctonia sp.*'nin de fitaz üreticisi oldukları belirlenmiştir. *Fusarium verticillioides* fitazının karakterizasyonu sonucunda; sıcaklık optimumunun 50 °C olduğu ve 60 °C kadar stabil kalabildiği, optimum pH'sının ise 5.0 olduğu saptanmıştır (Marlida ve ark., 2010).

Basidiomyceteler üzerine yapılan bir çalışmada bunların fitazlarının 6-fitazlar (EC 3.1.3.26) olarak gruplandırılabilirliğini göstermiştir. Ayrıca *Peniophora lycii* fitazı dışındakilerin optimum sıcaklıklarının 40-60 °C, pH larının ise 5.0-6.0 arasında olduğu ortaya konmuştur (Lassen ve ark., 2001). *P. lycii* phyA fitazı ticari olarak kullanılmaktadır ancak yüksek sıcaklık uygulamalarına ve proteazlara hassas olduğu düşünülmektedir (Simon ve Igbasan, 2002). Birçok tür ekstraselüler fitaz aktivitesi için test edilmiş ve *Calcarisporiella thermophila*, *Chaetomium thermophilum*, *Corynascus thermophilus*, *Myceliophthora thermophila*, *Talaromyces thermophilus*, *Thermomucor indicae-seudaticae*, *Malbranchea cinnamomea*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizomucor miehei* termofilik funguslarının fitaz ürettikleri saptanmıştır (Berka ve ark., 1998; Chadha ve ark., 2004).

Tablo 1.3. Çeşitli mikrobiyal fitazlar ve biyokimyasal özellikleri (Singh ve ark.,2011)

Kaynak	MA(kDa)	opt	pHopt	Km(mM)	pI	Spesifiklik
Fungi						
<i>Aspergillus fumigatus</i>	75	58	5	-	-	-
<i>A. niger</i>	85	58	2,5 5,0	0,04	4,50	P
<i>A. niger</i> SK-57	60	50	5,5 2,5	0,0187	-	P
<i>A. niger</i>	353	50	2,5	0,606	-	P
<i>A.oryzae</i>	120-140	50	5,5	0,33	4,15	B
<i>A.nidulans</i>	77,8	55	5,5	-	-	-
<i>Rhizopus oligosporus</i>	-	55	4,5	0,15	-	-
<i>A.niger</i> ATCC9142	84	65	5	0,1	-	B
<i>Rhizopus oligosporus</i>	124	65	5	0,01	-	B
<i>Peniophthora lycii</i>	72	50-55	4-4,5	-	3,61	-
<i>Ceriporia</i> sp.	59	55-60	5,5-6,0	-	7,36-8,01	-
<i>Agrocybe pediades</i>	59	50	5,0-6,0	-	4,15-4,86	-
<i>Trametes pubescens</i>	62	50	5,0-5,5	-	3,58	-
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	60	65	7	0,11	4,7-5,2	B
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	-	55	-	-	-	-
<i>Rhizomucor pusillus</i>	-	70	5,4	-	-	B
<i>Myceliophthora thermophila</i>	-	37	6	-	-	B
<i>Sporotrichum termophile</i>	456	60	5,5	0,15	4,9	B
Mayalar						
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	45	4,6	-	-	-
<i>Schwanomyces castellii</i>	490	77	4,4	0,038	-	B
<i>Arxula adenivorans</i>	-	75	4,5	0,25	-	B
<i>Candida krusei</i> WZ001 [#]	330	40	4,6	-	-	-
<i>Pichia ananola</i> [#]	64	60	4	0,2	-	B
<i>P. rhoanensis</i>	-	70-75	4,0-4,5	0,25	-	-
<i>P. spartnae</i>	-	75-80	4,5-5,0	0,33	-	-
Bakteriler						
<i>Aerobacter aerogens</i> [*]	-	25	4,0-5,0	0,135	-	-
<i>Bacillus</i> sp. DS11	-	70	7	0,55	5,3	P
<i>Bacillus subtilis</i>	37	60	7,5	0,04	-	-
<i>B. subtilis</i> (natto)	38	60	6,0-6,5	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	43	55	7,0-7,5	-	6,5	P
<i>B. subtilis</i>	44	55	6,0-7,0	-	5	P
<i>B. İcheniformis</i>	47	65	6,0-7,0	-	5,1	-
<i>B. amyloliquefaciens</i>	44	70	7,0-7,5	-	-	-
<i>Esherichia coli</i> [*]	42	55	4,5	0,3	6,3-6,5	P
<i>Klebsiella oxytoca</i>	40	55	5,0-6,0	-	-	-
<i>K. aerogenes</i>	700	65	4,5	-	3,7	P
<i>Pseudomonas syringe</i> [*]	47	40	5,5	0,38	-	P
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> [*]	50	45	4	-	5	

[Fitaz konumu: (*)intraselüler, (#)hücreye bağlı, ()ekstraselüler; B:geniş spektrum, P: fitat spesifik]

Dejenere primerlerle yapılan PCR, dizi analizi ve blast çalışmaları sonucunda *Myceliophthora thermophila* fitaz geninin *A.niger* fitaz geni ve diğer histidin asit fosfatazlar ile yüksek oranda dizi benzerliği gösterdiği ortaya konmuştur (Mitchell ve ark, 1997). Termofilik fungus *Thermomyces lanuginosus*'tan izole edilen fitaz geni moleküler olarak tanımlanmış ve *A.niger* ile karşılaştırıldığında daha yüksek termostabilite, katalitik verim ve yüksek geçiş sıcaklığına sahip olduğu bildirilmiştir (Berka ve ark., 1998; Chadha ve ark., 2004).

1.4. Enzim Üretim Teknikleri

Fermentasyon funguslar ve bakteriler gibi pek çok mikroorganizma kullanılarak kompleks substratlardan basit maddelerin biyolojik dönüşümü tekniği olarak anılmaktadır. Bu biyolojik dönüşümler esnasında birçok sekonder metabolitler de oluşturulmaktadır. Bu sekonder metabolitler antibiyotikler, enzimler, peptidler, büyüme faktörleri vb. olabilmektedir. Bu maddelerin çoğu endüstriyel olarak önemlidir ve büyük ölçekli olarak üretilmeye çalışılmaktadır. Endüstriyel ölçekte üretimde en çok tercih edilen fermentasyon teknikleri katı faz fermentasyonu ve batık fermentasyondur. Yapılacak olan fermentasyonda bu tekniklerden hangisinin seçileceği üretilecek olan maddeye, üretimde kullanılacak olan mikroorganizmaya, substrata, çevresel koşullara vb. bağlıdır (Subramaniam ve Vimala, 2012).

1.4.1. Katı Faz Fermentasyon

Eski zamanlardan beri uygulanan bir teknik olan katı faz fermentasyonu (KFF), serbest suyun yokluğunda ya da az miktarda suyun varlığında katı ortamda gerçekleştirilen fermentasyon sürecini tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Daha az enerji gereksinimi, daha az atık su üretmesi, katı atık desarj problemine de bir çözüm oluşturması açısından çevre dostu bir teknik olması ve zirai-endüstriyel atıkların substrat olarak kullanılmalarına olanak sağlamasından dolayı sıklıkla tercih edilmektedir (Pandey ve ark., 1999; Pandey ve ark., 2001).

Tehlikeli bileşiklerin biyolojik yıkımı ve biyolojik iyileştirilmesi, tarımsal ve endüstriyel atıkların biyolojik detoksifikasyonu, besinsel zenginleştirme için ekin ve ekin kalıntılarının biyolojik transformasyonu, biyolojik pulping,

antibiyotik, alkaloid, bitki büyüme faktörleri, enzim, organik asitler, biyopestisitler, biyosülfektanlar, biyoyakıt, aroma bileşikleri gibi biyolojik açıdan aktif sekonder metabolitlerin üretilmesi ile ilgili uygulamalar KFF tekniği ile çalışılmış ve bu konu üzerine dikkat çekilmiştir. Son 20 yıldır KFF sistemleri düşük teknoloji sistemleri olarak düşünülmüşse de, yakın zamanlarda biyofarmasotik gibi düşük hacimde üretilen ancak maliyeti yüksek daha değerli ürünlerin üretiminde de kullanımı çalışılmaktadır. KFF süreçleri tehlikeli ve toksik bileşiklerin biyolojik zehirsizleştirilmesi (detoksifikasyonu) ve biyolojik iyileştirilmesinde potansiyel üstünlükler sunmaktadır (Nigam ve Singh, 1996; Gautam ve ark., 2002; Brand ve ark., 2000).

1.4.2. Katı Faz Fermentasyon ile Endüstriyel Enzim Üretimi

Katı faz fermentasyon yöntemi endüstriyel enzimlerin üretiminde oldukça büyük bir potansiyele sahiptir. Bu prosesin kullanımına olan özel ilginin sebebi, fermente ham ekstrenin doğrudan enzim kaynağı olarak kullanılabilmesinden dolayıdır. Gıda ve fermentasyon endüstrisindeki geleneksel uygulamalarına ek olarak, mikrobiyal enzimler biyoaktif bileşenlerden oluşan organik çözücü ortamları içeren biyotransformasyonlarda belirgin bir role sahiptirler. Bu sistem batık fermentasyon (BF) yöntemine göre pek çok üstünlüklere sahiptir bunlardan bazıları; yüksek hacimsel verimlilik, nispeten yüksek ürün konsantrasyonu, düşük sıvı atık oluşumu, basit fermentasyon ekipmanlarına gereksinim vb. dir (Pandey ve ark., 1999).

1.4.2.1 KFF ile Enzim Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Bakteri, maya ve fungusları içeren pek çok sayıdaki mikroorganizmalar, KFF ile farklı gruptaki enzimleri üretme yeteneğine sahiptir. Özel bir strain seçimi, özellikle ticari olarak etkin bir enzim miktarı elde edilmek isteniyorsa oldukça zor bir süreçtir. Örneğin, *Aspergillus niger* 19 farklı tip enzimi üretebilmekteyken, α -amilaz 28 den fazla mikrobiyal kültür tarafından üretilmektedir. İstenilen özellikleri içeren uygun bir tür bulmak kullanılacak substratın yapısı ve çevresel koşullar başta olmak üzere pek çok faktöre bağlıdır. Su aktivitesine dayanan teorik sınıflandırma göz önünde bulundurulursa sadece

fungusların KFF için uygun olduğu düşünülebilir. Nispeten yüksek su aktivitesi gereksiniminden dolayı bakteri kültürlerinin üretim için kullanılmasının çok uygun olmadığı söylenebilir. Ancak, bakteri kültürleri ile yapılan çalışmalar, KFF süreçleri için fermentasyon koşullarında değişiklik yapılabileceğini ve bakterilerin üretici olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Pandey, 1992; Pandey ve ark., 2000).

1.4.2.2. KFF’de Kullanılan Katı Substratlar

Katı faz kültürasyonu gerçekleştirmek için destek materyalin seçimi önemlidir; çünkü sürecin başarısı bu seçime bağlıdır. Bu süreçte destek materyal seçiminde dikkat edilmesi gereken en önemli faktörlerin partikül boyutu, porozite ve kimyasal kompozisyon olduğunu belirlemişlerdir. Buna ilaveten katı substratın maliyeti ve kolay bulunabilirliği de önemli kıstaslardandır (Pastrana ve ark., 1995, Murado ve ark., 1996). KFF’de kullanılan katı materyaller 2 kategoride sınıflandırılabilir: mikroorganizmanın sadece entegre olduğu zemin olarak işlev gören inert olanlar ve hem mikroorganizmanın entegre olduğu yer hem de mikroorganizmanın bazı besin gereksinimlerini karşılayabilen inert olmayanlar (Durand ve ark., 1993). Bu nedenle inert olmayanlar destek-substrat olarak adlandırılmıştır. Bu maddeler genelde tarımsal-endüstriyel kaynaklı, nisasta- ya da (ligno-) selüloz temelli tarımsal ürünler ya da tohum veya tohum yan ürünleridir (Pandey, 1992). Bununla birlikte, bu tip destek maddelerini kullanmak hem ekonomik hem de bu tip atıkların doğuracağı çevresel problemleri ortadan kaldırmaktadır. Bu tip desteklerin kompozisyonu üretilecek enzim dikkate alınarak seçilmelidir; çünkü bu maddeler söz konusu enzimler için indükleyici olarak işlev görebilmektedir. Örneğin, lignin peroksidaz üretimi lignin açısından zengin organik atıkların kullanımı ile artırılabilir (Rodriguez Couto ve ark., 2000). Lakkaz üretimi ise selülozca zengin organik atıkların kullanımı ile artırılabilirken nişasta açısından zengin atıkların kullanılması da amilazın üretimini indükleyebilecektir (Lorenzo ve ark., 2002).

İnert substratların da bazı avantajları bulunmaktadır. Poliüretan köpük gibi inert bir madde kullanıldığında ürün izolasyonu; buğday kepeği gibi doğal ham maddelerin kullanılmasına göre nispeten daha kolay ve daha ucuz olmaktadır. Çünkü, doğal hammadde substrat olarak kullanıldığında fermentasyon sonrası

ürünün ekstrakte edilmesi ve saflastırılması sırasında karşılaşılabilecek güçlükler, substrattan gelen suda çözülebilir bileşenlerin de ortamda bulunması gibi nedenler birer engel olarak görülebilir. İnert maddeler KFF'nin temel ilkelerini ya da modellendirmeyi çalışmak için daha çok tercih edilmektedir (Durand ve ark., 1993)

1.4.2.3. KFF'da Enzim Üretimini Etkileyen Faktörler

KFF'da herhangi bir süreç geliştirmek için dikkat edilmesi gereken önemli hususlar vardır. Bunlar uygun mikroorganizma, uygun substrat seçimi, substratın partikül büyüklüğü (partiküller arası alan ve yüzey alanı), substratın su içeriği ve su aktivitesi, pH, bağıl nem, inokulum tipi, yaşı ve büyüklüğü, fermente maddenin sıcaklığının kontrolü/metabolik sıcaklığın uzaklaştırılması, kültürasyon periyodu, KFF sistemindeki ortamın düzgün dağılımının sağlanması ve gazlı ortamın içeriği (oksijen ve karbondioksit seviyeleri), azot, fosfor ve iz elementler gibi besinlerle desteklenmesi, ilave karbon kaynağı ve indükleyicilerin eklenmesidir (Pandey ve ark., 1999).

KFF ile elde edilen ürün ve çıktıların batık fermentasyon ürünlerinden daha verimli olduğu genel bir yaklaşımdır. Ancak, şimdiye kadar bu iki tekniğin ürünlerini karşılaştırmak için herhangi bir yöntem ya da inşa edilmiş büyük ölçekli bir model söz konusu olamamıştır. KFF mikrobiyal kültürlerinin yaşam alanlarına benzerliği ve bu nedenle fizyolojik olarak etkinliklerinin daha fazla olması KFF'de daha yüksek ürün titreleri elde etmenin mantıklı bir nedeni olarak önerilebilir. Uygun mikroorganizma ve bu mikroorganizma ile üretilen enzime en uygun substratın seçimi bu teknikte en önemli noktalardır. (Pandey ve ark., 2000; Pandey ve ark., 1999). Bu açıdan bakıldığında çeşitli substratları taramak ve en uygun olanını seçmek gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Benzer şekilde uygun mikroorganizmaları taramak ve çalışılan alanda en iyi verim elde edileni seçmek de önem kazanmaktadır. Bu konuda bir diğer önemli husus ise süreç parametrelerinin seçimi ve onların optimizasyonu dur. Deneyin tür, düzey ve uygulamasına bağlı olarak tek ve/veya çoklu değişken parametre optimizasyon yöntemi bu fermentasyon tekniği için de kullanılabilir.

1.4.2.4. KFF'nin Avantaj ve Dezavantajları

Katı faz fermentasyon, enzim üretiminde sıklıkla kullanılan diğer bir yöntem olan batık fermentasyona göre üretilcek olan maddeye, üretimde kullanılacak olan mikroorganizmaya, substrata, çevresel koşullara vb. bağlı olarak ortaya çıkan çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahip olduğu bildirilmiştir (Holker ve ark., 2004).

KFF'nin Avantajları;

1. BF ve KFF ile yapılmış karşılaştırmalı çalışmalarda, KFF'nun benzer/yüksek verim ve pek çok üretim avantajlarına sahip olduğu ortaya çıkmıştır.
2. Düşük su aktivitesi nedeni ile bakteri ve maya kontaminasyon riski düşmektedir. Bu sayede kısmen aseptik koşullarda çalışılmasına olanak vermektedir.
3. KFF'da kullanılan temel mikroorganizma grubu olan fungusların doğal habitatlarına benzer ortamlarda çalışma imkanı sağlamaktadır.
4. Yüksek seviyede havalandırma sağlamaktadır. Bu sayede yoğun oksidatif metabolizma gerektiren proseslere imkan sağlamaktadır.
5. Fungusları içeren proseslerde sporlarla inokulasyon ortamda düzgün dağılımı sağlamaktadır.
6. Kültür ortamı sıklıkla oldukça basittir. Substrat genellikle gelişim için gerekli tüm besinleri sağlamaktadır.
7. Substratların konsantre yapısına bağlı olarak az miktardaki mekansal gereksinimleri ile basit reaktör dizaynları yeterli olmaktadır.
8. Düşük enerji gereksinimine sahiptir (Bazı durumlarda otoklavlama veya buhar uygulaması, mekanik karıştırma ve havalandırma gerektirmemektedir).
9. Düşük hacimde kirli atık su oluşmaktadır. Yüksek konsantrasyona bağlı olarak ürün ekstraksiyonu için az miktarda çözücü madde yeterli olmaktadır.
10. Düşük nem oranı spesifik ürünlerin üretimini destekleyebilmektedir oysa BF'da aynı durumda ürünler çok düşük oranda veya hiç üretilemez.

11. Bazı durumlarda batık tip fermentasyonla karşılaştırıldığında oluşan ürünler kısmen farklı özelliklere (termotolerans gibi) sahip olabilmektedir.
 12. Substratın konsantre doğasından dolayı, aynı miktardaki substratla çalışmak için KFF'da BF'a göre daha küçük reaktörler kullanılabilir.
- (Holker ve ark., 2004; Robinson ve ark., 2001; Guerra ve ark., 2003)

KFF'nin Dezavantajları;

1. Sadece düşük nem seviyelerinde gelişebilen mikroorganizmalar kullanılabilir.
 2. Genellikle substratlar ön işlem (parçalama, fiziksel, kimyasal veya enzimatik hisroliz, homojenizasyon vb.) gerektirmektedir.
 3. Biyomasın belirlenmesi oldukça zordur.
 4. Substratın katı yapısı nedeniyle proses parametrelerinin (ph, nem, oksijen, biyomas miktarı vb.) kontrolü problem olmaktadır.
 5. Mekanik karıştırma oldukça zor olduğundan statik koşullar tercih edilmek zorundadır.
 6. Sıklıkla yüksek inokulum hacimlerine gereksinim duymaktadır.
 7. Pekçok temel bilimsel ve mühendislik parametreleri açısından yeterince karakterize edilmemiştir. Reaktörlerin büyük çaplı dizayn ve uygulamasına yönelik bilgi yetersizdir.
 8. Büyüme esnasında oluşan metabolik ısının uzaklaştırılması oldukça zordur.
 9. Fermente katıların süzülmesiyle elde edilen ürün ekstraktları doğal olarak viskozdur.
 10. Dağılım nedeni ile kütle transferi sınırlıdır.
 11. Bazı KFF'larda havalandırma yüksek katı konsantrasyonuna bağlı olarak zor olabilmektedir.
 12. Sporlar çimlenme ihtiyaçlarından dolayı uzun lag zamanına sahiptirler.
 13. KFF'da kültüvasyon zamanı BF'dan daha uzundur.
- (Holker ve ark., 2004; Robinson ve ark., 2001; Guerra ve ark., 2003)

1.4.2.5. KFF ile Fitaz Enzimi Üretimi

Bakteri, maya ve funguslarda fitaz üretimi ile ilgili birçok araştırma bulunmaktadır. Ancak hayvan beslenmesinde asit toleransı ve yüksek verim nedeni ile fungal fitazlar ön plana çıkmaktadır. Varolan ticari fitazlar batık fermentasyonla üretilmektedir. Fakat dilüe ürün, rekombinant strainlerin kullanımıyla üretim ve yüksek geri dönüşüm maliyeti nedeniyle bu yöntem oldukça pahalıdır. KFF fitaz enzimi üretimi açısından SF ile karşılaştırıldığında oldukça ekonomik bir prosesdir (Bhavsar ve ark., 2010).

Fitaz enzimine olan talebin artması ile enzimi düşük maliyetli ve verimli şekilde üretmek önem kazanmıştır. Ticari olarak gıda ve hayvan yemi üretiminde fitazın kullanılması için bazı spesifik özelliklere (termostabilite, geniş pH aralığında aktivite v.b.) sahip olması gerekmektedir. Bazı durumlarda batık tip fermentasyonla karşılaştırıldığında oluşan ürünler kısmen spesifik özelliklere (termotolerans gibi) sahip olabilmektedir. Fitaz üretiminde fungusların kullanılması tercih edildiğinde KFF tekniği daha avantajlı bir hal almaktadır (Javed ve ark., 2010).

Katı faz fermentasyonla termofilik funguslar aracılığı ile fitaz enzimi üretimine yönelik bazı çalışmalar mevcuttur. Gübrelenmiş topraktan izole edilen termofilik fungus *Rhizomucor pusillus*'dan katı faz fermentasyonuyla fitaz enzimi sentezlenmiş ve optimize edilmiştir. Saflaştırılan fitazın 70 °C'de optimum aktivite ve 3,0-8,0 gibi geniş bir pH aralığında yüksek aktivite gösterebildiği ortaya konmuştur (Chadha ve ark., 2004). Yedi farklı termofilik fungus (*Aspergillus fumigatus*, *Humicola insolens*, *Rhizomucor miehei*-I, ve II, *Sporotrichum thermophile*, *Thermomyces lanuginosus*-I ve II) Hindistan'da değişik lokalizasyonlardaki kompostlardan izole edilmiştir. İzolatlar arasından *Sporotrichum thermophile* fitaz üretimi açısından en etkin tür olarak belirlenmiştir. Bu fungus aracılı ile KFF yoluyla fitaz üretimi için altı farklı substrat denenmiş ve maksimum üretim oranına buğday kepeğinde ulaşılmıştır (Javed ve ark., 2010). Termotolerant fungus *Mucor indicus*'tan fitaz enziminin katı faz fermentasyon (KFF) yoluyla üretimi ve optimizasyonunun ürün miktarını arttırdığı bildirilmiştir (Gulati ve ark., 2007a). Yine KFF yoluyla *Myceliophthora thermophila*'dan fitaz üretiminde başlangıçta gerekli optimum koşullar (pH 6.0;

nem %75; havalandırma oranı 25 ml/dak/kolon) belirlenmiş ve optimizasyon çalışmalarının fitaz aktivitesini 4 kat arttırdığı saptanmıştır (Hassouni ve ark., 2006). Termofilik funguslardan KFF yoluyla üretilen fitazların saflaştırılmasının jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografileri yoluyla başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Gulati ve ark., 2007a; Gulati ve ark., 2007b). Katı faz fermentasyonla *Sporotrichum thermophile*'nin fitaz enzimi üretimi üzerine yapılan bir çalışmada; çeşitli tarımsal atıklar (buğday kepeği, buğday sapı, mısır sapı, şeker kamışı posası, pamuk çekirdeği keki, kolza tohumu, susam) kullanılmıştır ve en yüksek verimlilikte üretim susam tohumu kekinden elde edilmiştir. Glukoz, amonyum sülfat ve inkübasyon periyodu fitaz üretimi üzerine en etkili parametreler olarak belirlenmiştir (Singh ve Satyanarayana, 2010). *Lichtheimia blakesleeana* ile yapılan KFF'da turuncgil küsbesi kullanılmıştır ve en iyi fitaz aktivitesi (264,68 U/g), pH 6.0, 34°C, %50 nem ve kültürün 48 saat inkübasyonu ile elde edilmiştir (Neves ve ark., 2011).

1.5. Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) ile Optimizasyon

Optimizasyon, prosesin belirlenen hedefler (yanıtlar) doğrultusunda, bağımsız değişkenlerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve bu bağımsız değişkenlerin hedefe (yanıta) olan etkileri de göz önünde bulundurularak bir araya getirilip uygulanması işlemidir. Herhangi bir optimizasyon prosedürü, genellikle hedef fonksiyonu adı verilen önceden tanımlanmış kriterleri maksimize veya minimize etmek için (örneğin; ürün kalitesi veya kâr) karar (bağımsız) değişkenleri adı verilen belirlenen koşulların değiştirilmesini içerir (Banga ve ark., 2003).

Cevap yüzey yöntemi (Response Surface Methodology, RSM) istatistiksel ve matematiksel yöntemlerin birleşimi ile birçok değişkenden etkilenen bir cevap yoluyla problemlerin analizi ve modellenmesi yöntemidir (Montgomery, 2001). Amaç bu cevabın optimizasyonu dur. Yöntem ilk kez G.E.P Box ve K. B. Wilson tarafından 1951' de ortaya atılmıştır. CYY temelde tasarlanmış deneylerle elde edilmiş verilere uydurulan polinomlar yardımıyla öngörü (tasarım) yapabilmeyi sağlamaktadır. Cevap yüzeyi yöntemi istatistiksel modeller kullanılmaktadır dolayısıyla en iyi istatistiksel model bile kullanılsa gerçek hayattakine yaklaşımda

bulunmakta, tam anlamıyla kesin bir doğruluk elde edilmemektedir. Her ne kadar tam bir kesinlik içermesede cevap yüzeyi yöntemi etkili bir çözüm yöntemidir. CYY’de, karmaşık sistemlerin modellenmesi için genelde ikinci dereceden polinomlar kullanılsa da daha yüksek dereceden polinomların da kullanılması mümkün olmaktadır:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \dots$$

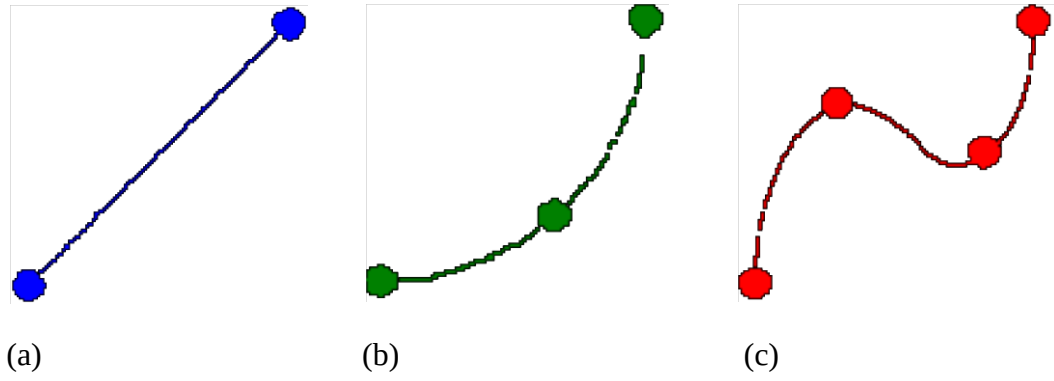
Ve ya daha genel bir ifadeyle

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i < j}^k \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \dots$$

Cevap yüzeyi modelinin oluşturulması toplanmış verilerle yukarıda gösterilen β katsayılarının tahmin edilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Bu katsayıların tahmin edilmesi en küçük kareler regresyonu ile mümkün olmaktadır (Montgomery, 2001).

1.5.1. Yüksek-Dereceli Tasarımlar için Faktör Seviyeleri

Şekil 1.5a-c kadar cevapların olası davranışlarını, faktör dizilerinin fonksiyonu gibi göstermektedir. Her durumda cevabın değerinin şeklin altından üste doğru arttığı ve faktör dizilerinin soldan sağa doğru arttığı farz edilmektedir. Eğer bir cevap Şekil 1.5a’daki gibi davranırsa, bu davranış nitelendiren tasarım matriksi iki seviyeli (düşük ve yüksek) faktörlere ihtiyaç duymaktadır. Bu model, basit iki seviyeli faktöryel ve kesirli faktöryel tasarımların temel varsayımıdır. Eğer cevap Şekil 1.5b’deki gibi davranıyorsa, bu davranış nitelendirmek için gerekli minimum seviye sayısı üçtür. İki-seviyeli tasarımın merkez noktalarına eklemeler mantıklı olarak farz edilebilmekte, fakat bir çok matrikste muamelenin düzenlenmesi bütün kuadratik etkilerin birbirini etkilemesine sebep olmaktadır.



Şekil 1.5. Faktör dizilerinin fonksiyonu olarak cevapların olası davranışları

[(a) Doğrusal fonksiyon (b) Kuadratik fonksiyon (c) Kübik fonksiyon]

Merkez noktalı ve iki seviyeli metot, bireysel saf kuadratik etkileri tahmin ederken, onları etkili bir şekilde bulmaktadır. Tasarım matrisi yaratan bir çözüm, Şekil 1.5c'deki basit kıvrımın tahminine üç-seviyeli faktör tasarımı kullanılarak izin vermektedir (Lindman, 1974).

Cevap yüzey yöntemi uygulaması için üretilmiş çoğu paket program ikinci dereceden polinomial modeli kullanmaktadır. İkinci dereceden polinomial bir modelin sadece bir tane bölgesel mini optimizasyon çalışmasında ikinci dereceden polinomial bir model kullanımı kolay bir yaklaşımdır. Eğer ikinci dereceden bir modele uygun değilse yanıtın veya bağımsız değişkenlerin transformasyonu yapılarak veya bağımsız değişkenlerin aralıkları uygun bir şekilde değiştirilerek yanıtın eğiliminin bu model ile açıklanması sağlanmalıdır (Baş ve boyacı, 2007).

1.5.2. Deney Sayısının ve Model Katsayıların Hesaplanması

Deney tasarımı yapılırken kaç deney yapılacağı aşağıdaki denklemlerle hesaplanmaktadır,

$$N = 2k + 2k + n_0 \quad k < 5 \quad (1.1)$$

$$N = 2k-1 + 2k + n_0 \quad k > 5 \quad (1.2)$$

N = Deney sayısı

k = Bağımsız değişken sayısı

n_0 = Merkezdeki deney sayısını ifade eder.

Bağımsız değişken düzeyleri (α) de Eşitlik 1.3 ve 1.4 yardımı ile hesaplanmaktadır.

$$\alpha = 2k/4 \quad k < 5 \quad (1.3)$$

$$\alpha = 2(k-1)/4 \quad k > 5 \quad (1.4)$$

Bağımsız değişkenler kullanılarak, n tane gözlenen verinin gösterimi aşağıdaki gibi olmaktadır.

$$\begin{Bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{Bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1k} \\ 1 & x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2k} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{nk} \end{bmatrix} \begin{Bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \vdots \\ \beta_k \end{Bmatrix} + \begin{Bmatrix} \varepsilon_0 \\ \varepsilon_1 \\ \vdots \\ \varepsilon_n \end{Bmatrix} \quad (1.5)$$

$$Y = X\beta + \varepsilon \quad (1.6)$$

katsayı vektörü, en küçük kareler farkı yöntemi kullanılarak elde edilen eşitlik 1.6 ile hesaplanmaktadır.

$$\beta = (X^T X)^{-1} X^T y \quad (1.7)$$

Katsayı vektörü bulunup yerine konulmasıyla, cevap yüzeyi de bulunmuş olmaktadır (Ohata ve ark., 2003). CYY kullanılarak karmaşık deney sistemleri için en iyi deney koşulları, Doehlert matrix (DM), merkezi bileşke tasarımı (CCD), üç düzeyli hibrit tasarım, bir faktör tasarımı, pentagonal tasarım, D-optimal tasarım, faktöriyel tasarım ve üç boyutlu dizayn olan Box-Behnken (BBD) gibi yöntemlerle belirlenmekte ve modellenmektedir (Montgomery, 2001).

1.5.3. CYY İçin Kullanılan Tasarım Modelleri

CYY; tepki (response) değişkenine etki eden çok sayıda değişkenin olması durumunda; problemlerin analiz edilmesinde kullanılan istatistiksel tekniklerin ve matematiksel ifadelerin birleşimi şeklinde açıklanmaktadır. Yeni ürünün formülasyonunda, var olan ürün tasarımının iyileştirilmesinde, süreç tasarımında, sürecin geliştirilmesinde ve iyileştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. CYY için en sık kullanılan tasarım modelleri Faktöriyel tasarım, Merkezi bileşke tasarımı (CCD: Central composite design) ve üç boyutlu dizayn modeli olan Box-Behnken tasarımı (BBD)'dir. Ancak ikinci dereceden modeller içermesi ve üç

boyutlu grafikler çizilebilmesi nedeniyle CCD ve BBD tasarımları daha çok kullanılmaktadır (Montgomery, 2001; Antony, 2003; Lazic, 2004).

Söz konusu tasarım yöntemlerinden hangisinin ihtiyacı karşılayacağı hususu önemli olup, araştırmacının yapacağı çalışma konusuna hakim olması ile yakından ilgilidir. Örneğin, CCD yöntemi kullanıcıya ana tasarım noktaları dışında da deneysel çalışma imkanı sağlayarak, parametreler arasındaki etkileşimin yüksek olduğu araştırmalarda kullanılmasının daha faydalı olduğu düşünülmektedir. Diğer taraftan faktöriyel tasarım yöntemi daha çok parametrenin ana etkisini belirlemede ve doğrusal bir model denklemi elde edilmesini sağlamaktadır. BBD ise çok kullanılan tasarımlardan biri olup, sadece ana tasarım noktalarında deneylerin yapılmasını sağlamaktadır. Bunlar arasında en çok kullanılan tasarım çeşidi merkez bileşke tasarımı olarak bilinen CCD'dir (Turan ve Altundoğan, 2011).

1.5.3.1. Box-Behnken Tasarımı (BBD)

Box-Behnken dizayn (BBD) ikinci dereceden modeller içermektedir. Bağımsız değişkenler ile çıktı değerleri arasında doğrusal olmayan bağlantılar bulunabilmektedir. Elde edilen sonuçlar cevap yüzeyi üzerinde kontürler halinde gösterilmektedir. Üç değişken faktör için çizilen grafikte orta noktaların birleştirilmesi ile kübik yüzey elde edilmektedir. Box-Behnken tasarımı ile oluşturulan model için, gerçekleşmesi beklenen grafikler üç boyutlu olarak çizilebilmektedir. Yöntemdeki deneysel hatalar görülebilmekte ve quadratik model için parametrelerin seçimi yapılabilmektedir (Montgomery, 2001; Antony, 2003; Lazic, 2004).

1.5.3.2. Merkezi Bileşke Tasarımı (CCD: Central Composite Design)

CCD merkezi bileşke tasarımında, yüksek ve düşük değerler arasında değişen bağımsız değişken değerleri bulunmaktadır. Yönteme uygunluk açısından, bağımsız değişkenler -1 ve +1 arasında değişmelidir. Bunun için en küçük değer -1 ve en büyük değer +1 olarak tanımlanmaktadır. Orta değer olarak ise 0 değeri alınmaktadır. Bir merkezi bileşke tasarımı, -1 ve +1 aralığında değişen bir kübün köşelerinde küp noktaları, kübün dışında $\pm\alpha$ birim ile belirlenen

yıldız noktaları ve orijinde merkez noktaları içermektedir. α değeri, incelenen faktör sayısı ve tasarım için arzulanan bazı özelliklere bağlı olduğu belirtilmiştir. Bu model genellikle bir araştırmada matematiksel olarak doğrusal modellerin yetersiz kaldığı durumlarda ikinci dereceden model denklemlerinin açıklanmasında ve tasarlanmasında kullanılmaktadır. CCD'nin kullanılması halinde matematiksel model ikinci dereceden bir polinom haline dönüşmektedir (Montgomery, 2001; Antony, 2003; Lazic, 2004).

1.5.4. Model Uygunluğunun Test Edilmesi

Regresyon modeli tahminlendikten sonra bu denklemin ilişkiyi ne derece açıkladığının ve bu denklemi kullanarak yapılacak tahminlerin ne derece hassas olacağının araştırılması gerekmektedir. Yapılan varsayımlardan biri olan, seçilen modelin matematiksel formunun uygun olduğu, dolayısıyla gerçek ortalama yanıtı temsil edebildiği de test edilmelidir. Bu amaçla, varyasyon katsayısının (C.V) hesaplanması, regresyon analizine hipotez testlerinin uygulanması, hipotez testlerinin regresyon katsayılarına bireysel olarak uygulanması, regresyon katsayısının (R^2) ve düzeltilmiş regresyon katsayısının hesaplanması (R^2_{adj}), tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamının (PRESS) hesaplanması, yeterli tahminleme (adequate precision) değerinin hesaplanması, model uygunsuzluğunun test edilmesi (lack of fit testi) ve kalıntı analizi gibi farklı test yöntemleri uygulanmaktadır (İkiz ve ark., 2000).

1.5.5. Model Uygunsuzluğu (Lack of Fit) Testi

Yanıt yüzey yönteminde, tasarım edilmiş denemelerden alınan veriler, regresyon modeline fit ettirilmektedir. Elde edilen bu model gerçek yanıt fonksiyonuna sadece bir yaklaşım olduğu için, tahminlenen değerler ile deneysel veriler arasındaki fark (kalıntı), sadece saf deneysel hatayı değil modelin matematiksel formunun uygunsuzluğundan kaynaklanan hatayı da içermektedir. Modelin matematiksel formunun uygunsuzluğundan kaynaklanan hataya, model uygunsuzluğu (Lack of fit) denmektedir. İdeal olarak, istatistiksel açıdan modelin

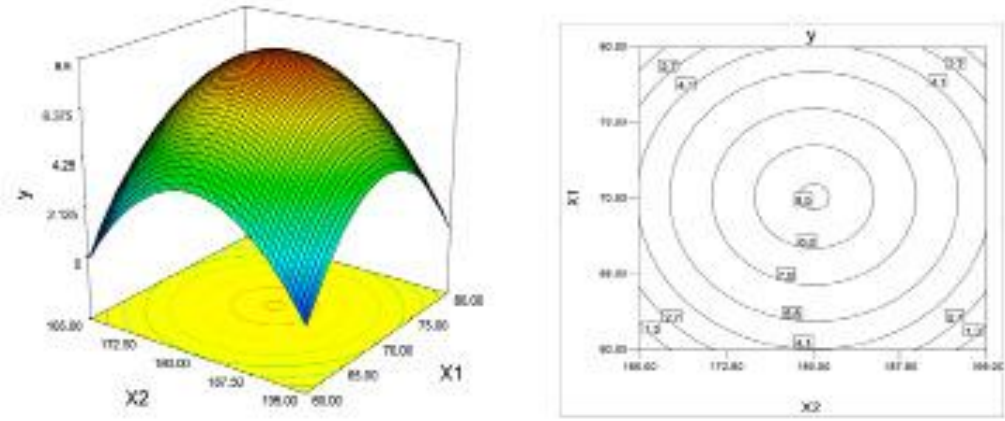
matematiksel formunun uygunsuzluğunun (lack of fit) önemsiz ve regresyon modeli için önemli olması gerekmektedir (Montgomery, 2001; Castillo, 2007).

1.5.6. Optimizasyon

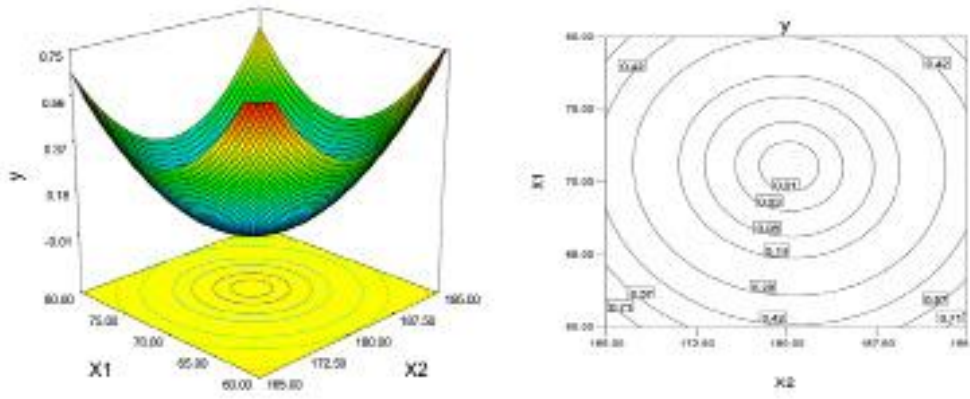
Proseslerin optimizasyonunda genellikle ürünün kalite kriterlerini veya sistemin performansını belirleyen çok sayıda cevap eş zamanlı olarak çalışılmaktadır. Bu cevapların bazılarının maksimum seviyede tutulması, bazılarının minimum seviyede tutulması, bazılarının da kabul edilebilir değerler veya hedef değer alması istenmektedir. Birçok durumda, bir cevabın geliştirilmesi diğer bir cevap üzerinde olumsuz bir etki oluşturabilmektedir. Bu yüzden, optimizasyon çalışmalarında sistemi karakterize eden tüm cevapların hep birlikte ele alınması gerekmektedir. Ancak bu durumda, optimizasyon oldukça karmaşık bir hal almaktadır. Bu durumu aydınlatmak için farklı yaklaşımlar öne sürülmüştür (Castillo, 2007).

Tek cevaplı optimizasyon problemlerinin çözümü durağan noktaların hesaplanması ile yapılabilmektedir. Çok cevaplı optimizasyon problemlerinin çözümünde: lineer olmayan programlama yaklaşımı, cevapların izohips eğrileri çizilerek üst üste yerleştirilmesi (superimposing) ve desirability (istenilen hedefe ulaşma) fonksiyonu yaklaşımı gibi yaklaşımlar kullanılmaktadır (Castillo, 2007).

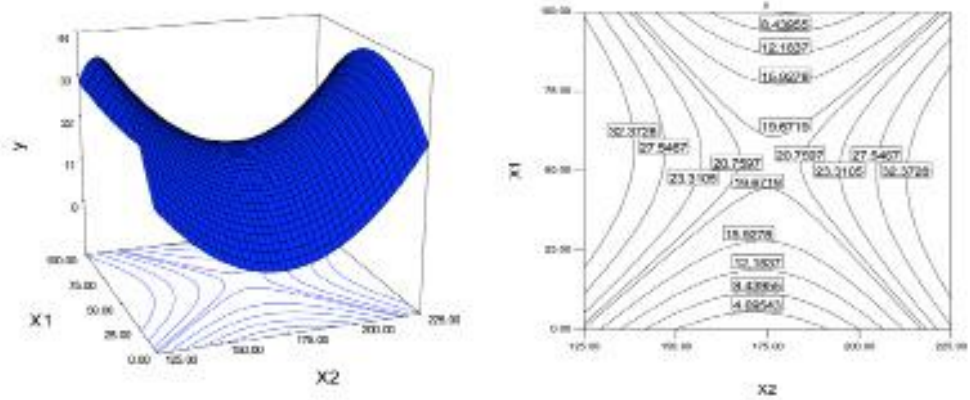
Çok cevaplı sistemlerin optimizasyonunda temel amaç, tüm cevaplar arasında en iyi dengenin sağlanmasıdır. Ancak lineer olmayan programlama yaklaşımıyla bu karşılanamamaktadır. Cevapların izohips eğrilerinin çizilerek üst üste yerleştirilmesi (superimposing), çok yanıtlı optimizasyon problemlerinin çözümünde kullanılan diğer bir yaklaşımdır. Her bir izohips eğrisi, bir bağımsız değişken merkezdeyken, diğer iki değişkenin sonsuz sayıdaki kombinasyonlarını vermektedir. Katsayılarla bağlı olarak izohips eğrilerinin dairesel, eliptik ya da eğer şeklinde olması; maksimum nokta, minimum nokta, (eyer noktası (saddle point)) durgun tepe ya da yükselen/azalan tepe koşullarını verebilmektedir. Maksimum nokta, minimum nokta ve eğer noktası için cevap yüzey grafikleri ve izohips eğrileri sırasıyla Şekil 1.6 a,b ve c'de gösterilmiştir. Cevap yüzeyinin dairesel olması, değişkenler arasındaki etkileşimin ihmal edilebilir olduğunu, elips ya da eyer şeklindeki yüzeyler iç etkileşimin önemli olduğunu göstermektedir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 1.6. Maksimum nokta (a), minimum nokta (b) ve eğir noktası (c) için cevap yüzey grafikleri ve izohips eğrileri

En küçük elips ya da dairesel şekil ile sınırlandırılmış yüzey öngörülen en yüksek veya en düşük cevabı belirtmektedir (Myers ev ark., 2004). Ancak bu yaklaşım çok sayıda bağımlı ve bağımsız değişkenin (dört veya daha fazla) bir arada incelendiği durumlar için kullanışlılığını kaybetmektedir. Ayrıca, cevapların çok farklı skalaya sahip olması aynı grafik üzerinde gösterilmelerini de zorlaştırmaktadır (Montgomery, 2001; Castillo, 2007).

Desirability (İstenilen Hedefe Ulaşma) fonksiyonun ilkesi, tüm cevapların, boyutsuz desirability skalasını içeren “desirability fonksiyonu” olarak tanımlanan tek bir fonksiyon altında toplanmasını ve bu fonksiyonun arzu edilen sonuçları verecek şekilde maksimize edilmesini içermektedir. Farklı skalaya sahip yanıtların birlikte incelenebilmesi, yanıtların tek bir fonksiyona kolayca dönüştürülebilmesi ve kalitatif ve kantitatif yanıtların kullanılabilmesi bu yöntemin önemli avantajları arasında bulunmaktadır (Myers ev ark., 2004).

1.5.7. CYY ile Fitaz Üretiminin Optimizasyonu

Bazı faktörlerin enzim üretimi üzerine etkilerini analiz etmek için kullanılan klasik yöntemler, diğer faktörlerin sabit tutulduğu koşullarda bir seferde bir faktörün incelenmesi mantığına dayalıdır. Fitaz üretim parametrelerinin optimizasyonu için bu yaklaşım, çok meşakatli, zaman alıcı, pahalı ve değişkenler arasındaki etkileşimleri aydınlatmamaktadır. İstatistiksel uygulamalar ekonomiktir. Aynı zamanda da faktörler arasındaki ilişkileri ortaya koyan, değişkenlerin optimum değerlerini tahmin edebilen faydalı bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. Cevap yüzey yöntemi (CYY), çok sayıda dizayn parametresini kullanımında faydalıdır. Biyoteknolojik proseslerde CYY enzim üretiminin optimizasyonunda pek çok fayda sağlamaktadır (Mittal ve ark., 2011).

Pekçok avantajından dolayı bu teknik bakteri ve diğer mikroorganizmalar tarafından fitaz üretiminde kültür koşullarının, ortam bileşenlerinin vb. optimizasyonunda başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Vohra ve Satyanarayana, 2002b). Mittal ve arkadaşları (2011), *Klebsiella sp.*'den portakal kabuğu unu üzerinde gerçekleştirdikleri BF'nun optimizasyonunda CCD başarılı şekilde kullanmışlardır. Ve optimizasyon sonucunda fitaz aktivitesinde 5,25 kat artış sağlamışlardır. Gulati ve arkadaşları (2007), KFF yoluyla *Termomyces lanuginosus*

ile gerçekleştirdikleri fitaz üretiminde CYY'nin BBD'ı kullanmışlardır ve sonuçta fitaz aktivitesi 4.33 units/g dan 13,26 units/g'a yükseltilmiştir. Yine *Aspergillus niger* kullanılarak KFF ile gerçekleştirilen fitaz üretiminde CYY ile optimizasyon gerçekleştirilmiş ve fitaz aktivitesinde 3,08 kat artış sağlanmıştır (Bhavsar ve ark., 2010). *Rhizomucor pusillus* ile gerçekleştirilen fitaz üretiminde kullanılan KKF'nin optimizasyonunda CYY ile klasik bir zaman/bir değişken yöntemi karşılaştırılmıştır. Ve CYY'nin klasik yöntemle göre %30 daha yüksek fitaz seviyesi sağladığı ortaya konmuştur (Chadha ve ark., 2004).

1.6. Enzim Üretim Çalışmalarında Temel Analizler

Enzimler, biyolojik katalizör olmaları nedeni ile dünyamızdaki yaşamı mümkün kılan etmenlerin başında gelmektedirler. Enzimlerin varlıklarını, etkilerini, lokalizasyonlarını, kataliz mekanizmalarını, miktarlarını, saflıklarını vs. belirlemenin en önemli yolu onların aktivitelerini ölçmektir. Herhangi bir enzim için ideal bir aktivite belirleme yolu bulunmamaktadır. Çünkü bir yöntemin uygunluğu, enzimin saflığı, enzimin fizikokimyasal özellikleri, katalizlediği reaksiyonun tipi, lokalize olduğu yer gibi pek çok faktöre bağlıdır (Bergmeyer, 1974).

1.6.1. Enzim Aktivitesinin Tayini

Enzim aktivitesi, enzimin katalizlediği reaksiyonda kullanılan substratın kullanım hızı ya da ürünün oluşum hızı tayin edilerek bulunmaktadır. Enzim aktivitesi belirlemenin temeli, belirli bir zaman aralığında enzimin kataliz etkinliği sonucu oluşan değişimi saptamaktır. İşte bu değişim ve onun hızının belirlenmesi enzim aktivitesi olgusunun temelini oluşturmaktadır. Bu açıdan enzim aktivitesinin belirlenmesi esas olarak kinetik bir ölçümdür. Bu ölçümde değişen parametre, kataliz sonucu reaksiyon ortamındaki ürünün oluşum veya substratın kullanım hızıdır. Enzimin aktivitesini sağlıklı bir şekilde ifade edebilmek için iki önemli noktadan emin olmak gerekmektedir. Birincisi ölçüm sırasında elde edilen değerlerin enzimin gerçek başlangıç hızı olduğundan emin olunması, ikincisi ise enzimin başlangıç hızı ile derişimi arasında doğrusal orantı olmasıdır. Böylece aktivite/enzim derişimi arasındaki oran sabit olacak ve bu değerle enzimin

aktivitesini sayısal olarak ifade etmede kullanılabilecektir. Bir enzimin aktivitesi çok çeşitli yollarla ifade etmek mümkündür ancak uluslararası standartlarda ünite veya enzim ünitesi olarak ifade edilmektedir. Buna göre bir ünite enzim bir dakikada bir μmol ürünün oluşumu veya 1 μmol substratın dönüşümünü katalizleyen enzim miktarıdır. Bir enzimin spesifik aktivitesi ise 1 mg proteini başına düşen enzim ünitesinin sayısı olarak tanımlanmaktadır (Bergmeyer, 1974).

1.6.2. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Belli hacimde bir çözeltideki toplam protein miktarının belirlenmesi, ayırma ve saflaştırma işlemlerinin seçiminde ve belli aşamalarda protein veriminin ve saflığının kontrolünde önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle elektroforetik ve kromatografik ayırmalarda deneylerin optimizasyonu için miktar tayinine gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca çalışılan bir enzimin spesifik aktivitesi ve saflaştırma derecesinin belirlenmesinde de toplam protein miktarının belirlenmesi gerekmektedir (Temizkan ve Arda, 2004, Scopes, 1994).

Protein miktarının belirlenmesi için doğrudan veya dolaylı birçok yöntem geliştirilmiştir. Bunlar arasında, azot miktarının belirlenmesine dayalı ve dolaylı bir yöntem olan Kjeldahl yöntemi, kıvılcık spektrofotometri, türbidimetri, fluorimetri, refraktometri ve polarografi gibi doğrudan yöntemler sayılabilir. Son yıllarda yararlanılan teknikler, protein çözeltisinin UV absorpsiyonunun ölçülmesi veya bir belirteç ile reaksiyonu sonucu oluşan renkli bir bileşiğin görünür alanda spektral olarak belirlenmesi temeline dayanmaktadır (Temizkan ve Arda, 2004, Scopes, 1994).

1.6.2.1. Bradford (Boya-Bağlama) Yöntemi

Bu yöntem, Coomassie brilliant blue G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltiğinde değişik şiddette mavi renk ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Boyanın özellikle arginin gibi bazı aminoasitlere ve bazı aromatik aminoasitlere bağlanma eğiliminde olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla bu yöntemde proteinin primer yapısının önemi vardır. Duyarlılık sınırları, total reaksiyon karışımında (5,1 ml) 20-140 μg olan bu

yöntemde asidik boya proteine bağlanmakta ve 495-595 nm arasında maksimum absorpsiyon değerleri elde edilmektedir (Temizkan ve Arda, 2004).

1.6.3. Doğal Olmayan (Denatüre) Jel Elektroforezi: SDS-PAGE

Elektroforez tekniği, yüklü moleküllerin elektriksel alanda ayrışmaları temeline dayanmaktadır ve proteinlerin analizinde ve ayrışmasında da geniş çapta kullanılmaktadır. Temelde proteinin molekül ağırlığını, oligomerik mi monomerik mi olduğunu, miktarını, saflığını vb. belirlemek yoluyla proteini tanımlamak amacıyla kullanılmaktadır. Proteinlerin elektroforatik ayrışmasında nişasta, agaroz ve selüloz asetat gibi çeşitli jeller kullanılmakla birlikte, genelde en iyi ayrışmanın sağlandığı poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) tekniği uygulanmaktadır (Scopes, 1994).

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde, polipeptidlerin ilerleme hızları, sadece iç elektriksel yükleri tarafından değil, aynı zamanda molekül ağırlıkları tarafından da belirlenmektedir. SDS, polipeptidlerin ana iskeletini çevreleyerek proteinleri denatüre eden anyonik bir deterjandır. Ayrıca moleküllere negatif bir yük de kazandırmaktadır. SDS-PAGE'nin en önemli yararı, polipeptidlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesine olanak vermesidir. Molekül ağırlığı bilinmeyen bir protein örneği, molekül ağırlığı bilinen standart proteinlerle birlikte aynı jel üzerinde yürütülür ve boyama sonrasında jelde gözlenen bantların karşılaştırılması ile proteinin molekül ağırlığı hakkında bir fikir elde edilebilmektedir (Temizkan ve Arda, 2004, Scopes, 1994).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

Çalışmamızda materyali oluşturan 47 adet su örneği Kütahya ve Afyon il sınırları içerisindeki seçilmiş olan toplam 13 kaplıcadan 20.09.2008 tarihinde yapılmış olan 1. örnekleme çalışması ve 20.10.2009 tarihinde yapılmış olan 2. örnekleme çalışması ile alınmıştır. Bu kaplıcalar: Kütahya’da Yoncalı belediyesi-Çiftlikköy kaplıcaları, Gediz ilçesi - Ilıca kaplıcaları, Simav ilçesi – Eynal, Çitgöl ve Naşa kaplıcaları, Emet ilçesi – Osmanlı, Kaynarca ve Dereli kaplıcaları, Tavşanlı ilçesi – Göbel kaplıcaları ve Hisarcık ilçesi – Esire kaplıcaları; Afyon’da Ömerli kaplıcası, Gecek kaplıcası, Sandıklı ilçesi – Hüdai kaplıcaları, Gazlıgöl beldesi – Kırkpınar kaplıcasıdır. Bu bölgeler, bölgelerden su örneği alınan kaplıcalar ve suların sıcaklık ve pH’ları Tablo 2.1-2.4’de belirtilmiştir.

Thermomyces lanuginosus’dan enzim üretiminde en uygun substratı belirlemek için KFF’de tarımsal artıklardan buğday kepeği, pirinç kepeği, yulaf kepeği, çavdar kepeği, arpa kepeği, bonkalit, öğütülmüş ayçiçeği sapı ve öğütülmüş fındık kabuğu substrat olarak kullanılmıştır. Bu tarımsal artıkların kimyasal kompozisyonları Tablo 2.5’de verilmiştir.

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.1. Potato Dextrose Agar Base (PDA) (1.10130, Merck)

<i>Patatesden inüzyon</i>	200 g
<i>Bacto dekstroz</i>	20 g
<i>Bacto agar</i>	15 g

Besiyeri içeriği, 1000 ml distile suda 39 g olacak şekilde hazırlanmış ve sonra 121 °C’ de, 1,1 atm basınçta 15 dakika tutularak sterilize edilmiştir ve sterilizasyondan sonra 45°C’ye kadar soğuyunca petri kaplarına dökülmüştür.

Tablo 2.1. Kütahya'daki bölgelerden 1. izolasyonda alınan sıcak su örnekleri ve özellikleri

Kod numaraları	Bölgeler ve kaplıcalar	Suyun çıkış sıcaklığı	Suyun pH değeri
1. bölge	Çiftlikköy Yoncalı Kaplıcaları		
1.1	Tarihi Büyük Hamam	45 °C	7,10
1.2	Tütav Termal Hamamaları	42 °C	6,72
1.3	Çelik Termal Hamamları	30 °C	6,71
2. bölge	Gediz Ilıca Kaplıcaları		
2.1	Örnek 1	85 °C	6,77
2.2	Örnek 2	75- 76 °C	6,60
2.3	Örnek 3	85 °C	8,26
2.4	Örnek 4 (sedimentli birikinti suyu)	-	-
3. bölge	Simav Çitgöl Kaplıcaları		
3.1	Örnek 1	60-65 °C	8,35
4. bölge	Simav Eynal Kaplıcaları		
4.1	Örnek 1	85 °C	8,62
4.2	Örnek 2 (sedimentli birikinti suyu)	-	-
5. bölge	Emet Kaplıcaları		
5.1	Osmanlı Hamamı	45 °C	7,85
5.2	Kaynarca hamamı	55 °C	8,16
6. bölge	Tavşanlı Göbel Kaplıcaları		
6.1	Örnek 1	32,5-33 °C	6,89
7. bölge	Hisarcık Esire Kaplıcaları		
7.1	Örnek 1	52 °C	6,91

Tablo 2.2. Kütahya'daki bölgelerden 2. izolasyonda alınan sıcak su örnekleri ve özellikleri

Kod numaraları	Bölgeler ve kaplıcalar	Suyun çıkış sıcaklığı	Suyun pH değeri
11. bölge	Gediz Ilıca Kaplıcaları		
11.1	Örnek 1	85 °C	8,53
11.2	Örnek 2	75- 76 °C	8,28
11.3	Örnek 3	85 °C	7,85
11.4	Örnek 4	85 °C	8,04
11.5	Örnek 5 (sedimentli birikinti suyu)	-	-
11.6	Örnek 6 (sedimentli birikinti suyu)	-	-
11.7	Örnek 7 (sedimentli birikinti suyu)	-	-
12. bölge	Simav Kaplıcaları		
12.1	Naşa kaplıcaları örnek 1	90 °C	8,44
12.2	Naşa kaplıcaları örnek 2	90 °C	8,49
12.3	Eynal Kaplıcaları örnek 1	85 °C	8,34
12.4	Çitgöl kaplıcaları	60-65 °C	8,48
12.5	Naşa kaplıcaları örnek 3 (sedimentli birikinti suyu)	-	-
12.6	Naşa kaplıcaları örnek 4 (sedimentli birikinti suyu)	-	-
12.7	Naşa kaplıcaları örnek 5 (sedimentli birikinti suyu)	-	-
12.8	Eynal kaplıcaları örnek 2 (sedimentli birikinti suyu)	-	-
13. bölge	Hisarcık Kaplıcaları		
13.1	Esire kaplıcaları Örnek 1	52 °C	8,04
13.2	Esire kaplıcaları Örnek 2	52 °C	8,04
13.3	Esire kaplıcaları Örnek 3 (sedimentli birikinti suyu)	-	-
14. bölge	Emet Kaplıcaları		
14.1	Emet termal resort hotel	45-55 °C	7,58

Tablo 2.2. (Devam) Kütahya'daki bölgelerden 2. izolasyonda alınan sıcak su örnekleri ve özellikleri

Kod numaraları	Bölgeler ve kaphıcalar	Suyun çıkış sıcaklığı	Suyun pH değeri
15. bölge	Dereli Kaphıcaları		
15.1	Örnek 1	38-40 °C	7,47
15.2	Örnek 2	38-40 °C	7,77
16. bölge	Tavşanlı Kaphıcaları		
16.1	Göbel Kaphıcaları	32,5-33 °C	7,71

Tablo 2.3. Afyon'daki bölgelerden 1. izolasyonda alınan sıcak su örnekleri ve özellikleri

Kod numaraları	Bölgeler ve kaphıcalar	Suyun çıkış sıcaklığı	Suyun pH değeri
8. bölge	Sandıklı Hüdai Kaphıcaları		
8.1	Örnek 1	60 °C	7,2
8.2	Örnek 2 (sedimentli birikinti suyu)	-	-
9. bölge	Gazlıgöl Kırkpınar Kaphıcaları		
9.1	Örnek 1	64 °C	6,8
10. bölge	Afyon Kaphıcaları		
10.1	Ömerli Kaphıcaları	78 °C	7,2
10.2	Ömerli Kaphıcaları (sedimentli birikinti suyu)	-	-
10.3	Gecek kaphıcaları	42 °C	6,7
10.4	Gecek Kaphıcaları (sedimentli birikinti suyu)	-	-

Tablo 2.4. Afyon'daki bölgelerden 2. izolasyonda alınan sıcak su örnekleri ve özellikleri

Kod numaraları	Bölgeler ve kaplıcalar	Suyun çıkış sıcaklığı	Suyun pH değeri
17. bölge	Sandıklı Hüdaî Kaplıcaları		
17.1	Örnek 1	60 °C	7,5
18. bölge	Gazlıgöl Kırkpınar Kaplıcaları		
18.1	Örnek 1	64 °C	7,0
19. bölge	Afyon Kaplıcaları		
19.1	Ömerli Kaplıcaları	68 °C	7,2
19.2	Gecek kaplıcaları	42 °C	6,7

Tablo 2.5. Tarımsal artıkların kimyasal özellikleri

Substrat adı	% Kül içeriği	% Azot içeriği	% Protein içeriği	% Karbonhidratlar	% Lipit içeriği
Öğütülmüş ayçiçeği sapı	3,47	0,4700	2,940	-	-
Arpa kepeği	3,48	1,9060	11,920	75	2,0
Çavdar kepeği	1,61	0,0547	0,340	62	1,4
Öğütülmüş fındık kabuğu	1,85	0,0770	0,480	-	-
Yulaf kepeği	1,78	0,0076	0,048	56	4,9
Pirinç kepeği	8,84	0,0920	0,580	69	2,1
Bonkalit	2,74	0,0460	0,290	-	-
Buğday kepeği	4,22	0,4630	2,900	60	2,0

2.1.1.2. Maya Patates Çözülebilir Nişasta Agar (MPÇNA)

<i>Maya ekstraktı</i>	4 g
<i>MgSO₄-7H₂O</i>	0,5 g
<i>K₂HPO₄</i>	1 g
<i>Çözünebilir nişasta</i>	15 g
<i>Agar</i>	20 g
<i>Ampisilin</i>	0,2 g
<i>Rose bengal</i>	0,06 g
<i>Distile su</i>	1000 ml

Besiyeri içeriğine distile su eklenip hazır hale getirildikten sonra, 121°C sıcaklıkta, 1,1 atm basınçta, 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası, 45°C'ye soğutulan besiyerine yeterli miktarda distile suda çözülen ampisilin eklenip iyice karıştırıldıktan sonra petri kaplarına 20'şer ml olacak şekilde dökülmüştür (Choi ve ark., 1999).

2.1.1.3. Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (ME063, Himedia)

<i>Kazein (pankreatik parçalanmış)</i>	5 g
<i>Hayvan dokusu (peptik parçalanmış)</i>	5 g
<i>Dekstroz</i>	20 g
<i>Agar</i>	17 g
<i>Distile su</i>	1000 ml

Besiyeri içeriği, 1000 ml distile suda 65 g olacak şekilde hazırlanmış ve sonra 121 °C' de, 1,1 atm basınçta 15 dakika tutularak sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra 45°C'ye kadar soğutulan besiyeri içerisine 1000 ml de 0,05g olacak şekilde kloramfenikol eklenerek tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra petri kaplarına dökülmüştür (Choi ve ark., 1999).

2.1.1.4. Malt Ekstrakt Agar (MEA)

<i>Malt ekstrakt</i>	<i>20 g</i>
<i>Pepton</i>	<i>1 g</i>
<i>Glukoz</i>	<i>20 g</i>
<i>Agar</i>	<i>20 g</i>
<i>Distile su</i>	<i>1000 ml</i>

Besiyeri içerikleri distile su içerisinde çözüldükten sonra 121°C' de 1,1 atm. basınçta 15 dakika tutularak sterilize edilmiştir Sterilizasyon sonrası, 45°C'ye soğutulan besiyeri petri kaplarına 20'şer ml olacak şekilde dökülmüştür (Klich, 2002).

2.1.1.5. %2 Malt Extrakt Agar (%2 MEA)

<i>Malt ekstrakt</i>	<i>20 g</i>
<i>Peptone</i>	<i>1 g</i>
<i>Glukoz</i>	<i>20 g</i>
<i>Agar</i>	<i>20 g</i>
<i>Distile su</i>	<i>1000 ml</i>

Besiyeri içerikleri distile su içerisinde çözüldükten sonra 121°C' de 1,1 atm. basınçta 15 dakika tutularak sterilize edilmiştir Sterilizasyon sonrası, 45°C'ye soğutulan besiyeri petri kaplarına 20'şer ml olacak şekilde dökülmüştür ve Biolog Microstation Sistemi ile karbonhidrat testlerinin gerçekleştirilmesinde kullanılmıştır.

2.1.1.6. Fitaz Enzimi Tarama Besiyeri

<i>D- glukoz</i>	<i>15 g</i>
<i>Kalsiyum fitat</i>	<i>5 g</i>
<i>(NH₄)NO₃</i>	<i>5 g</i>
<i>MgSO₄- 7H₂O</i>	<i>0,5 g</i>
<i>KCL</i>	<i>0,5 g</i>

<i>FeSO₄·7H₂O</i>	0,01 g
<i>MnSO₄·4H₂O</i>	0,01 g
<i>Distile su</i>	1000 ml

Besiyeri içeriğine distile su eklenip içerik tamamen çözündürüldükten sonra 1M HCl ile pH 5.5'e ayarlanmıştır. Tamamlanan besiyeri 121°C sıcaklıkta 1,1 atm basınçta 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında 45 °C'ye soğutulan besiyeri petrilere 20'şer ml olacak şekilde dökülmüştür (Gulati ve ark., 2007; Chen, 1998).

2.1.1.7. Fitaz Enzimi Üretim Tuz Solüsyonu (PSM tuzu)

<i>Asparagin</i>	0,1 g
<i>KCl</i>	0,05 g
<i>MgSO₄·7H₂O</i>	0,05 g
<i>FeSO₄</i>	0,001 g
<i>MnSO₄</i>	0,001 g
<i>Distile su</i>	100 ml

Solüsyonun içeriğine distile su eklenip içerik tamamen çözündürüldükten sonra pH'sı sterilizasyondan önce 1 N HCl ile 5,5'e ayarlanmıştır. Hazırlanan solüsyon 121°C sıcaklıkta 1,1 atm basınçta 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Solüsyon katı faz fermentasyonda katı substratın zenginleştirilmesinde kullanılmıştır (Gluati ve ark., 2007).

2.1.1.8. Glukoz Ortamı

<i>Glukoz</i>	1,5 g
<i>Maya ekstraktı</i>	0,1 g
<i>KH₂PO₄</i>	0,2 g
<i>K₂HPO₄</i>	0,23 g
<i>MgSO₄·7H₂O</i>	0,1 g

Besiyeri içeriği distile suda tamamen çözündürüldükten sonra pH'sı 7,0'ye ayarlanmıştır. Tamamlanan besiyeri 121°C sıcaklıkta 1,1 atm basınçta 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Hazırlanan besiyeri katı faz fermentasyon için kullanılacak inokulantın hazırlanmasında kullanılmıştır (Gluati ve ark., 2007).

2.1.1.9. Czapek Dox Agar (CZ)

<i>Czapek konsantresi</i>	<i>10 ml</i>
<i>K₂HPO₄</i>	<i>1 g</i>
<i>Sükroz</i>	<i>30 g</i>
<i>Agar</i>	<i>17 g</i>
<i>Distile su</i>	<i>1000 ml</i>

Besiyeri içerikleri distile su içerisinde çözüldükten sonra 121°C’ de 1,1 atm basınçta 15 dakika tutularak sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası, 45°C’ye soğutulan besiyeri petri kaplarına 20’şer ml olacak şekilde dökülmüştür (Klich, 2002).

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

2.1.2.1. Czapek Konsantresi (CK)

<i>NaNO₃</i>	<i>30 g</i>
<i>KCl</i>	<i>5 g</i>
<i>MgSO₄.7H₂O</i>	<i>5 g</i>
<i>FeSO₄.7H₂O</i>	<i>0,1 g</i>
<i>ZnSO₄.7H₂O</i>	<i>0,1 g</i>
<i>CuSO₄.5H₂O</i>	<i>0,05 g</i>
<i>Distile su</i>	<i>100 ml</i>

Bu çözelti Czapek Dox Agar besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır. Çözelti, içeriğin 100 ml distile suda çözülmesiyle hazırlanmıştır (Klick, 2002).

2.1.2.2. Lacto-Pamuk Mavisi Destek Çözeltisi (LCB Destek Çözeltisi)

<i>Gliserol</i>	<i>250 ml</i>
<i>%85 laktik asit</i>	<i>100 ml</i>
<i>Pamuk mavisi stok çözeltisi</i>	<i>3 ml</i>
<i>Distile su</i>	<i>50 ml</i>

Çözeltinin hazırlanışı iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada; kuvvetli şekilde karıştırılan 99 ml %85 laktik asite, 1 g pamuk mavisi (anilin)

kristalleri ilave edilir. Daha sonra çözelti bir Büchner hunisi yardımıyla # 50 Whatmann 90 mm filtre kağıdından (Fisher Scientific, Los Angeles, California) vakumla filtre edilerek geçirilmiştir. İkinci aşamada; distile su, gliserol ve %85 laktik asit yukarıda belirtilen oranlarda 1 saat boyunca karıştırılır, bu karışıma birinci aşamada hazırlanmış olan pamuk mavisi stok çözeltisinden homojen olarak 3 ml ilave edilmiştir ve 1 saat daha karıştırılmıştır. Mikrofungusların mikroskopik incelenmeleri için yapılan lam-lamel arası ve selobant preparatlarda inceleme ortamı olarak kullanılmıştır (Sime ve ark., 2002).

2.1.2.3. Tris-acetate-EDTA (TAE) 50X

<i>Tris base</i>	<i>242 g</i>
<i>Asetik asit</i>	<i>57,1 ml</i>
<i>EDTA (0,5 M pH 8.0)</i>	<i>100 ml</i>

Çözelti distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Çözelti 1:49 oranında distile su ile karıştırılarak 1X TAE hazırlanmıştır ve elektroforez işlemlerinde kullanılmıştır (Sambrook ve Russell 2001).

2.1.2.4. Liziz Tamponu

<i>Triton X-100</i>	<i>2 ml</i>
<i>Sodyum dodesil sülfat</i>	<i>1 g</i>
<i>NaCl (100 mM)</i>	<i>0,5844 g</i>
<i>Trisma-base (10mM, pH: 8.0)</i>	<i>0,121 g</i>
<i>EDTA: 1ml</i>	<i>0,0292 g</i>
<i>Distile su</i>	<i>100 ml</i>

Tamponun içeriği 100 ml distile suda tamamen çözüldükten sonra genomik DNA izolasyonunda kullanılmıştır (Janso ve ark., 2005).

2.1.2.5. Substratın Hazırlanışı

100 ml 0,2 M sodyum asetat tamponuna (pH 5,5) 0,5 g Na-fitat ilavesi ile hazırlanmıştır (Gluati ve ark., 2007).

2.1.2.6. 0,2 M Sodyum asetat tamponu

2,7216 g Sodyum asetat 100 ml distile suda çözündükten sonra pH'sı 5,5'e ayarlanmıştır.

2.1.2.7. Reaksiyonu Durdurucu Çözeltinin Hazırlanışı

Reaksiyonu durdurmak için %15'luk TCA (Trikloroasetik asit) kullanılmıştır. 15 g TCA 100 ml distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

2.1.2.8. Renklendirme Çözeltisinin Hazırlanışı

Çözelti 1: 94,48 ml distile su içerisine 5,52 ml sülfirik asit (%97'lik) ilave edilerek 1 M sülfirik asit çözeltisi hazırlanmıştır.

Çözelti 2: 10 g askorbik asit 100 ml distile suda çözülerek % 10'luk askorbik asit çözeltisi hazırlanmıştır.

Çözelti 3: 2,5 g amonyum molibdat 100 ml distile suda çözülerek % 2,5'lik amonyum molibdat çözeltisi hazırlanmıştır.

Renklendirme çözeltisi: Üç hacim çözelti 1, bir hacim çözelti 2, 0,1 hacim çözelti 3 ile karıştırılarak renklendirme çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti deney öncesinde taze olarak hazırlanmıştır ve uzun süre bekletilmeden kullanılmıştır (Gluati ve ark., 2007).

2.1.2.9. Bradford Belirteç Solüsyonu 5X

<i>Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası</i>	<i>0,025 g</i>
<i>%95 ethanol</i>	<i>12,5 ml</i>
<i>% 85 H₃PO₄</i>	<i>25 ml</i>
<i>Distile su</i>	<i>250 ml</i>

Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası tartıldıktan sonra % 95 ethanolde çözülmüştür ve H_3PO_4 'ün eklenmesi ile elde edilen karışım distile su ile 250 ml ye tamamlanmıştır. Hazırlanan derişik boya çözeltisi, kullanılacağı zaman 5 kere sulandırılıp Whatman no.1 filtreden geçirilerek, enzim ekstrelerindeki protein miktarının belirlenmesi çalışmalarında kullanılmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

2.1.2.10. 1,5 M Tris HCl (pH 8.8)

18,15 gr Tris tartılarak, 50 ml distile suda çözülmüştür. Konsantre HCl ile pH 8,8'e ayarlanıp distile suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır.

2.1.2.11. 1M Tris-HCl (pH 6,8)

12,1 gr Tris tartılarak, 50 ml distile suda çözülmüştür ve konsantre HCl ile pH'sı 6,8'e ayarlanıp distile suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır.

2.1.2.12. %10 SDS

10 g SDS distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak, oda sıcaklığında saklanmıştır.

2.1.2.13. %10 Amonyum Persülfat (AMPS)

SDS-PAGE jellerinin hazırlanmasında polimerizasyon başlatıcı olarak kullanılmıştır. 0,5 g amonyum persülfat distile su ile 5 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti kullanımdan hemen önce hazırlanmalıdır.

2.1.2.14. % 12'lik Ayırma Jelinin Hazırlanışı

<i>% 30 Akrlamid/bisakrlamid solüsyonu</i>	<i>4 ml</i>
<i>1.5 M Tris (pH 8.8)</i>	<i>2,5 ml</i>
<i>% 10 SDS</i>	<i>0,1 ml</i>
<i>% 10 amonyum persülfat</i>	<i>0,1 ml</i>
<i>TEMED</i>	<i>0,004ml</i>
<i>Distile su</i>	<i>3,3 ml</i>

Jel hazırlanırken amonyum persülfat ve TEMED jelleşmeyi başlattıkları için diğer bileşenler karıştırıldıktan sonra jel yürütme kasetine enjekte edilmeden hemen önce eklenmiştir (Temizkan ve Arda, 2004).

2.1.2.15. % 5'lik Yükleme Jelinin Hazırlanışı

<i>% 30 Akrilamid/bisakrilamid solüsyonu</i>	<i>0,5 ml</i>
<i>1M Tris (pH 6.8)</i>	<i>0,38 ml</i>
<i>% 10 SDS</i>	<i>0,03 ml</i>
<i>% 10 amonyum persülfat</i>	<i>0,03 ml</i>
<i>TEMED</i>	<i>0,003 ml</i>
<i>Distile su</i>	<i>2,1 ml</i>

Jel hazırlanırken %12'lik ayırma jelinde olduğu gibi amonyum persülfat ve TEMED diğer bileşenler karıştırıldıktan sonra jel yürütme kasetine enjekte edilmeden hemen önce eklenmiştir (Temizkan ve Arda, 2004).

2.1.2.16. Örnek Yükleme Tamponu (62,5 mM Tris (pH 6,8), %2 SDS, %10 gliserol, 0,72M 2-β-merkaptoetanol, %0,05 bromfenol mavisi)

<i>Tris</i>	<i>0,075 g</i>
<i>SDS</i>	<i>0,2 g</i>
<i>gliserol</i>	<i>1 ml</i>
<i>2-β-merkaptoetanol</i>	<i>0,0855 ml</i>
<i>bromfenol mavisi</i>	<i>0,005 g</i>
<i>distile su</i>	<i>10 ml</i>

Öncelikle tris verilen miktarda tartılıp 5 ml distile suda çözündükten sonra HCl ile pH 6,8'e ayarlanmıştır ve sonrasında diğer bileşenler eklenerek hacim distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Kullanılacak hacimlere bölünerek derin dondurucuda (-20°C) saklanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

2.1.2.17. Yürütme Tamponu 5X (0,025M Tris, 0,192 M glisin, %0,1 SDS, pH 8,3)

<i>Tris</i>	<i>15 g</i>
<i>Glisin</i>	<i>72 g</i>
<i>SDS</i>	<i>5 g</i>
<i>Distile su</i>	<i>1000 ml</i>

Tampon bileşenleri tartıldıktan sonra 1 litre distile suda çözülmüştür. Tampon buzdolabında 4°C’de saklanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

2.1.2.18. Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyama Çözeltisi (% 50 metanol, % 10 asetik asit, % 0,05 Coomassie Brilliant Blue R-250)

<i>Coomassie Brilliant Blue R-250 boyası</i>	<i>0,25 g</i>
<i>Metanol</i>	<i>250 ml</i>
<i>Asetik asit</i>	<i>50 ml</i>
<i>Distile su</i>	<i>200 ml</i>

Coomassie Brilliant Blue R-250 boyası metanolde çözündürüldükten sonra asetik asit (glasiyel) eklenmiştir ve çözelti distile su ile 500 ml’ye tamamlanmıştır. Bu çözelti oda sıcaklığında (6 ay) saklanabilmektedir. SDS-PAGE jelinin elektroforez işleminden sonra boyanması ve protein bantlarının görünür hale gelmesi amacı ile kullanılmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

2.1.2.19. Yıkama (bağlanmamış boyayı uzaklaştırma ‘destaining’) Çözeltisi (% 5 metanol, % 12,5 asetik asit, % 82,5 distile su)

<i>Metanol</i>	<i>25 ml</i>
<i>Asetik asit</i>	<i>62,5 ml</i>
<i>Distile su</i>	<i>412,5 ml</i>

Çözelti hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında 1 ay saklanabilmektedir. SDS-PAGE jelinin Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyandıktan sonra jeldeki boya fazlalığının geri alınarak bantların netleşmesi amacı ile kullanılmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

2.2. Metot

2.2.1. Su Örneklerinin Toplanması

Çalışmamızda materyali oluşturan 47 adet su örneği Tablo 2.1-2.4'de belirtilen istasyonlardan 20.09.2008 ve 20.10.2009 tarihinde yapılan iki örnekleme çalışması ile alınmıştır. Yapılan her örneklemede en az 1000 ml su örneği steril cam şişeler içerisine alınmıştır. Alınan su örnekleri sıcaklığı muhafaza edecek termoslar vasıtasıyla en kısa zamanda laboratuara getirilerek analize alınmıştır.

2.2.2. Su Örneklerinin Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Su örneklerinin toplam Cl_2 , Florür, amonyak azotu, nitrit azotu, nitrat azotu, mangan, magnezyum miktarları Merck Spectroquant hazır küvet testleri kullanılarak üreticinin kullanım talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Test sonuçları Merck Spectroquant NOVA 60 Fotometre ile değerlendirilmiştir.

2.2.3. Filamentli Fungusların İzolasyonu ve Saflaştırılması

Termofilik fungusları izole etmek için; her bir su örneğinin 500 ml sini 0,22 µm por çaplı steril membran filtreler kullanılarak süzölmüştür ve izolasyon ortamı olarak kullanılan, Sabouraud dekstroza agar (SDA), Maya patates çözülebilir nişasta agarlı (MPÇNA) petrilere bu filtreleri yerleştirerek 45 °C'de 14 gün inkübe edilmiştir. Aynı zamanda filtrelerle ilgili herhangi bir sorun yaşama olasılığına karşı her bir su örneğinden, her petri için birer mililitre alıp 5 petri SDA, 5 petri MPÇNA ve 5 petri Patates dekstroza agar (PDA) kullanılarak dökme plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. Bu petriler de filtre koyduğumuz petriler gibi 45 °C'de 14 gün inkübe edilmiştir. Yöntemin doğruluğunu kontrol amaçlı olarak her bir su örneğinden yine dökme plak yöntemiyle PDA besiyeri kullanılarak ekim yapılmış ve bu petriler 28 °C'de 14 gün inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda oluşan fungus kolonilerini mikroskopta 4x'lik büyütmede inceledikten sonra saf olarak elde ettiğimiz fungus kolonilerinden örnekler alınmış, steril yatık PDA, SDA, MPÇNA bulunan tüplere steril iğne ile

transfer edilmiş bu tüpler 45 °C’de 7 gün inkübe edilmiştir. Saf koloniler elde edilemeyen petrilerden funguslar aynı besiyerlerine tekrar tekrar transfer edilerek saflaştırılmıştır. Bu petrilerde elde edilen saf koloniler de diğerleri gibi yatık PDA, SDA ve MPCNA içeren tüplere transfer edilmiş ve aynı şekilde inkübe edilmiştir. Bu şekilde stoklama işlemi yapılırken her bir izolattan 2 tüpe ekim yapılmış ve içerilerinde saf kolonilerin bulunduğu tüplerden birisi oda sıcaklığında diğeri ise +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

2.2.4. Tek Spor İzolasyonu ve Kùltürlerin Muhafazası

Saflaştırılmış olan fungus kùltürlerinin tanılama ve diğeri aşamalarda kullanacağımız yöntemlerde daha başarılı sonuçlar elde etmek açısından tek spor izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Choi ve ark. 1999).

Tek spor izolasyonunun yapılması için elimizde bulunan küf izolatları steril Czapek Dox agar (CZ)’da 45 °C de 10 gün geliştirilmiştir. Petride gelişen küf izolatlarının üzerine litresinde 1-2 damla Tween 80 bulunan steril saf sudan 2 ml dökülmüştür. Elde edilen spor süspansiyonunun Thoma lamında yoğunluğu saptanmış ve konsantrasyonu 10³ spor/ ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu spor süspansiyonundan mikropipetle 100 µl alınarak içerisinde CZ bulunan petrilere ilave edilmiş ve süspansiyon steril bir baget yardımıyla dağıtılarak 45 °C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Petriler ışık altında direkt gözle veya mikroskopta en küçük büyütmede incelenerek bir tek çimlenmiş sporun bulunduğu bölge işaretlenmiş ve bu bölge steril delici (cork borusu) ile delinerek çıkartılan diskler steril iğne yardımıyla alınarak petri kaplarındaki MPCNA ortamına aktarılmış ve inkübatörde (45 °C) geliştirilmiştir.

Bu petrilerde gelişen koloniler daha sonra kullanılmak üzere, o küf ilk izolasyonda hangi besiyerinde elde edildiyse o besiyerinin bulunduğu yatık ağıar (PDA, SDA veya MPCNA) içeren tüplere transfer edilerek inkübasyondan sonra + 4 °C’de ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Ayrıca elde edilen izolatların daha uzun süreli saklanabilmesi için liyofilizasyon yapılmıştır. Liyofilizasyon yaparken MPCNA ortamında 7 gün geliştirilmiş kùltürler kullanılmıştır. İçerisinde distile su ile hazırlanmış %20’lik steril yağsız süt tozu (skim milk powder) bulunan cryo tüplere, geliştirilmiş olan kùltürlerin özellikle sporlarından steril kürdan yardımıyla bol miktarda konulmuştur. Daha sonra bu tüpler -86 °C

bir gece bekletilerek şok dondurma işlemi gerçekleştirilmiş ve devamında liyofilizatörde yine düşük sıcaklıklarda sublimasyon yoluyla liyofilize olmaları sağlanmıştır. Liyofilize edilen stoklarda + 4 °C’de muhafaza edilmiştir.

2.2.5. Sıcaklık Testleri

Öncelikli amaçlarımız termofilik mikrofungusları izole etmek olduğu için, elimizde bulunan küf izolatlarını her ne kadar 45 °C’ de izole etmiş olsak da termotolerant ve termofilik türleri ayırt etmek için sıcaklık testlerini gerçekleştirilmiştir. Bunun için küf izolatlarının tamamı içerisinde steril SDA besiyeri bulunan petrilere ekilip, 20, 50, 55, 60, 62 °C’deki sıcaklıklara ayarlı inkübatörlerde inkübasyona bırakılmıştır. Bu denemeler yapılırken kontrol amaçlı olarak, ekim yapılmış olan petrilere bir seri de 45 °C’de inkübe edilmiştir.

2.2.6. Biolog Microstation Sistemi ile Karbonhidrat Testlerinin Belirlenmesi

Termofilik oldukları belirlenen izolatlarımızın çeşitli karbon kaynaklarından hangilerini kullanıp kullanmadıklarını belirleyen karbonhidrat testleri biolog microstation sistemi ile belirlenmiştir. Bu testler gerçekleştirilirken funguslar %2’lik malt extract agar (MEA)’da 45 °C’de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra gelişen kolonilerden alınan sporlar biolog FF inokülasyon sıvılarına eklenmiş ve bulanıklık biolog absorbands cihazı ile %75’e ayarlanmıştır. Çok kısa süre içerisinde hazırlanan bu spor süspansiyonları biolog FF MicroPlate’lerine her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde aşılanmıştır. İnokülasyondan sonra mikropaklar 45 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. 24, 48, 72, 96 ıncı saatlerde biolog microstation cihazı ile okumaları yapılmıştır ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Biolog microstation sistemi ile elde edilen veriler NTSYSpc 21 programındaki UPGMA yöntemi ile analiz edilerek türlerin birbirleri ile yakınlık dereceleri karbon kaynaklarını kullanımlarının oluşturduğu profiller açısından değerlendirilmiştir. Sonuçlar aynı program tarafından filogenetik ağaca dönüştürülerek ortaya konulmuştur.

2.2.7. Termofilik Fungusların Geleneksel Yöntemlerle Tanılanması

İzole edilen funguslardan sıcaklık testleri sonucunda termofilik oldukları belirlenen izolatlar geleneksel yöntemlerle tanılama çalışmalarına alınmıştır. Morfolojik karakteristiklerine göre tanılama yapılırken tüm izolatlar MEA, MPÇNA ve SDA ortamına üç nokta şeklinde inokule edilmiş ve nemli bir ortamda 45 °C’de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüm izolatların makroskobik ve mikroskobik incelemelerle termofilik fungus cins ve türlerinden hangisine girdiği belirlenmiştir. Termofilik fungusların teşhisleri ve tanılamaları öncelikle Cooney ve Emerson (1964)’un takip ettiği yol esas alınarak ve Mouchacca (1997), Barnett ve Hunter (1999)’dan da yararlanılarak yapılmıştır. Gelişen kolonilerin tanılanması ve incelemesi yapılırken preparat vasatı olarak Lacto-pamuk mavisi destek çözeltisi kullanılmıştır (Sime ve ark., 2002).

Morfolojik tanılamalar için yapılmış olan değerlendirmelerde göz önüne alınmış olan makroskobik özellikler: Kültürün gelişme derecesi (mm cinsinden), Koloni rengi ve renkteki değişimler ile rengin kültür ortamına nüfuz edip etmediği, koloni tersinin rengi ve renkteki değişimler, çözünür pigmentasyonun var olup olmadığı, hiflerin karakteri, rengi, kültür ortamına sürünüp sürünmediği, havai olup olmadığı, konidia rengi, eksuda oluşup oluşmadığı; Mikroskobik özellikler (ışık mikroskobu ile) ise: konidial gelişim tipleri, konidial şekil ve renk varyasyonları, konidia yerleşim tarzları ve konidial fruktifikasyon tipleri, konidioforların uzunluğu, eni ve yüzey tekstürü, konidia uzunluğu, şekli ve yüzey tekstürü ve eğer varsa eşeyli üreme yapılarının özellikleri’ dir (Barnett ve Hunter, 1999; Cooney ve Emerson, 1964; Mouchacca, 1997).

2.2.8. Termofilik Fungusların Moleküler Tanılanması

2.2.8.1. DNA İzolasyonu

Termofilik fungusların DNA’ları moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere cam boncuk ve vortekslleme yöntemi (Van Burik ve ark., 1998, Janso ve ark., 2005) modifiye edilerek izole edilmiştir. Elde edilen DNA örneklerinin 3 µl’si, 1 kb marker (Directload 1 kb DNA ladder, Sigma) eşliğinde, 6X’lik yükleme boyası ile % 5 gelred nükleik asit jel boyası (Condalab) içeren % 1’lik

agaroz jele yüklenmiştir ve 1X TAE tamponunda 95 V'da 50 dk. yürütülmüştür. Agaroz jel 50 dk.'nın sonunda UV transilluminatörde (Uvitec M02 4611) incelenerek görüntülenmiştir. Elde edilen DNA örnekleri -20 °C'de saklanmıştır.

DNA izolasyon protokolü

1. Temiz ependorfa 400 µl Lizis tamponu alınmıştır.
2. Yeast potato soluble starch agarda 45 °C'de geliştirilen 7 günlük kültürden bir miktar örnek steril koşullarda ependorfa aktarılmıştır.
3. 5 dakika pipetlenerek homojenize edilmiştir.
4. Üzerine 400 µl fenol-kloroform- izoamil alkol (24:25:1, h:h:h) (PCI) konulmuştur ve cam boncuk ilave edilmiştir.
5. 30 dk. Vortekslenerek boncukla parçalama işlemi yapılmıştır.
6. 13000 rpm'de 5 dk. Santrifüj edilmiştir.
7. Süpernatant yeni bir ependorfa alınmıştır.
8. Ependorfdaki hacme eşit hacimde PCI ilave edilmiştir.
9. 5 dk. Ependorf hafifçe sallanarak karışma sağlanmıştır. 13000 rpm'de 5 dk. Santrifüj edilmiştir.
10. Süpernatant yeni bir ependorfa alınmıştır. 8 ve 9. Adımlar süpernatant berrak hale gelinceye kadar tekrarlanmıştır.
11. Örnek hacminin 0,1 hacmi kadar 3M Sodyum asetat, 2 hacim soğuk saf ethanol ilave edilmiştir ve yavaşça karıştırılmıştır.
12. -20 °C'de 30 dk. bekletilmiştir.
13. 10 dk. 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
14. Süpernatant uzaklaştırılmıştır.
15. Dipte kalan pellet 200 µl distile suda (DNaz, RNaz içermeyen) yavaşça çözülmüştür.
16. Örnek hacminin 0,1 hacmi kadar 0.3M Sodyum asetat, 2 hacim soğuk saf ethanol ilave edilmiş ve yavaşça karıştırılmıştır.
17. Tekrar -20 °C'de 30 dk. bekletilmiştir.
18. 10 dk. 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
19. Süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan pellet beklenen DNA konsantrasyonuna bağlı olarak 30-50 µl distile suda (DNaz, RNaz içermeyen) çözülmüştür.

İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları NanoDrop ND-1000 Spectrophotometre kullanılarak belirlenmiştir.

2.2.8.2. Moleküler Tanılamada Kullanılacak Gen Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonları

Termofilik izolatlar, fungusların tür düzeyinde tanılanması için en güvenilir bölge olarak ribozomal genlerin içsel transkribe edilen aralıkları (ITS)'nı çoğaltmak amacı ile ITS1 ve ITS4 primerleri (Tablo 2.5) kullanılarak PCR amplifikasyonları yapılmıştır. Nüklear ribozomal ITS1-5.8S-ITS2 bölgesinin amplifikasyonu için 1 µl (50 ng) genomik DNA, 1 µl 2,5 µM ITS1, 1 µl 2,5 µM ITS4, 2,5 µl 10X PCR tamponu +KCl – MgCl₂ (Fermentas), 2,5 µl 25 mM MgCl₂ (Fermentas), 2 µl 2,5 mM deoksinükleotidtrifosfatlar karışımı (dNTPmix; dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,1 µl 5 U/ µl Taq DNA polimeraz (Fermentas), ve 14,9 µl steril DNaz/RNaz içermeyen su içeren 25 µl'lik reaksiyon kullanılmıştır. Amplifikasyon 95 °C'de 2 dk. başlangıç denatürasyonunu takiben 95 °C'de 1 dk. denatürasyon, 55 °C'de 45 sn. annealing, 72 °C'de 30 sn. uzamadan oluşan toplam 35 siklusu takiben 72 °C'de 5 dk. son uzamanın gerçekleştirilmesi ile yapılmıştır (Samson ve ark., 2010).

Ayrıca termofilik türlerin ITS1-5.8S-ITS2 bölgesinin amplifikasyonuna ek olarak, tür düzeyinde tanılamamanın tam olarak gerçekleştirilmesi için rDNA (26–28S)'nin büyük alt ünitesinin yüksek değişken D1/D2 bölgesi LR0R ve LR3 primerlerinin (Tablo 2.6) kullanılması ile çoğaltılarak polifazik taksonomiye başvurulmuştur (Sharma ve ark., 2008). Yüksek değişken D1/D2 bölgesinin amplifikasyonu için 1 µl (50 ng) genomik DNA, 1 µl 2,5 µM primerler, 2,5 µl 10X PCR tamponu +KCl – MgCl₂ (Fermentas), 2,5 µl 25 mM MgCl₂ (Fermentas), 2 µl 2,5 mM dNTPmix, 0,25 µl 5 U/ µl Taq DNA polimeraz (Fermentas), 1,25 µl dimetil sülfoksit (DMSO) ve 13,5 µl steril DNaz/RNaz içermeyen su içeren 25 µl'lik reaksiyon kullanılmıştır. Amplifikasyon, 95 °C'de 4 dk. başlangıç denatürasyonunu takiben 94 °C'de 1 dk. denatürasyon, 51 °C'de 60 sn. annealing, 72 °C'de 1 dk. uzamadan oluşan toplam 30 siklusu takiben 72 °C'de 10 dk. son uzamanın gerçekleştirilmesi ile yapılmıştır (Sharma ve ark., 2008).

Tüm PCR reaksiyonları Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler, Techne Thecgene ve Techne TV-5000 Thermal Cycler cihazları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon sonucunda elde edilen PCR ürünleri % 5

gelred nükleik asit jel boyası (Condalab) içeren %1 agaroz jel ortamına 6X'lik yükleme boyası kullanılarak yüklenmiş ve 1kb marker (Directload 1 kb DNA ladder, Sigma) eşliğinde, 1X TAE tamponunda 95 V'da 50 dk. yürütülmüştür. Agaroz jel 50 dk.'nın sonunda UV transilluminatörde (Uvitec M02 4611) incelenerek görüntülenmiştir.

Tablo 2.6. Türlerin tanılanmasında kullanılan primerler

Primer adı	Baz dizisi (5'- 3')	Bölge	Ürün boyutu	Kaynak
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS1-5.8S-ITS2	570 bp	White ve ark., 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
LROR	ACCCGCTGAACTTAAGC	D1/D2	550bp	Sharma ve ark., 2008
LR3	CCGTGTTTCAAGACGGG			

2.2.8.3. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR ürünlerinin saflaştırılması Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, formerly Amersham Biosciences, 28-9034-71) kullanılarak, kit kullanım klavuzuna uygun olarak yapılmıştır. Saflaştırma işleminde kullanılmak üzere, PCR reaksiyon ürünlerinin tamamı %1'lik agaroz jel ortamında UV transilluminatörde gözlenerek, saflaştırılması istenen band bistüri yardımı ile kesilerek jel blokları halinde ayrılmıştır. PCR ürününü içeren agaroz jel blokları temiz bir ependorfa aktarılıp tartılmış ve her bir 10 mg blok için 10 µl tip 3 bağlanma tamponu ilave edilmiştir. Ters düz edilerek karıştırıldıktan sonra 60 °C'lik su banyosunda agaroz blokları eriyip, tampon rengi sarı veya açık turuncu oluncaya kadar bekletilmiştir. Agaroz blokları eridikten sonra, 600 µl örnek- tip 3 bağlanma tamponu toplama tüpleri üzerine yerleştirilmiş olan GFX mikrospinkolonlara aktararak 60 sn. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda 16.000g'de 30 sn. santrifüj edilerek toplama tüpünde toplanan sıvı atılmıştır. Bu işlem her örnek için örnek- tip 3 bağlanma tamponu bitinceye kadar tekrar edilmiştir. Bağlanma işlemi sonrasında GFX mikrospinkolonlara 500 µl tip

1 yıkama tamponu konulmuştur ve 16.000g'de 30 sn. santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonrasında toplama tüpü atılarak GFX mikrospin kolonlar 1,5 µl'lik DNaz içermeyen temiz ependorflar üzerine yerleştirilmiştir. Kolonlar üzerine 30 µl tip 6 elüsyon tamponu ilave edilerek 60 sn. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekleme işlemi sonrasında 16.000g'de 60 sn. santrifüj edilerek saf PCR ürünlerinin ependorf tüplerine alınması sağlanmıştır.

Saflaştırma ürünün kalitesi % 5 gelred nükleik asit jel boyası (Condalab) içeren % 1 agaroz jel ortamında 6X'lik yükleme boyası kullanılarak yüklenmiş ve 1kb marker eşliğinde, 1X TAE tamponunda 95 V'da 50 dk. yürütülmüştür. Agaroz jel 50 dk.'nın sonunda UV transilluminatörde (Uvitec M02 4611) incelenmiştir. Saflaştırılmış olan PCR ürünleri -20 °C' saklanmıştır.

2.2.8.4. Dizi Analizi

Dizi analizi gerçekleştirilecek her bir örnek için 10 µl hacimde PCR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Bu reaksiyonlar 2 µl (~16 ng) ilgili gen bölgesinin saflaştırılmış PCR ürünü, 0,65 µl 2,5 µM primerler (ITS4, LR3) (çizelge 2.5), 6µl GenomeLab DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter) ve 1,35 µl nükleazsız su kullanılarak hazırlanmıştır. PCR reaksiyonu, 96 °C'de 20 sn., 50 °C'de 20 sn. ve 60 °C'de 4 dk.'dan oluşan toplam 40 döngüden oluşan koşullarda gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri dizi analizinde kullanılmak üzere, amplifikasyon sonrasında bağlanmamış primerlerden ve işaretli dNTP'lerden Agencort Clean SEQ (Beckman Coulter) kiti kullanılarak magnetik boncuk yöntemi ile saflaştırılmıştır. Bunun için 10 µl'lik reaksiyon hacmine sahip olan her bir örneğe 5,5 µl stop solüsyonu [25 µl nükleazsız su, 10 µl 3M sodyum asetat pH 5,2, 10 µl 100 mM EDTA ve 5 µl 20 mg/ml glikojen (GenomeLab DTCS Quick Start Kiti içerisinde mevcuttur)], PCR reaksiyon hacmi kadar (10 µl) vortekslenmiş Agencort Clean SEQ magnetik boncuk ve 55 µl %73'lük izopropanol (Sigma I9516) ilave edilerek homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Örnekler 10 dk. Oda sıcaklığında bekletildikten sonra magnet üzerine yerleştirilmiştir. 5 dk. bekletilen örneklerden süpernatant pipetlenerek atılmıştır. Sonrasında örnekler üzerine 200 µl %73'lük izopropanol ilave edilip 3 dk. bekletilerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi iki kere daha tekrar edildikten sonra örneklerin 10-20 dk. oda sıcaklığında kurumaları

sağlanmıştır. Tamamen kuruyan örneklerin üzerine 40 µl örnek yükleme solüsyonu (SLS, GenomeLab DTCS Quick Start Kiti içerisinde mevcuttur) ilave edilip çözülmüş ve 5 dk magnet üzerinde bekletilmiştir. Oluşan süpernatantın 35 µl'si 96 kuyucuklu platelere aktarılıp buharlaşmayı önlemek için üzerlerine 1'er damla mineral yağ (GenomeLab DTCS Quick Start Kiti içerisinde mevcuttur) damlatılmıştır ve ayırma tamponu (GenomeLab Sequencing Separation Buffer, Beckman Coulter) içeren ikinci bir plate ile birlikte kapiller sisteme verilmiştir.

Saf halde elde edilerek kapiler sisteme verilmiş olan ITS1-5.8S-ITS2, rDNA (26–28S)'nın büyük alt ünitesinin yüksek değişken D1/D2 bölgeleri Beckman Coulter CEQ 8000 Genetic Analysis sistemde dizilenmiştir.

2.2.8.5. Dizilenen Gen Bölgelerinin Analizi

İncelenen izolatlara ait ITS1-5.8S-ITS2, yüksek değişken D1/D2 bölgelerinin elde edilen dizi bilgileri NCBI “National Centre for Biotechnology Information”, (www.ncbi.nlm.nih.gov) gen bankasındaki verilerle BLAST (Altschul ve ark., 1997) programı ile değerlendirilerek filogenetik benzerlik gösterdiği türler belirlenmiştir. Her bir veri MEGA v. 5.0 (Tamura ve ark., 2011) programındaki ClustalW kullanılarak hizalanmıştır. İncelenen izolatlar ve NCBI gen bankasındaki en yakın karşılıklarına ait evrimsel gelişim süreci MEGA v. 5.0 programındaki Tamura-Nei modeline (Tamura ve Nei, 1993) dayalı olarak Neighbor Joining (NJ) (Satiou ve Nei, 1987) yöntemi ile incelenmiştir. Oluşan dalların istatistiksel olarak doğruluğu “bootstrap” analizi ile 1000 kez örnekleme yapılarak belirlenmiştir.

2.2.9. Fitaz Enzimi Üreten Türlerin Kültürel Ortamlarda Belirlenmesi

İzolatlar, karbon kaynağı olarak kalsiyum fitat içeren fitaz tarama ortamında (PSM) fitaz üretimi açısından taranmıştır. Bu taramalar yapılırken funguslar PSM ortamına steril koşullarda tek nokta şeklinde ekilmiş ve 45 °C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrasında fitaz enzimi üreten funguslar, kalsiyum fitatı parçalamaları sonucu besiyerindeki beyaz rengin kaybolması ile oluşan kolonileri etrafındaki şeffaf zon ile ayırt edilmişlerdir (Gulati ve ark., 2007, Chen, 1998).

2.2.10. Katı Faz Fermentasyonu (KFF) Yoluyla Fitaz Üretimi

2.2.10.1. Aşı Kültürün Hazırlanması

50 ml'lik hacimlerde 100 ml'lik duran şişelerde hazırlanmış olan steril glukoz ortamı son spor konsantrasyonu 4×10^8 olacak şekilde, fungusun 10^{10} konsantrasyonda hazırlanmış spor süspansiyonundan 2 ml eklenerek inokule edilmiştir. Ortam 45°C ve 125 rpm'de 48 saat inkübe edilmiştir.

2.2.10.2. Katı Faz Fermentasyon

Katı faz kültürü, karbon kaynağı olarak 5 g buğday kepeği ve 10 ml PSM tuzu solüsyonu içeren 250 ml'lik küçük cam erlenlerde yapılmıştır. Üretim ortamı, glukoz ortamı üzerinde geliştirilmiş olan 48 saatlik kültürün 1 ml si aşılınıp; su içeren bir atmosferde 45°C 'de 7 gün inkübe edilmiştir (Gluati ve ark.2007).

2.2.10.3. Fitaz Enziminin Ekstraksiyonu

Erlen içerisindeki ürün, erlene 50 ml sodyum asetat tamponu (0,2 M, pH 5,5) eklenip, şişenin 45°C ve 85 rpm'de 1 saat hafif çalkalanmasıyla ekstrakte edilmiştir. Fermentasyon karışımı çift katlı tül kumaştan süzildükten sonra $11,000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant fitaz aktivite çalışmaları için kullanılmıştır (Gluati ve ark.2007).

2.2.10.4. Fitaz Aktivitesinin Belirlenmesi için Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Enzim aktivitesinin belirlenmesi için $10\mu\text{g/ml}$ ile $35\mu\text{g/ml}$ arasında değişen KH_2PO_4 çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiden 1 hacim alınıp, 9 hacim $1,0\text{ M H}_2\text{SO}_4$ -% 10 askorbik asit-%2,5 amonyum molibdat (3:1:0.1) karışımından üzerine eklenmiştir. Bu karışım renk değişimi için 50°C 'de 20 dakika inkübe edildikten sonra, absorbans spektrofotometre (SpectraMax M2 Multi-Mode Microplate Reader) aracılığıyla 820 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Fosfor konsantrasyonuna ($\mu\text{g/ml}$) karşı okunan absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir.

2.2.10.5. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi, sodyum asetat tamponu (0,2 M, pH 5,5) içinde hazırlanmış sodyum fitat (0,5g/100ml) içeren reaksiyon karışımı ve uygun şekilde seyreltilmiş enzimle ölçülmüştür. Reaksiyon 50 °C’de 30 dakika inkübasyondan sonra eşit hacimde %15’lik trikloroasetik asit eklenerek durdurulmuştur. Serbest fosfat iyonları, deney karışımının 20 μl sine 1,0 M H_2SO_4 -% 10 askorbik asit-%2,5 amonyum molibdat (3:1:0.1) karışımından 180 μl karıştırılarak belirlenmiştir. Bu karışım 50 °C’de 20 dakika inkübe edildikten sonra, absorbans spektrofotometre (SpectraMax M2 Multi-Mode Microplate Reader) aracılığıyla 820 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Hassouni ve ark. 2006, Gluati ve ark. 2007) ve aşağıda verilen formül yardımı ile fitaz aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\text{Enzim aktivitesi } (\mu\text{mol/ml/dk}) = \frac{W \times V \times D}{V_E \times T \times M}$$

W: Açığa çıkan fosfat miktarı (OD820/ Standart grafikten elde edilen eğim, $\mu\text{g/ml}$),

V_E : Enzim hacmi (μl),

V: Reaksiyon çözeltisi hacmi (μl),

T: Reaksiyon süresi (dk),

M: Fosfor’un atom ağırlığı (30,974 $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$)

D: Dilüsyon faktörü

1 Unit fitaz aktivitesi, 1 dakikada, 50 °C ve pH 5,5’de 1 μmol inorganik fosfatı açığa çıkarmak için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

2.2.11. KFF Ortamında En İyi Fitaz Aktivitesine Sahip Türün Belirlenmesi

İzolatlar, karbon kaynağı olarak kalsiyum fitat içeren fitaz tarama ortamında (PSM) fitaz üretimi açısından taranmıştır. Taramalar sonucunda izolatların PSM ortamında oluşturdukları zonlar değerlendirilerek yapılan

seçimler doğrultusunda en büyük Şeffaf zonu oluşturan beş izolat KFF üretimine alınmıştır. KFF, karbon kaynağı olarak 5 g buğday kepeği ve 10 ml PSM tuzu solüsyonu içeren 250 ml'lik cam erlende yapılmış ve erlenler nemli bir atmosferde 45  C'de 7 gün inkübe edilmiŐtır. Erlen içerisindeki ürün, erlene 50 ml sodyum asetat tamponu (0,2 M, pH 5,5) eklenip, Şişenin 45  C ve 85 rpm'de 1 saat çalkalanmasıyla ekstrakte edilmiŐtır. Fermentasyon karışımı çift katlı t l kumaştan s z ld kten sonra 11,000x g'de 10 dakika santrif jlenerek elde edilen süpernatant ham enzim ekstraktı olarak izolatların fitaz aktivitelerinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Her bir türün fitaz aktivitesi belirlendikten sonra en iyi aktivite gösteren tür seilmiŐtır (Hassouni ve ark. 2006, Gluati ve ark. 2007).

2.2.12. Fitaz Geninin Varlığının Moleküler Tekniklerle Taranması

Bu aşamada, kültürel ortamda fitaz ürettiği belirlenen türler arasından katı faz fermentasyon ile fitaz üretimi için seçilen izolatın fitaz enzimini üretmekten sorumlu gen bölgesinin bu bölgeye özel primerler ile pozitif amplifikasyon oluŐurmaları sağlanmıştır. Ve elde edilen PCR ürününün dizi analizi yoluyla fitaz enzimine ait olup olmadığı belirlenmiŐtır.

Fitaz genini çoğaltmak amacı ile UP (5'-ATGGCATTATTGACGGCCT-3') ve DP (5'-TCAAAAGCAGCGATCCCA-3') primerleri kullanarak PCR amplifikasyonu yapılmıştır. Fitaz geninin amplifikasyonu için 0,5  l (50 ng) genomik DNA, 0,5  l 10  M primerler, 2,5  l 10X PCR tamponu + KCl – MgCl₂ (Fermentas), 2,5  l 25 mM MgCl₂ (Fermentas), 1  l 10 mM dNTPmix, 0,2  l 5 U/  l Taq DNA polimeraz (Fermentas), ve 17,3  l steril DNaz/RNaz içermeyen su içeren 25  l'lik reaksiyon kullanılmıştır. Amplifikasyon 94  C'de 4 dk. başlangıç denatürasyonunu takiben 95  C'de 30 sn. denatürasyon, 55  C'de 30 sn. annealing, 72  C'de 60 sn. uzamadan oluşan toplam 30 siklusu takiben 72  C'de 10 dk. son uzamanın gerçekleştirilmesi ile yapılmıştır (Balasubramanian ve Palanivelu, 2011).

Amplifikasyon sonucunda elde edilen PCR  r nleri % 5 gelred nükleik asit jel boyası (Condalab) içeren %1 agaroz jel ortamına 6X'lik yükleme boyası kullanarak yüklenmiş ve 1kb marker (Directload 1 kb DNA ladder, Sigma) eşliğinde, 1X TAE tamponunda 95 V'da 50 dk. yürütülmüştür. Agaroz jel 50

dk.'nın sonunda UV transilluminatörde (Uvitec M02 4611) incelenerek görüntülenmiştir.

Bu aşamadan sonra gerçekleştirilen PCR ürünlerinin saflaştırılması, dizi analizi ve elde edilen dizilerin değerlendirilmesi daha önce anlatıldığı şekilde uygulanmıştır. Ancak blast çalışmalarında www.genome.fungalgenomics.ca internet sitesinden faydalanılmıştır. Dizi analizi için gerçekleştirilen PCR reaksiyonunda DP primeri kullanılmıştır.

2.2.13. Üretim Koşullarının KFF'de Üretilen *Thermomyces lanuginosus*'un Fitaz Sentezi Üzerine Etkisi

KFF'de fungustan enzim üretiminde uygun substrat, başlangıç nem düzeyi, inokulum miktarı, üretim süresi, inkübasyon sıcaklığı, başlangıç pH, aşı kültürün yaşı ve havalandırma alanı optimize edilmesi gereken önemli parametrelerdir. Üretim koşullarının optimize edilmesi amacı ile bu parametrelerin etkileri incelenmiştir.

2.2.13.1. Klasik Yöntemle Optimizasyon

KFF'de fungustan enzim üretiminde substrat türü, başlangıç nem düzeyi, inokulum miktarı ve üretim süresi; her bir parametrenin birbirinden bağımsız olarak test edilmesi ile optimize edilmiştir. Optimize edilmiş olan parametre bir sonraki deneyde optimum değerinde sabit tutulmuştur. Tüm deneyler çift paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.13.1.1. Uygun Substrat Seçimi

Thermomyces lanuginosus'dan enzim üretiminde en uygun substratı belirlemek için KFF'de buğday kepeği, pirinç kepeği, yulaf kepeği, çavdar kepeği, arpa kepeği, bonkalit, öğütülmüş ayçiçeği sapı ve öğütülmüş fındık kabuğu substrat olarak kullanılmıştır. Her bir substrat 5 g tartılarak 250 ml'lik Erlen mayer'lere konulmuştur ve otoklavda 121 °C'de 15 dk. steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında erlenlere 10 ml steril PSM tuzu solüsyonundan ilave edilmiştir. Üretim ortamı, glukoz ortamı üzerinde geliştirilmiş olan 48 saatlik

kültürün 1 ml si aşılınıp; su içeren bir atmosferde 45 °C’de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde, erlen içerisindeki ürün, erlene 50 ml sodyum asetat tamponu (0,2 M, pH 5,5) eklenip, şişenin 45 °C ve 85 rpm’de 1 saat çalkalanmasıyla ekstrakte edilmiştir. Fermentasyon karışımı çift katlı tül kumaştan süzöldükten sonra 11,000x g’de 10 dakika santriföjlenerek elde edilen süpernatant ham enzim ekstraktı olarak fitaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Maksimum enzim aktivitesinin elde edildiğı substrat daha sonraki çalışmalarda KFF için kullanılmak üzere seçilmiştir.

2.2.13.1.2. Başlangıç Nem Düzeyinin Etkisi

Substrat olarak pirinç kepeğı kullanılmıştır. Pirinç kepeğı 80 °C’ de 24 saat kurutulduktan sonra 5’er gr tartılarak 250 ml’lik Erlen mayerlere konulmuştur. Ortamların başlangıç nem düzeyleri distile su ile % 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 (v/w) olarak ayarlanmış ve otoklavda 121 °C’de 15 dk. steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında erlenlere 10 ml steril PSM tuzu solüsyonundan ilave edilmiş ve ortam, 48 saatlik *Thermomyces lanuginosus* kültürünün 1ml si aşılınarak; su içeren bir atmosferde 45 °C’de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında ekstraksiyon daha önceki adımlarda anlatıldığı şekilde gerçekleştirilerek ham enzim elde edilmiştir. En yüksek enzim aktivitesinin elde edildiğı nem düzeyi optimum olarak belirlenmiştir.

2.2.13.1.3. İnokulum Miktarının Etkisi

İnokulum miktarını optimize etmek için inokulant; 50 ml’lik hacimlerde 100 ml’lik Duran şişelerde hazırlanmış olan steril glukoz ortamı son spor konsantrasyonu 4×10^8 olacak şekilde, fungusun 10^{10} konsantrasyonda hazırlanmış spor süspansiyonundan 2 ml eklenerek, 45 °C ve 125 rpm’de 48 saat inkübasyonuyla hazırlanmıştır. İnokulant miktarları % 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 (v/w) olarak ayarlanmıştır. Substrat olarak pirinç kepeğinin kullanıldığı KFF’de ortamın başlangıç nem düzeyi % 70 olarak ayarlanmıştır. Enzim üretiminde diğer koşullar ve ekstarksiyon daha önce tarif edildiğı şekilde gerçekleştirilmiştir. Maksimum enzim aktivitesinin elde edildiğı inokulum miktarı optimum olarak saptanmıştır.

2.2.13.1.4. Üretim Süresinin Optimizasyonu

Thermomyces lanuginosus'un maksimum enzim sentezlediği üretim süresini bulmak için 4. günden itibaren 5, 6, 7, 8, 9, 12, 20. günlerde enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır. Ve enzim aktivitesinin düşüşe geçmesinden önceki gün optimum üretim süresi olarak belirlenmiştir. Üretim gerçekleştirilirken, besiyerlerinde pirinç kepeği kullanılmış ve başlangıç nemi % 70 olarak ayarlanmıştır. Üretim ortamı, glukoz ortamı üzerinde geliştirilmiş olan 48 saatlik kültürün 2 ml (% 40)' si aşılıp; su içeren bir atmosferde 45 °C'de inkübe edilmiştir.

2.2.13.2. Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) ile Optimizasyon

CYY'nin Merkezi Bileşke Tasarımı (CCD: Central composite design) fitaz üretimini etkileyen dört parametrenin optimum seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu parametreler: inkübasyon sıcaklığı (T), başlangıç pH (pH), havalandırma alanı (H) ve aşı kültürün yaşı (Y) dir. Bu yöntemle dört bağımsız değişkenin beş farklı seviyesi ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$) çalışılmıştır. Bütün değişkenlerin merkezi kodlanmış değeri 0 olarak alınmıştır. Çalışılan değişkenlerin minimum ve maksimum değerleri Tablo 2.7'de, gerçekleştirilen 31 deney Tablo 2.8'de verilmiştir. Deney tasarımının gerçekleştirilmesinde ve analizinde Minitab 16 istatistiksel yazılımı kullanılmıştır. CYY ile optimizasyon deneylerinde üretim gerçekleştirilirken, besiyerlerinde pirinç kepeği kullanılmış ve başlangıç nemi % 70 olarak ayarlanmıştır. Üretim ortamı, glukoz ortamı üzerinde geliştirilmiş olan 48 saatlik kültürün 2 ml (% 40)' si aşılıp; su içeren bir atmosferde 7 gün inkübe edilmiştir. Fitaz enzimi ekstraksiyonu önceden belirtilen şekilde gerçekleştirilmiş ve ham enzim ekstresi cevabın (fitaz aktivitesi) belirlenmesinde kullanılmıştır.

Deneylerin tamamlanmasından sonra, ortalama maksimum fitaz biyosentez verimi cevap (y) olarak kullanılmıştır. Verilerin çoklu regresyon (ilişki yoklaması) analizi, bağımsız değişkenler ile ölçülen cevap ilişkisinin empirik (deneysel) modelini elde etmek için yapılmıştır. Dört faktörlü sistemin ikinci dereceden polinom eşitliği:

$$y = \beta_0 + \beta_1 T + \beta_2 pH + \beta_3 H + \beta_4 Y + \beta_{11} T^2 + \beta_{22} pH^2 + \beta_{33} H^2 + \beta_{44} Y^2 + \beta_{12} TpH + \beta_{23} pHH + \beta_{34} HY + \beta_{13} TH + \beta_{14} TY + \beta_{24} pHY$$

Bu eşitlikte, y öngörülen cevap (fitaz aktivitesi), β_0 sabit, $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$ doğrusal katsayılar, $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{44}$ kare katsayılar, $\beta_{12}, \beta_{23}, \beta_{34}, \beta_{13}, \beta_{14}, \beta_{24}$ etkileşim katsayıları ve $T, pH, H, Y, T^2, pH^2, H^2, Y^2, TpH, pHH, HY, TH, TY, pHY$ bağımsız değişkenlerin seviyeleri dir. Maksimum fitaz üretimi için değişkenlerin optimum seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan cevap yüzey grafikleri Statistica 8 istatistiksel yazılımıyla çizilmiştir.

Tablo 2.7. Dört Bağımsız Değişkenin CYY’de Kullanılan Farklı Değerleri

Kod	Bağımsız değişkenler	Seviyeler				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
T	inkübasyon sıcaklığı ($^{\circ}C$)	35,28	40,00	47,50	55,00	59,73
pH	başlangıç pH	2,24	3,50	5,50	7,50	8,76
H	havalandırma alanı (%)	3,70	10,00	20,00	30,00	36,30
Y	aşı kültürün yaşı (gün)	1,37	2,00	3,00	4,00	4,63

2.2.13.2.1. Deneysel Modelin Doğrulanması

İstatistiksel model, fitaz üretiminin model tarafından tahmin edilen optimum koşullar doğrultusunda gerçekleştirilmesi ile doğrulanmıştır. Gerçekleştirilen fermentasyonda başlangıç pH 7,5, havalandırma alanı % 30 olarak ayarlanmış ve 5 günlük aş kültür kullanılmıştır. KFF’da diğer koşullar daha önce optimize edildikleri şekilde uygulanmış ve $55^{\circ}C$ ’de 7 gün inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Fitaz enzimi ekstraksiyonu önceden belirtilen şekilde gerçekleştirilmiş ve ham enzim ekstresi aktivite tayininde kullanılmıştır.

Tablo 2.8. CYY ile Fitaz Üretiminin Optimizasyonunda Kullanılan Deney Planı

Deney akışı	T	pH	H	Y
1	47,50	5,50	20,0	3,00
2	47,50	5,50	20,0	3,00
3	47,50	5,50	20,0	3,00
4	47,50	5,50	20,0	3,00
5	47,50	5,50	20,0	4,63
6	55,00	7,50	30,0	4,00
7	55,00	7,50	10,0	4,00
8	55,00	7,50	10,0	2,00
9	55,00	7,50	30,0	2,00
10	55,00	3,50	10,0	4,00
11	59,73	5,50	20,0	3,00
12	47,50	5,50	20,0	3,00
13	40,00	7,50	10,0	2,00
14	35,28	5,50	20,0	3,00
15	40,00	3,50	30,0	4,00
16	40,00	7,50	30,0	4,00
17	40,00	7,50	30,0	2,00
18	40,00	3,50	10,0	4,00
19	40,00	7,50	10,0	4,00
20	47,50	8,76	20,0	3,00
21	47,50	5,50	20,0	3,00
22	47,50	2,24	20,0	3,00
23	55,00	3,50	30,0	4,00
24	55,00	3,50	30,0	2,00
25	47,50	5,50	36,3	3,00
26	47,50	5,50	20,0	3,00
27	40,00	3,50	30,0	2,00
28	47,50	5,50	20,0	1,37
29	47,50	5,50	3,7	3,00
30	55,00	3,50	10,0	2,00
31	40,00	3,50	10,0	2,00

2.2.13.3. Katkı Maddelerinin Etkisi

KFF ile pirinç kepeğinde gerçekleştirilen fitaz üretim ortamına çeşitli katkı maddelerinin ilavesinin etkileri belirlenmiştir. Fermentasyon gerçekleştirilirken her denemede ortama yalnızca bir katkı maddesi belirlenen oranda ilave edilmiş ve diğer parametreler optimum koşullarda sabit tutulmuştur. Gerçekleştirilen fermentasyonlarda, 50 ml'lik erlen mayerlere 6 g pirinç kepeği konmuş ve başlangıç nem düzeyi 4,2 ml distile su ilave edilerek %70'e ayarlanmıştır. Erlenler 121 °C ve 1,5 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Steril ortam daha sonra pH'sı 7,5'a ayarlanmış steril PSM tuzu solüsyonundan 12 ml ilave edilerek inokulasyona hazır hale getirilmiştir. Üretim ortamı, glukoz ortamı üzerinde

geliştirilmiş olan 5 günlük aşı kültürden 2,4 ml aşılansak; su içeren bir atmosferde 55 °C’de 7 gün inkübe edilmiştir. Deneyler sonucunda elde edilen fitaz aktivitelerinin karşılaştırılabilmesi için hiçbir katkı maddesinin ilave edilmediği bir kontrol fermentasyonu da gerçekleştirilmiştir. Tüm deneyler iki paralel olacak şekilde yapılmıştır. Üretim sonrasında fitaz enzimi ekstraksiyonu önceden belirtilen şekilde gerçekleştirilmiş ve ham enzim ekstresi aktivite tayininde kullanılmıştır.

İncelenen katkı maddeleri:

➤ Karbon kaynakları

Karbon kaynağı olarak glukoz, maltoz, sükroz, mısır unu kullanılmıştır. Her bir karbon kaynağından ortama %1 oranında ilave edilmiştir.

➤ Azot kaynakları

Azot kaynağı olarak üre, maya ekstraktı, tripton, triptik soy, pepton, nutrient broth, yağsız süt tozu, kasaminoasit, soya unu, malt ekstrakt, NH_4NO_3 kullanılmıştır. Her bir azot kaynağından ortama %1 oranında ilave edilmiştir.

➤ Metal tuzları

Kullanılan metal tuzları CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 , CuSO_4 , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, ZnSO_4 , NaNO_3 dır. Her bir metal tuzunun ortamdaki son konsantrasyonu 2,5 mM olacak şekilde ilave edilmiştir.

➤ Yüzey aktif maddeler

Tween 20, Tween 80, Triton X-100 deneyde kullanılan yüzey aktif maddelerdir. Bu maddelerin her birinin ortamdaki konsantrasyonu % 0,5 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Ayrıca fermentasyon ortamındaki konsantrasyonları 0,4 mM olacak şekilde sodyum dodesil sülfat (SDS) ve etilendiamintetraasetik asit’in (EDTA) de katkı maddesi olarak KFF’ye etkileri denenmiştir.

2.2.14. Optimum Aktiviteden Spesifik Aktivite Hesabı

Bir miligram proteinde bulunan enzim ünite sayısı spesifik aktivite olarak kabul edilmektedir ve spesifik aktivite ünite/mg protein olarak kabul belirtilmektedir (Bailey ve Ollis, 1977). Buna göre optimum koşullarda elde edilmiş olan fitaz aktivitesinden spesifik fitaz aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır;

$$\text{Spesifik aktivite (U/mg)} = \frac{\text{aktivite (U/ml/dk)}}{\text{protein miktarı(mg/ml)}}$$

Spesifik aktivitenin hesaplanmasında kullanılan ham ekstredeki protein miktarı ise bradford yöntemi ile aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

2.2.14.1. Protein Konsantrasyonlarının Bradford Yöntemi ile Belirlenmesi

Protein derişimi bilinmeyen enzim ekstaktları Bradford reaktifi ile muamele edilerek, köre karşı hazırlanan çözeltinin absorbansı oda sıcaklığında spektrofotometre (SpectraMax M2 Multi-Mode Microplate Reader) aracılığıyla okunmuştur. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış standart protein çözeltileri (BSA) de reaktif ile muamele edilerek absorbans değerleri ölçülmüş ve ölçüm sonuçları kullanılarak absorbansa karşı derişimden oluşan standart grafiğı çizilmiştir. Elde edilen grafikten oluşturulan denklem yoluyla derişimi bilinmeyen çözeltinin protein miktarı hesaplanmıştır.

Protein Standartlarının oluşturulması için 1000-250 µg/ml konsantrasyonda hazırlanmış Bovin Serum Albümin (BSA, Sigma) kullanılmıştır. Çözücü olarak ise sodyum asetat tamponu (0,2 M, pH 5,5) kullanılmıştır. Çözücü ile belli oranlarda karıştırılarak hazırlanan standartlar +4 °C’ de saklanmıştır. BSA standart örneklerinin ve enzim ekstraktlarının absorbans değerleri spektrofotometre kullanılarak aşağıda belirtildiğı şekilde ölçülmüştür:

200 µl Bradford boya çözeltisine, standart ve protein miktarı bilinmeyen örneklerden 4 µl ilave edilmiş ve pipetlenerek karıştırıldıktan sonra rengin stabilize olması için yaklaşık 20 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra 595 nm’de köre karşı absorbans değerleri ölçülmüştür.

2.2.15. SDS-PAGE Yöntemi ile Enzimin Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi

Fitaz enziminin moleküler ağırlığının saptanması amacıyla %10'luk SDS-PAGE ve boyanmamış protein moleküler ağırlık markırı (14,4- 18,4- 25,0- 35,0- 45,0- 66,0- 116,0 kDa; Thermo scientific) kullanılmıştır. %12 konsantrasyonda ayırma jeli ve %5 konsantrasyonda yükleme jeli hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

2.2.15.1. SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması

Yüzde 12'lik ayırma jeli hazırlanırken tüm bileşenler hava kabarcığı kalmayacak şekilde birleştirildikten sonra amonyum persülfat ve TEMED jelleşmeyi başlattıkları için en son eklenmiştir. Jel vakit kaybetmeden jel yürütme kasetine enjektör yardımı ile yeterli miktarda doldurulmuştur. Jelin üst yüzeyi atmosferik oksijenin difüzyonunu önlemek ve düzgün bir tabaka elde etmek amacı ile ince bir su tabakası veya 0,3 ml su ile doyurulmuş n-butanol ile kapatılarak oda sıcaklığında 30-60 dakika süreyle polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Ayırma jelinin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra jelin üst yüzeyindeki distile su temizlenmiştir ve hazırlanan yükleme jeli ayırma jelinin üzerine enjektör yardımıyla yeterli miktarda dökülüp örnek kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirilmiştir. Oda sıcaklığında 30-60 dakika süreyle polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra tarak bir taraftan başlayarak ve kuyucukların bozulmamasına dikkat edilerek yavaşça kaldırılmıştır.

2.2.15.2. Örneğin Hazırlanması, Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Enzim ve örnek yükleme tamponu eşit hacimde eppendorf tüpünde karıştırılmıştır ve ticari olarak örnek yükleme tamponunda alınmış olan standart protein karışımı (Unstained protein molecular weight marker, 26611, Thermo Scientific) ile birlikte 5 dakika kaynar su banyosunda bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlanmıştır. Süre sonunda tüpler buz içerisine konulmuştur.

Protein örnekleri 10 µl, marker protein ise 5 µl hacimde jele yüklenmiştir. Örnekler jele yüklendikten sonra kuyucukların üst yüzeyi örneklerin içinde bulunduğu tampon ile doldurulmuştur. Yürütme tamponu elektroforez sisteminin alt bölmesindeki elektrodun temas edebileceği bir yüksekliğe kadar doldurulduktan sonra jellerin bulunduğu kaset, jelin alt kısmında hava kabarcığı oluşmayacak şekilde elektroforez aygıtına yerleştirilmiş ve elektroforez sisteminin üst bölümü de yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Sistem güç kaynağına bağlanarak alet 16 mA akım geçecek şekilde ayarlanmıştır. Proteinin jeldeki hareketini izlemeyi sağlayan boyaya ait bant yükleme jelinden çıkıp ayırma jeline girdiğinde, akım 20 mA'ya arttırılmıştır ve işlem sonuna kadar bu şekilde yaklaşık 4 saat yürütme işlemi devam ettirilmiştir.

2.2.15.3. SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Görüntülenmesi

Elektroforez işleminden sonra jel dikkatlice cam plakalar arasından çıkarılmış ve Coomassie Brilliant Blue R-250 Boyama Çözeltisi ile 2 saat oda sıcaklığında (çalkalayıcı üstünde) boyanmıştır. Boyama işleminden sonra jele bağlanmış fazla boyanın uzaklaştırılması için yıkama (boyayı geri alma) çözeltisinde hafif çalkalamada, oda sıcaklığında 1 gece boyunca yıkanmıştır. Bu esnada boyayı geri alma çözeltisi birkaç kez değiştirilmiştir. Boyama ve yıkama sonrasında protein örneklerine bağlanan boya jelden çıkamadığı halde jelin diğer bölgelerindeki boya ortamdan uzaklaşır ve örnekler görünür hale gelirler.

2.2.16. SDS-PAGE Jelinde Zimogram Analizi

Zimogram analizi amacıyla %10'luk SDS-PAGE kullanılmıştır. %12 konsantrasyonda ayırma jeline son konsantrasyonu 50 µg/ml olacak şekilde bovin serum albumin eklenmiştir ve %5 konsantrasyonda yükleme jeli hazırlanmıştır. Örnek yükleme tamponu 2-β-merkaptoetanolsüz hazırlanmıştır ve örnekler ile 1:1 oranında birleştirilmiştir. Örnekler ve tampon kaynatılmamış 37 °C'de 20 dakika bekletilmiştir. Analizin boyama işleminden önceki tüm basamakları SDS-PAGE protokolünde anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işleminden sonra jel dikkatlice cam plakalar arasından çıkarılmış ve boyama işlemi yapılmadan 0,1 M Na-asetat tamponunda (pH 5,0) hazırlanmış %1 Triton X-

100'de oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra % 1 Na-fitat içeren 0,1 M Na-asetat tamponunda (pH 5,0) 16 saat 60 °C ve 35 rpm'de inkübe edilmiştir. Jel distile su ile yıkanmıştır ve % 10'luk CaCl_2 çözeltisine konularak fitaz aktivitesinin olduğu bölgelerde şeffaf zon oluşumu gözlenmiştir. Zimogram analizi gerçekleştirilirken Singh ve Satyanarayana (2009) ve Chen ve ark. (2004) kullandıkları yöntemlerin bazı basamakları birleştirilip üzerinde değişiklikler gerçekleştirilerek elde edilmiş olan modifiye yöntem uygulanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Su Örneklerinin Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Kütahya ve Afyon'dan belirlenmiş olan istasyonlardan alınan su örneklerinin ortalama pH değerleri, toplam klor, florür, amonyak azotu, nitrit azotu, nitrat azotu, mangan, magnezyum miktarları Tablo 3.1 ile 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.1'de görüldüğü gibi, Kütahya'daki sıcak su örneklerinin klor miktarı 0,04-0,18 mg/l arasında, amonyak azotu 0,1-0,5 mg/l arasında, nitrit azotu 0,010-0,500 mg/l arasında, nitrat azotu 0,5 mg/l' den az, mangan 0,03-0,72 mg/l arasında, florür 0,01-4,24 mg/l arasında, magnezyum 30,3-59,9 mg/l arasında değişmiştir.

Tablo 3.2'de görüldüğü gibi, Afyon'daki sıcak su örneklerinin klor miktarı 0,07-0,22 mg/l arasında, amonyak azotu 0,5 mg/l' den az, nitrit azotu 0,018-0,480 mg/l arasında, nitrat azotu 0,5 ve 0,5 mg/l' den az, mangan 0,10-2,17 mg/l arasında, florür 1,68-1,85 mg/l arasında, magnezyum 16,9-30,0 mg/l arasında değişmiştir.

Tablo 3.1. Kütahya'daki bölgelerden alınan sıcak su örneklerinin kimyasal özellikleri

Örnek kodları	1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	3.1	4.1	5.1	5.2	6.1	7.1
Mg (mg/l)	47,4	46,4	47,4	59,1	59,9	59,5	48,5	30,3	43,8	41,8	41,1	50,7
NO₃⁻ (mg/l)	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Mn (mg/l)	0,18	0,13	0,18	0,18	0,24	0,21	0,08	0,07	0,03	0,04	1,26	0,16
NH₄⁺ (mg/l)	<0,5	<0,5	<0,5	0,1	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Toplam Cl₂ (mg/l)	0,05	0,05	0,05	0,15	0,11	0,13	0,09	0,16	0,05	0,04	0,10	0,09
NO₂⁻ (mg/l)	0,023	0,013	0,023	0,010	0,012	0,011	0,016	0,027	0,010	0,009	0,015	0,011
F⁻ (mg/l)	0,12	0,13	0,12	4,24	4,0	4,12	1,04	0,45	<0,10	<0,10	0,01	0,38

Tablo 3.1. (Devam) Kütahya'daki bölgelerden alınan sıcak su örneklerinin kimyasal özellikleri

Örnek kodları	11.1	11.2	11.3	11.4	12.1	12.2	12.3	12.4	13.1	13.2	14.1	15.1	15.2	16.1
Mg (mg/l)	47,4	46,4	47,4	46,0	36,0	36,0	30,3	48,5	50,7	50,8	44,1	44,9	50,1	38,2
NO₃⁻ (mg/l)	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Mn (mg/l)	0,18	0,13	0,18	0,15	0,71	0,72	0,07	0,08	0,16	0,22	0,13	0,11	0,32	0,09
NH₄⁺ (mg/l)	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Toplam Cl₂ (mg/l)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,15	0,18	0,16	0,09	0,09	0,09	0,15	0,17	0,18	0,16
NO₂⁻ (mg/l)	0,023	0,013	0,023	0,021	0,018	0,018	0,027	0,016	0,011	0,019	<0,500	0,013	0,018	0,019
F⁻ (mg/l)	0,12	0,13	0,12	0,13	0,30	0,31	0,45	1,04	0,38	<0,10	0,12	0,97	0,84	0,11

Tablo 3.2. Afyon'daki bölgelerden alınan sıcak su örneklerinin kimyasal özellikleri

Örnek kodları	8.1	9.1	10.1	10.3	17.1	18.1	19.1	19.2
Mg (mg/l)	30,0	19,3	20,6	16,9	30,0	19,3	20,6	16,9
NO₃⁻ (mg/l)	0,5	<0,5	<0,5	0,5	0,5	<0,5	<0,5	0,5
Mn (mg/l)	0,10	0,14	0,13	2,17	0,10	0,14	0,13	2,17
NH₄⁺ (mg/l)	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Toplam Cl₂ (mg/l)	0,07	0,18	0,13	0,22	0,07	0,18	0,13	0,22
NO₂⁻ (mg/l)	0,480	0,020	0,048	0,018	0,480	0,020	0,048	0,018
F⁻ (mg/l)	1,68	1,85	1,83	1,82	1,68	1,85	1,83	1,82

3.2. Sıcak Su Kaynaklarından İzole Edilip Saflaştırılan Filamentli Funguslar

Kütahya’da Yoncalı belediyesi- Çiftlikköy kaplıcaları, Gediz ilçesi - Ilıca kaplıcaları, Simav ilçesi – Eynal, Çitgöl ve Naşa kaplıcaları, Emet ilçesi – Osmanlı, Kaynarca ve Dereli kaplıcaları, Tavşanlı ilçesi – Göbel kaplıcaları ve Hisarcık ilçesi – Esire kaplıcaları; Afyon’da Ömerli kaplıcası, Gecek kaplıcası, Sandıklı ilçesi – Hüdai kaplıcaları, Gazlıgöl beldesi – Kırkpınar kaplıcalarından alınmış olan 47 farklı sıcak su örneğinden yapılmış olan izolasyon işlemleri sonucunda toplam 137 adet izolat elde edilmiştir. Bu izolatlardan 55 tanesi belirtilen istasyonlardan 20.09.2008 tarihinde yapılmış olan 1. örnekleme çalışmasından, 82 tanesi ise 20.10.2009 tarihinde yapılmış olan örnekleme çalışmalarından elde edilmiştir. Toplam 132 adet izolat Kütahya’daki sıcak su kaynaklarından ve 5 tane izolat ise Afyondaki sıcak su kaynaklarından izole edilmiştir. (Tablo 3.3. ve Tablo 3.4.). İzolatların, saflaştırma ve tek spor izolasyonu işlemleri sonrasında daha uzun süreli saklanabilmesi için liyofilizasyon yapılmıştır ve liyofilize edilen stoklar + 4 °C’de muhafaza edilmektedir.

Tablo 3.3 Birinci izolasyon çalışmasında mikrofungus elde edilen bölgeler ve sıcak su örnekleri

	Kod numaraları*	7. gün	14. gün
2. Bölge Gediz İlca Kaplıcaları	2.2.1.1	3 tane farklı küf kolonisi	
	2.1.1.2	40 tane aynı küf kolonisi	
	2.1.3.2	2 tane aynı küf kolonisi	
	2.2.3.2	1 adet küf kolonisi	
	2.3a.2.2	2 farklı küf kolonisi	
	2.3b.3.2	4 tane aynı küf kolonisi	
	2.3b.2.2	1 tane küf kolonisi	
	2.3c.3.2		1 tane küf kolonisi
	2.4.2.2	1 tane küf kolonisi	
	2.4.2.2	1 tane küf kolonisi	
4. Bölge Simav Eynal Kaplıcaları	4.1.3.2	4 adet aynı küf kolonisi	
	4.1.3.2		2 adet aynı küf kolonisi
	4.2.1.2	çok sayıda küf kolonisi	
	4.2.1.2	çok sayıda küf kolonisi	
	4.2.2.2	20 adet küf kolonisi	
	4.2.2.2	çok sayıda küf kolonisi	
	4.2.3.2	3 adet aynı küf kolonisi	
	4.2.3.2	16 adet aynı küf kolonisi	
5. Bölge Emet Kaplıcaları	5.1.3.2	1 adet küf kolonisi	
	5.2.3.2	1 adet küf kolonisi	
6. Bölge Tavşanlı Göbel Kaplıcaları			
	6.1.2.1	1 adet küf kolonisi	
8. Bölge Sandıklı Hüdai Kaplıcaları	8.2.1.2	12 adet küf kolonisi	
	8.2.1.2	1 adet küf kolonisi	
	8.2.2.2		1 adet küf kolonisi
10. Bölge Afyon Kaplıcaları	10.4b.2.2		1 adet küf kolonisi
	10.4A.1.2	1 adet küf kolonisi	

[* kod numaralarında 1. rakam bölgeyi, 2. rakam kaplıca veya örnek numarasını, 3. rakam kullanılan besiyerini (1- MPÇNA, 2-SDA, 3-PDA), 4. rakam kullanılan izolasyon yöntemini (1-membran filtrasyonu, 2-dökme plak yöntemi) belirtmektedir.]

Tablo 3.4 İkinci izolasyon çalışmasında mikrofungus elde edilen bölgeler ve sıcak su örnekleri

	Kod numaraları*	7. gün	14. gün
11. bölge Gediz Ilca kaplıcaları	11.1.1.1	1 tane küf kolonisi	
	11.1.2.2	1 tane küf kolonisi	
	11.2.1.2	1 tane küf kolonisi	
	11.2.2.2	2 adet farklı küf kolonisi	
	11.3.1.1	2 tane farklı küf kolonisi	
	11.3.2.1	4 tane aynı küf kolonisi	
	11.4.3.3	1 tane küf kolonisi	
	11.5.1.2		1 tane küf kolonisi
	11.6.1.2	1 tane küf kolonisi	
	11.6.2.2	1 tane küf kolonisi	
	11.7.1.2	10 adet farklı küf kolonisi	3 adet farklı küf kolonisi
	11.7.2.2	3 adet farklı küf kolonisi	2 adet farklı küf kolonisi
	11.7.3.2	2 tane farklı küf kolonisi	
12. bölge Simav kaplıcaları	12.1.2.1	1 adet küf kolonisi	
	12.2.2.2	8 adet farklı küf kolonisi	
	12.2.2.1	3 adet farklı küf kolonisi	
	12.2.3.2	1 adet küf kolonisi	
	12.4.2.2	1 adet küf kolonisi	
	12.5.2.2	1 adet küf kolonisi	
	12.6.1.2	5 adet farklı küf kolonisi	
	12.6.2.2		2 adet farklı küf kolonisi
	12.6.3.2	2 adet farklı küf kolonisi	
	12.7.2.2	1 adet küf kolonisi	
13. bölge hisarcık kaplıcaları	13.1.2.1		1 adet küf kolonisi
	13.2.2.1	3 adet farklı küf kolonisi	
	13.2.2.2	1 adet küf kolonisi	
	13.3.1.2	3 adet farklı küf kolonisi	
	13.3.2.2	6 adet farklı küf kolonisi	3 adet farklı küf kolonisi
	13.3.3.2	2 tane farklı küf kolonisi	
14. bölge Emet kaplıcaları			
	14.2.3.2	3 adet farklı küf kolonisi	
15. bölge Dereli kaplıcaları	15.2.2.1	1 adet küf kolonisi	
	15.2.2.2	1 adet küf kolonisi	
16. bölge tavşanlı kaplıcaları	16.1.2.1	1 adet küf kolonisi	
	16.2.2.2	1 adet küf kolonisi	

[* kod numaralarında 1. rakam bölgeyi, 2. rakam kaplıca veya örnek numarasını, 3. rakam kullanılan besiyerini (1- MPÇNA, 2-SDA, 3-PDA), 4. rakam kullanılan izolasyon yöntemini (1- membran filtrasyonu, 2-dökme plak yöntemi) belirtmektedir.]

3.3. Sıcaklık Testleri

Termofilik mikrofungusları ayırt etmek amacıyla, Elde edilen küf izolatlarının sıcaklık testleri gerçekleştirilmiştir. Bu testler sonucunda; 20 °C’de gelişmeyen ancak 20 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda gelişebilen izolatlar termofilik, 20 °C ‘nin altından yaklaşık 55 °C’ye kadar olan geniş bir büyüme sıcaklığına sahip olanlar ise termotolerant formlar olarak ayrılmıştır. Elde edilen izolatlardan pek çoğunun 20 °C’den yaklaşık 50-55 °C’ye kadar olan geniş bir büyüme sıcaklık aralığına sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.5). Bu durumda izole edip saflaştırılmış olan funguslardan 25 adedinin termofilik geriye kalan 112 adedinin ise termotolerant olduğu saptanmıştır.

Tüm termofilik izolatlar 2. izolasyon çalışmasında Kütahya ilindeki kaplıcalardan elde edilmiştir. Termofilik olduğu belirlenen 25 adet izolatın su kaynakları arasındaki dağılımı; % 60’ı 11. Bölge Gediz Ilıca kaplıcalarından, % 20’si 12. Bölge Simav kaplıcalarından, % 16’sı 13. Bölge Hisarcık kaplıcalarından ve % 4’ü ise 15. Bölge Dereli kaplıcalarından şeklinde gerçekleşmiştir.

3.4. Biolog Microstation Sistemi ile Karbonhidrat Testleri

Termofilik oldukları belirlenen izolatların çeşitli karbon kaynaklarından hangilerini kullanıp kullanmadıklarını ortaya koyan karbonhidrat testleri biolog microstation sistemi ile belirlenmiştir. Biolog microstation sistemi ile 95 farklı karbon kaynağını kullanımlarının değerlendirilmesi sonucunda farklı genus ve türlere ait izolatlar çeşitli karbon kaynaklarını kullanma açısından farklı profiller göstermiştir. Bu sonuçlara göre α -D-glukoz, glikojen, D-trehaloz, L-alanin, L-alanil-glisin ve L-asparaginin tüm termofilik organizmalar tarafından kullanılan karbon kaynakları olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık D-galakturonik asit, Bromosüksinik asit, p-hidroksifenil asetik asit ve sebasik asit ise test edilen çoğu termofilik organizma tarafından kullanılmadığı saptanmıştır.

Tablo 3.5. Sıcaklık Testi Sonuçları (#: 1 cm'den küçük mikrokoloni; termofilik türler gri vurgulama ile belirtilmiştir)

İzolat kodu	45 °C (kontrol)	20 °C	50 °C	55 °C	60 °C	62 °C
2.2.1.1.1	+	+	+	-	-	-
2.2.1.1.2	+	+	+	-	-	-
2.2.1.1.3	+	+	#	-	-	-
2.1.1.2.1	+	+	+	-	-	-
2.1.3.2.1	+	+	+	-	-	-
2.1.3.2.2	+	+	+	-	-	-
2.1.3.2.3	+	+	+	-	-	-
2.2.3.2.1	+	+	+	-	-	-
2.2.3.2.2	+	+	#	-	-	-
2.3a.2.2.1	+	+	+	-	-	-
2.3a.2.2.2	+	+	+	-	-	-
2.3b.3.2.1	+	+	+	-	-	-
2.3b.3.2.2	+	+	+	-	-	-
2.3c.3.2.1	+	+	+	-	-	-
2.4.2.2.1	+	+	+	-	-	-
2.4.2.2.2	+	+	+	-	-	-
2.3b.2.2.1	+	+	+	-	-	-
4.1.3.2.1	+	+	+	-	-	-
4.1.3.2.2	+	-	+	-	-	-
4.1.3.2	+	+	+	-	-	-
4.2.1.2.1	+	+	+	-	-	-
4.2.1.2.2	+	+	#	-	-	-
4.2.1.2.3	+	+	+	-	-	-
4.2.1.2.4	+	+	+	-	-	-
4.2.1.2.5	+	+	+	-	-	-
4.2.1.2.6A	+	+	+	-	-	-
4.2.1.2.6B	+	+	+	-	-	-
4.2.1.2.7	+	+	+	-	-	-
4.2.1.2.8	+	+	#	-	-	-
4.2.1.2.9	+	+	+	-	-	-
4.2.1.2.10	+	+	+	-	-	-
4.2.1.2.11	+	+	+	-	-	-
4.2.1.2.12	+	+	#	-	-	-
4.2.1.2.13	+	+	+	-	-	-
4.2.2.2.1	+	+	+	-	-	-
4.2.2.2.2	+	+	+	-	-	-
4.2.2.2.3	+	+	+	-	-	-

Tablo 3.5. (Devam) Sıcaklık Testi Sonuçları (#: 1 cm'den küçük mikrokoloni; termofilik türler gri vurgulama ile belirtilmiştir)

İzolat kodu	45 °C (kontrol)	20 °C	50 °C	55 °C	60 °C	62 °C
4.2.2.2.4A	+	+	+	-	-	-
4.2.2.2.4B	+	+	+	-	-	-
4.2.2.2.7	+	+	+	-	-	-
4.2.2.2.9	+	+	+	-	-	-
4.2.2.2.10	+	+	+	-	-	-
4.2.3.2.1	+	+	+	-	-	-
4.2.3.2.2	+	+	+	-	-	-
4.2.3.2.3	+	+	+	-	-	-
5.1.3.2.1	+	+	+	-	-	-
5.2.3.2.1A	+	+	#	-	-	-
5.2.3.2.1B	+	+	+	-	-	-
5.2.3.2.2	+	+	+	-	-	-
6.1.2.1.1	+	+	+	-	-	-
8.2.2.2.1	+	+	+	-	-	-
8.2.2.2.2	+	+	+	-	-	-
8.2.1.2.1	+	+	+	-	-	-
10.4b.2.2.1	+	+	+	-	-	-
10.4A.1.2	+	+	+	-	-	-
11.1.1.1.1	+	-	+	-	-	-
11.1.2.2.1	+	+	-	-	-	-
11.2.1.2.1	+	-	+	-	-	-
11.2.2.2.1	+	+	+	-	-	-
11.2.2.2.2	+	+	+	-	-	-
11.3.1.1.2	+	+	+	#	-	-
11.3.2.1.2	+	+	+	-	-	-
11.4.3.3.1	+	+	-	-	-	-
11.5.1.2.2	+	+	+	#	-	-
11.6.1.2.1	+	-	+	-	-	-
11.6.1.2.2	+	-	+	-	-	-
11.6.1.2.3	+	+	+	-	-	-
11.6.2.2.1	+	-	+	-	-	-
11.6.2.2.2	+	+	+	-	-	-
11.6.2.2.3	+	+	-	-	-	-
11.7.1.2.1	+	+	+	-	-	-
11.7.1.2.2	+	-	+	#	-	-
11.7.1.2.3	+	-	+	#	-	-
11.7.1.2.4	+	+	+	#	-	-
11.7.1.2.5	+	+	+	-	-	-
11.7.1.2.6	+	-	+	-	-	-
11.7.1.2.8	+	+	+	-	-	-
11.7.1.2.9	+	+	+	-	-	-
11.7.1.2.10	+	+	+	-	-	-
11.7.1.2.11	+	+	+	-	-	-
11.7.1.2.12	+	-	+	-	-	-
11.7.1.2.13	+	-	+	-	-	-
11.7.1.2.14	+	+	+	#	-	-
11.7.2.2.1	+	-	+	-	-	-
11.7.2.2.2	+	-	+	#	-	-

Tablo 3.5. (Devam) Sıcaklık Testi Sonuçları (#: 1 cm'den küçük mikrokoloni; termofilik türler gri vurgulama ile belirtilmiştir)

İzolat Kodu	45 °C (kontrol)	20 °C	50 °C	55°C	60 °C	62 °C
11.7.2.2.3	+	-	+	-	-	-
11.7.2.2.4	+	+	+	-	-	-
11.7.2.2.5	+	+	+	-	-	-
11.7.3.2.1	+	-	+	-	-	-
11.7.3.2.2	+	-	+	+	-	-
12.1.2.1.1	+	+	+	-	-	-
12.2.2.1.1	+	+	+	-	-	-
12.2.2.1.2	+	+	+	-	-	-
12.2.2.1.3	+	+	+	-	-	-
12.2.2.2.1	+	+	+	-	-	-
12.2.2.2.2	+	+	+	-	-	-
12.2.2.2.3	+	+	-	-	-	-
12.2.2.2.4	+	+	+	-	-	-
12.2.2.2.5	+	+	+	-	-	-
12.2.2.2.6	+	-	+	#	-	-
12.2.2.2.7	+	+	+	-	-	-
12.2.2.2.8	+	-	+	-	-	-
12.2.3.2.1	+	+	+	#	-	-
12.5.2.2.2	+	+	+	-	-	-
12.6.1.2.1	+	-	+	+	#	-
12.6.1.2.2	+	+	-	-	-	-
12.6.1.2.3	+	+	+	#	-	-
12.6.1.2.4	+	+	+	#	-	-
12.6.1.2.5	+	+	+	#	-	-
12.6.2.2.1	+	+	+	-	-	-
12.6.2.2.2	+	+	+	-	-	-
12.6.3.2.1	+	+	+	-	-	-
12.6.3.2.2	+	-	+	-	-	-
12.7.2.2.1	+	-	+	+	+	+
13.1.2.1.1	+	-	+	-	-	-
13.2.2.1.1	+	-	+	#	-	-
13.2.2.2.1	+	+	-	-	-	-
13.3.1.2.1	+	+	+	#	-	-
13.3.1.2.2	+	-	+	-	-	-
13.3.1.2.3	+	+	+	#	-	-
13.3.2.2.1	+	+	-	-	-	-
13.3.2.2.2	+	+	+	-	-	-
13.3.2.2.3	+	-	+	-	-	-
13.3.2.2.4	+	+	+	-	-	-

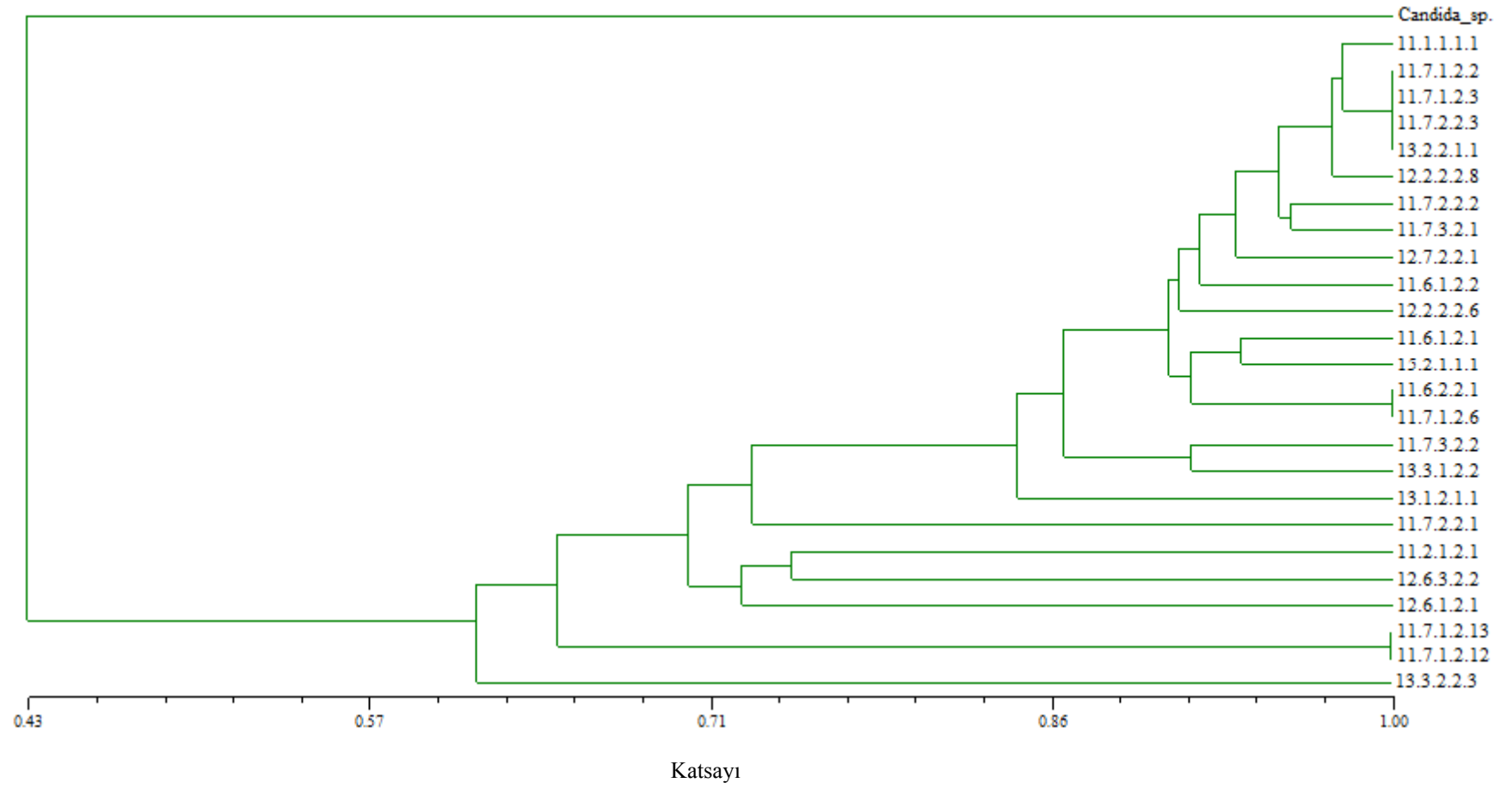
Tablo 3.5. (Devam) Sıcaklık Testi Sonuçları (#: 1 cm'den küçük mikrokoloni; termofilik türler gri vurgulama ile belirtilmiştir)

İzolat kodu	45 °C (kontrol)	20 °C	50 °C	55 °C	60 °C	62 °C
13.3.2.2.5	+	+	+	-	-	-
13.3.2.2.6	+	+	+	-	-	-
13.3.2.2.7	+	+	+	-	-	-
13.3.2.2.8	+	+	+	-	-	-
13.3.2.2.9	+	+	+	-	-	-
13.3.3.2.1	+	+	+	-	-	-
14.2.3.2.1	+	+	+	-	-	-
14.2.3.2.2	+	+	+	-	-	-
14.2.3.2.3	+	+	+	-	-	-
15.2.1.1.1	+	-	+	-	-	-
15.2.2.2.1	+	+	+	-	-	-
16.1.2.1.1	+	+	+	-	-	-
16.2.2.2.1	+	+	+	-	-	-

Değerlendirilen karbon kaynakları ve izolatların bu karbon kaynaklarını kullanım açısından sonuçları Tablo 3.6'da verilmiştir.

Biolog microstation sistemi ile elde edilen veriler NTSYSpc 21 programı ile analiz edilerek türlerin birbirleri ile yakınlık dereceleri karbon kaynaklarını kullanımlarının oluşturduğu profiller açısından değerlendirilmiş ve bu verilerle oluşturulan ağaç Şekil 3.1'de verilmiştir. Ağaç oluşturulurken dış grup olarak *Candida sp.* kullanılmıştır. Oluşan dalların istatistiksel olarak doğruluğu "UPGMA" analizi ile belirlenmiştir.

Şekil 3.1'de görüldüğü gibi elde edilen termofilik izolatların 95 farklı karbon kaynağını kullanımlarını gösteren profillerin tabanında birbirleri ile olan evrimsel ilişki ele alınmıştır. Ağacın istatistiksel güvenilirliği incelendiğinde "UPGMA" ile elde edilen katsayıların genel olarak %50'nin üzerinde olduğu ve bu nedenle güvenilir bir ağaç topolojisi elde edildiği anlaşılmıştır. 11.7.1.2.2, 11.7.1.2.3, 11.7.2.2.3 ve 13.2.2.1.1 izolatlarının %100 aynı küme içerisinde toplandığı görülmüştür. Benzer şekilde 11.6.2.2.1 ile 11.7.1.2.6 izolatlarının ve 11.7.1.2.13 ile 11.7.1.2.12 izolatlarının da %100 aynı küme içerisinde toplandığı ortaya konmuştur.



Şekil 3.1. Biolog sonuçları ile oluşturulan ağaç

Tablo 3.6. Karbonhidrat testi sonuçları

İzolat Kodu	Tween 80	N-asetil-D-galactozamin	N-asetil-D-glukozamin	N-asetil-D-mannozamine	Adonitol	amygdalin	D-arabinoz	L-arabinoz	D-arabitol	Arbutin	D-sellülobiyoz	α-siklodekstrin	β-siklodekstrin	dekstrin	i-eritritol	D-fruktoz	L-fukoz	D-galaktoz	D-galakturnik asit	gentiobiyo	D-glukonik asit	D-glukozamin	α-D-glukoz	Glukoz-1-fosfat	Glukuronamid	D-glukuronik asit	Gliserol	Glikojen	m-inositol	2-keto-D-glukonik asit	α-D-laktoz	Laktulaz	
11.1.1.1.1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
11.2.1.2.1	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
11.6.1.2.1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11.6.1.2.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11.6.2.2.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
11.7.1.2.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11.7.1.2.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11.7.1.2.6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11.7.1.2.12	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
11.7.1.2.13	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
11.7.2.2.1	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
11.7.2.2.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
11.7.2.2.3	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
11.7.3.2.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11.7.3.2.2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
12.2.2.2.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
12.2.2.2.8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12.6.1.2.1	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
12.6.3.2.2	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
12.7.2.2.1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13.1.2.1.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
13.2.2.1.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13.3.1.2.2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
13.3.2.2.3	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
15.2.1.1.1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tablo 3.6. (Devam) Karbonhidrat testi sonuçları

İzolat Kodu	Maltitol	Maltoz	Maltotrioz	D-mannitol	D-mannoz	D-melezitoz	D-melibioz	α -metil-D-galaktozid	β -metil-D-galaktozid	α -metil-D-glukozid	β -metil-D-glukozid	Palatinoz	D-psikoz	D-rafinoz	L-ramnoz	D-riboz	salisin	Sedoheptulosan	D-sorbitol	L-sorboz	Stakiloz	Sükroz	D-tagatoz	D-trehaloz	turanoz	Xylitol	D-xyloz	γ -amino-bütirik asit	Bromosüksinik asit	Fumarik asit	β -hidroksi-bütirik asit	γ -hidroksi-bütirik asit	
11.1.1.1.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
11.2.1.2.1	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
11.6.1.2.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
11.6.1.2.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
11.6.2.2.1	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
11.7.1.2.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
11.7.1.2.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
11.7.1.2.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
11.7.1.2.12	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	
11.7.1.2.13	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
11.7.2.2.1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
11.7.2.2.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
11.7.2.2.3	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
11.7.3.2.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
11.7.3.2.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
12.2.2.2.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
12.2.2.2.8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12.6.1.2.1	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
12.6.3.2.2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
12.7.2.2.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
13.1.2.1.1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
13.2.2.1.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13.3.1.2.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
13.3.2.2.3	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
15.2.1.1.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+

Tablo 3.6. (Devam) Karbonhidrat testi sonuçları

İzolat Kodu	p-hidroksifenil asetik asit	α -keto-glutarik asit	D-laktik asit metil ester	L-laktik asit	D-malik asit	L-malik asit	Quonik asit	D-sakkarik asit	Sebasik asit	Süksinamik asit	süksinik asit	Süksinik asit mono metilester	N-asetil-L-glutamik asit	Alaninamid	L-alanin	L-alanil-glisin	L-asparagin	L-aspartik asit	L-glutamik asit	Glisil-L-glutamik asit	L-ornitin	L-fenilalanin	L-prolin	L-pirolglutamik asit	L-serin	L-threonin	2-amino ethanol	Putrescine	Adenozin	Üridin	Adenozin-5-monofosfat
11.1.1.1.1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11.2.1.2.1	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
11.6.1.2.1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
11.6.1.2.2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11.6.2.2.1	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
11.7.1.2.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11.7.1.2.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11.7.1.2.6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
11.7.1.2.12	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11.7.1.2.13	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
11.7.2.2.1	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
11.7.2.2.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11.7.2.2.3	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
11.7.3.2.1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11.7.3.2.2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
12.2.2.2.6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
12.2.2.2.8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12.6.1.2.1	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
12.6.3.2.2	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
12.7.2.2.1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13.1.2.1.1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13.2.2.1.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13.3.1.2.2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
13.3.2.2.3	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15.2.1.1.1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+

3.5. Termofilik Fungusların Geleneksel Yöntemlerle Tanılanması

Termofilik fungus izolatlarının tür seviyesinde tayinlerini gerçekleştirmek üzere makroskopik ve mikroskopik özelliklerini belirleyip tanılama anahtarları vasıtasıyla tayinlerini gerçekleştirdiğimizde 11.7.3.2.2 kod numaralı izolatın *Myceliophthora thermophila* (sinonim: *Chrysosporium thermophilum*, *Sporotrichum thermophilum*) (Şekil 3.8), 11.6.1.2.1 kod numaralı izolatın *Myceliophthora hinnulea* (Şekil 3.3), 11.6.2.2.1, 11.7.1.2.6, 11.7.1.2.12, 11.7.1.2.13, 11.7.2.2.1 kod numaralı 5 izolatın *Myriococcum albomyces* (sinonim: *Melanocarpus albomyces*) (Şekil 3.6), 11.2.1.2.1, 12.6.3.2.2, 13.1.2.1.1 kod numaralı 3 izolatın *Rhizomucor pusillus* (sinonim: *Mucor pusillus*) (Şekil 3.2), 12.7.2.2.1 kod numaralı izolatın *Thermomyces lanuginosus* (sinonim: *Humicola brevis* var. *thermoidea*, *Humicola brevispora*, *Humicola grisea* var. *indica*, *Humicola lanuginosa*, *Monotospora lanuginosa*, *Sepedonium lanuginosum*) (Şekil 3.9), 11.6.1.2.2 kod numaralı izolatın *Humicola grisea* var. *thermoidea* (Şekil 3.5), 13.3.2.2.3 kod numaralı izolatın *Humicola insolens* (Şekil 3.4), 13.3.1.2.2, 15.2.1.1.1 kod numaralı 2 izolatın *Scytalidium thermophilum* (sinonim: *Torula thermophila*) (Şekil 3.11), 11.1.1.1.1, 12.6.1.2.1 kod numaralı 2 izolatın *Talaromyces thermophilus* (Şekil 3.1), 12.2.2.2.8 kod numaralı izolatın *Thielavia terrestris* (sinonim: *Allescheria terrestris*) (Şekil 3.10), 11.7.1.2.2, 11.7.1.2.3, 11.7.2.2.2, 11.7.2.2.3, 11.7.3.2.1, 12.2.2.2.6, 13.2.2.1.1 kod numaralı 7 izolatın ise *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* (sinonim: *Malbranchea cinnamomea*) (Şekil 3.7) türünün üyeleri olduğu anlaşılmıştır (Tablo 3.7). Tanılamalar sonucunda belirlenen türlerin özellikleri her bir türün kendi başlığı altında aşağıda verilmiştir.

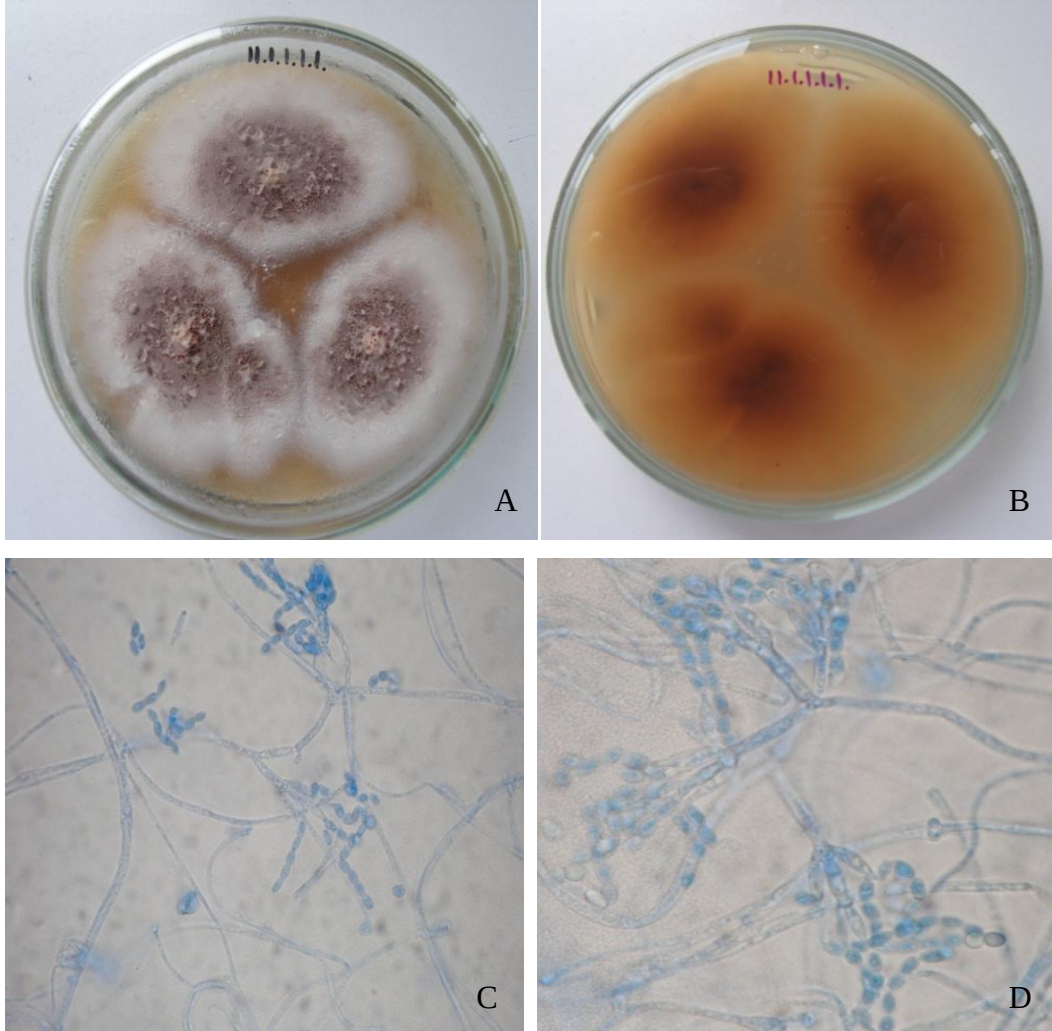
Tablo 3.7. Termofilik fungus izolatlarının morfolojik tanımlama sonuçları

Kaplıcalar	İzolat Kodu	İdentifikasyon sonucu
Gediz İlca Kaplıcaları	11.1.1.1.1	<i>Talaromyces thermophilus</i>
	11.2.1.2.1	<i>Rhizomucor pusillus</i>
	11.6.1.2.1	<i>Myceliophthora hinnulea</i>
	11.6.1.2.2	<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>
	11.6.2.2.1	<i>Myriococcum albomyces</i>
	11.7.1.2.2	<i>Malbranchea pulchella</i> var. <i>sulfurea</i>
	11.7.1.2.3	<i>Malbranchea pulchella</i> var. <i>sulfurea</i>
	11.7.1.2.6	<i>Myriococcum albomyces</i>
	11.7.1.2.12	<i>Myriococcum albomyces</i>
	11.7.1.2.13	<i>Myriococcum albomyces</i>
	11.7.2.2.1	<i>Myriococcum albomyces</i>
	11.7.2.2.2	<i>Malbranchea pulchella</i> var. <i>sulfurea</i>
	11.7.2.2.3	<i>Malbranchea pulchella</i> var. <i>sulfurea</i>
	11.7.3.2.1	<i>Malbranchea pulchella</i> var. <i>sulfurea</i>
	11.7.3.2.2	<i>Myceliophthora thermophila</i>
Simav Naşa Kaplıcası	12.2.2.2.6	<i>Malbranchea pulchella</i> var. <i>sulfurea</i>
	12.2.2.2.8	<i>Thielavia terrestris</i>
	12.6.1.2.1	<i>Talaromyces thermophilus</i>
	12.6.3.2.2	<i>Rhizomucor pusillus</i>
	12.7.2.2.1	<i>Thermomyces lanuginosus</i>
Hisarcık Esire Kaplıcası	13.1.2.1.1	<i>Rhizomucor pusillus</i>
	13.2.2.1.1	<i>Malbranchea pulchella</i> var. <i>sulfurea</i>
	13.3.1.2.2	<i>Scytalidium thermophilum</i>
	13.3.2.2.3	<i>Humicola insolens</i>
Derele Kaplıcası	15.2.1.1.1	<i>Scytalidium thermophilum</i>

3.5.1. *Talaromyces thermophilus* Stolk (1965)

(*Fungi, Ascomycota, Eurotiomycetes, Eurotiales, Trichocomaceae*)

11.1.1.1.1, 12.6.1.2.1 kod numaralı izolatlar *Talaromyces thermophilus* olarak tanımlanmıştır. 11.1.1.1.1 kod numaralı izolat Gediz Ilıca kaplıcasından, 12.6.1.2.1 kod numaralı izolat ise Simav ilçesi Naşa kaplıcasından izole edilmiştir. Maya Patates Çözülebilir Nişasta Agar (MPÇNA) ortamında 45 °C’de büyüme oldukça hızlı gerçekleşmiştir. Yedi günlük koloni büyüklüğü tüm petriyi (9 cm çaplı) kaplamıştır. Miselyum pamuksu görünümde olup 1mm veya daha az kalınlıkta bir keçe oluşturmuştur. Koloni merkezine yakın bölgelerde koyu kahverengi görünümde eksudalar görülmüştür. Büyüme ilk başta beyaz renkli olarak gözlenmiş daha sonra olgunlaşan koloni pembemsi somon rengine dönüşmüştür. Koloni ters yüzü ise kırmızımsı kahve- pembemsi somon renklerinde gözlenmiştir. Işık mikroskobunda, hifler 2-3 µm çapında, dallanmış ve septumlu olarak belirlenmiştir. Konidyoforlar kısa, lateral, septumlarla bölünmüş, basit veya dallanmış, 5-30 µm uzunluğunda ve 2-3 µm çapında olduğu belirlenmiştir. Penicillus genellikle düzensiz monovorticillattan tipte görülmüştür. Konidyumlar 4-2x1,5-2 µm boyutlarında, soluk sarı renkli, pürüzsüz yüzeyli, eliptik- oval şekillerde olduğu gözlenmiştir. Cleistothecia agar kültürlerinde genellikle gözlenmediğinden dolayı inceleme yapılmış olan MPÇNA ortamında da gözlenmemiştir.



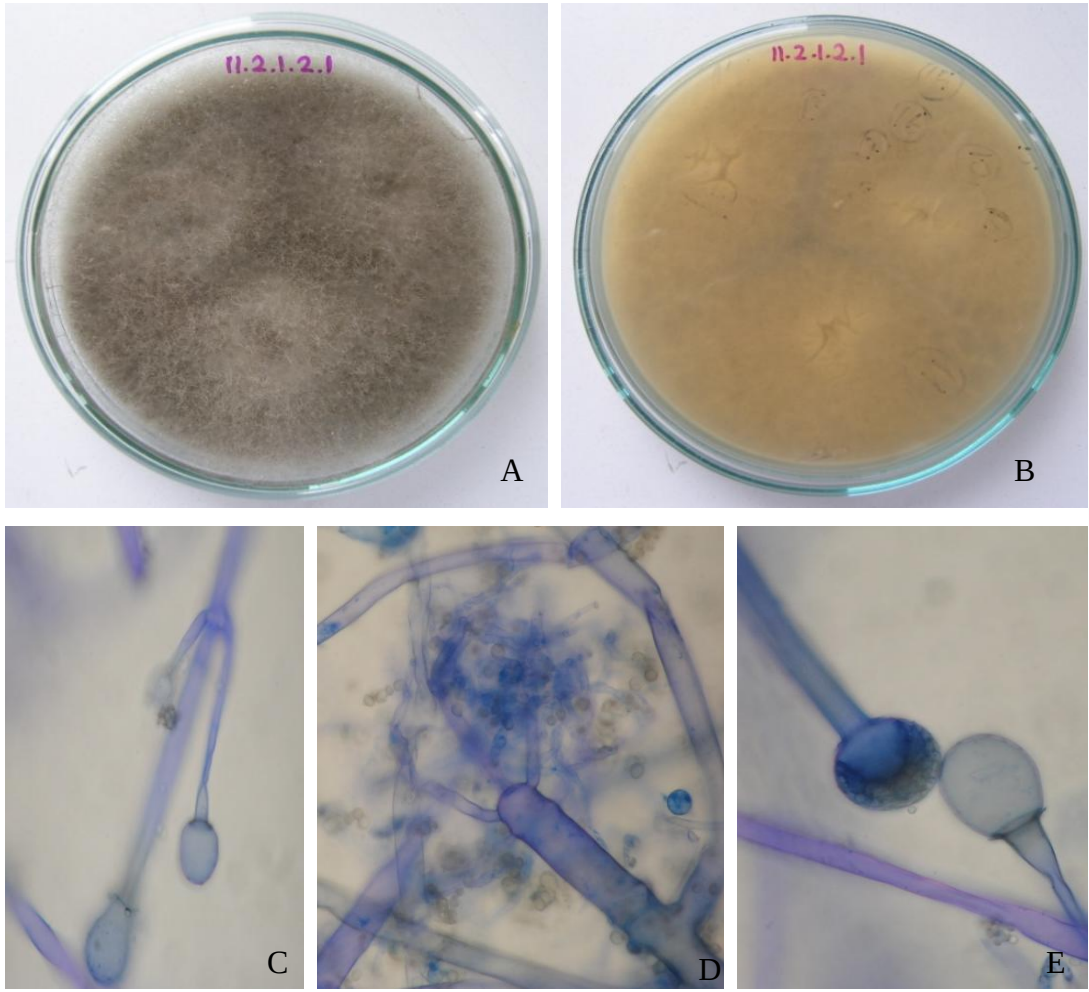
Şekil 3.2. *Talaromyces thermophilus*'un (A-B). MPCNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D). mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; penicillus yapısı, konidyumları)

3.5.2. *Rhizomucor pusillus* (Lindt) Schipper (1978)

(Fungi, Zygomycota, Mucorales, Mucoraceae, Rhizomucor)

Tanımlama için kullandığımız Cooney ve Emerson (1964)'un kitabında *Mucor* cinsi olarak geçmesine karşılık daha sonra rizoidlerinin varlığından dolayı *Mucor*'lardan ayrıldığı belirlenerek *Rhizomucor* olarak adlandırılmıştır. Bu tür günümüzde halen bazı yayınlarda *Mucor pusillus* bazılarında ise *Rhizomucor pusillus* olarak isimlendirilen termofilik bir fungustur.

11.2.1.2.1, 12.6.3.2.2, 13.1.2.1.1 kod numaralı izolatların *Rhizomucor pusillus* türünün üyeleri oldukları makrodikobik ve mikroskobik incelemeler ile belirlenmiştir. 11.2.1.2.1 kod numaralı izolat Gediz Ilıca kaplıcasından, 12.6.3.2.2 numaralı izolat Simav ilçesi Naşa kaplıcasından ve 13.1.2.1.1 numaralı izolat ise Hisarcık ilçesi Esire kaplıcasından izole edilmiştir. Fungusların MPÇNA ortamındaki büyümeleri incelendiğinde hızlı gelişim göstererek 45 °C'de, 7 günde petri kabını tamamen kapladıkları belirlenmiştir. Misel keçesi 2-3 mm yüksekliğinde, ilk başta beyaz, daha sonra nötr gri- saç kahverengisi rengine dönüşmüştür. Işık mikroskobunda; Sporangiophorlar 10µm çapında, simpodial olarak dallanmakta, başlangıçta renksiz daha sonra sarımsı kahverengi olmakta; Sporangiumlar dairesel şekilli, 45-65 µm çapında, duvarı küçük çıkıntılarla sarılmış durumda olduğu belirlenmiştir. Columellae dairesi veya daha yanlardan çekilmiş şekilde, 15-30 µm çapında ölçülmüştür. Sporangiosporlar, renksiz, dairesel veya subglobose, 3-5 µm çapında olduğu saptanmıştır. Heterotallik olduğu için uyumlu mating tip ile karşılaşmadan zigospor oluşturmadığından zigosporlar gözlenmemiştir.

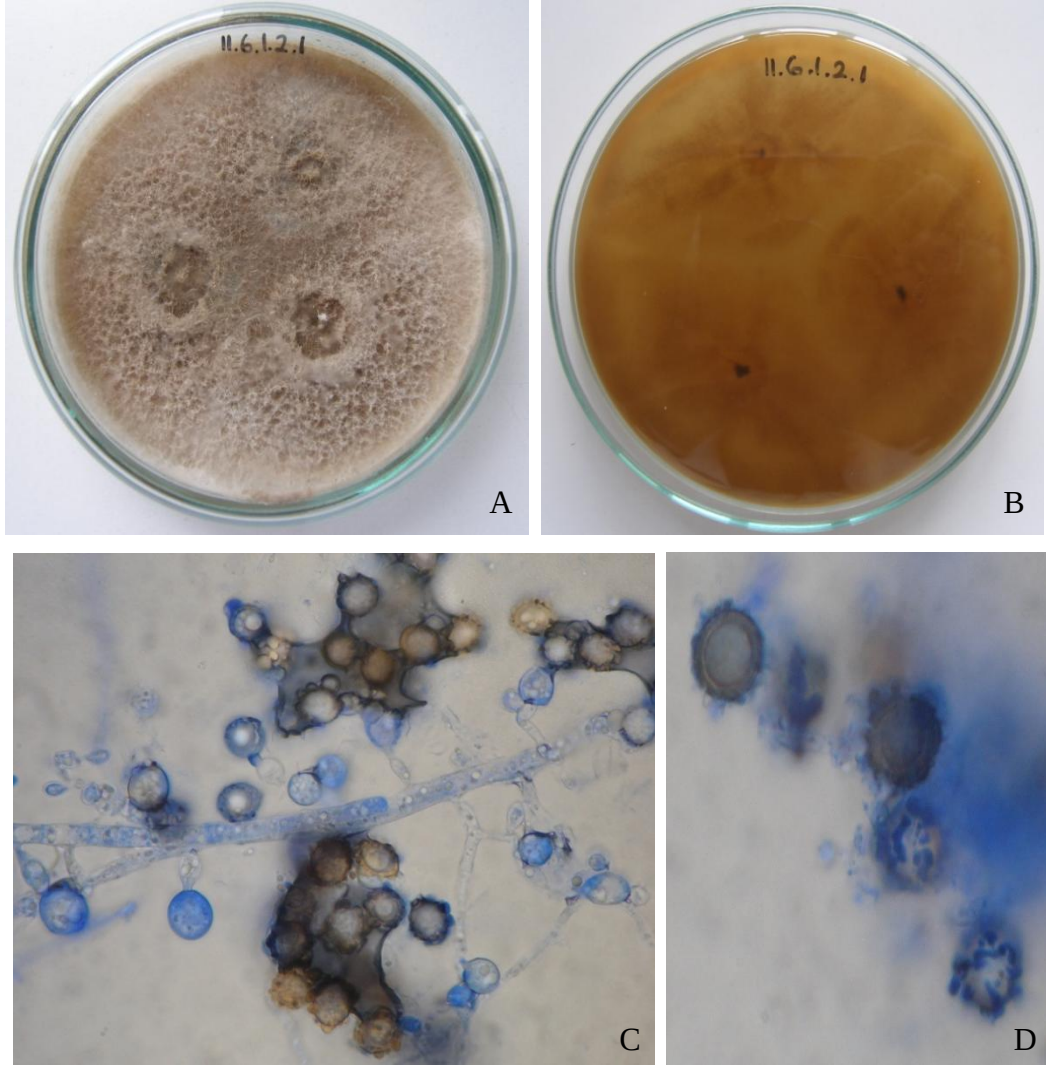


Şekil 3.3. *Rhizomucor pusillus*'un (A-B). MPCNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D-E). Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu; sporangium ve rhizoid yapısı, sporangiosporlar)

3.5.3. *Myceliophthora hinnulea* Awao & Udagawa (1983)

(Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Onygenales, Incertae sedis)

Yapılmış olan makroskobik ve mikroskobik incelemeler ile 11.6.1.2.1 kod numaralı izolat *Myceliophthora hinnulea* olarak tanımlanmıştır. Bu izolat Gediz Ilıca kaplıcasından izole edilmiştir. MPCNA ortamında fungus, 45 °C’ de hızlı bir şekilde gelişerek 6 günde 80 mm çapa ulaşmıştır. Kolonileri oldukça yoğun ve yünümsü görünümde olup koloni merkezde daha kabarık olarak görülmüştür. Havasal ve bazal miseller üzerinde konidyumlar bulunduğu saptanmıştır. Koloniler başlangıçta beyaz renkli sonradan yavaş yavaş soluk pembe, sarımsı kahve ve en sonunda da sporların oluşması ile tarçınımsı kahverengine dönüşmüştür. Koloni ters yüzü kırmızı kahverengi- pembemsi devetüyü rengini almıştır. Genellikle merkezde küçük damlacıklar halinde eksudalar oluştuğu görülmüştür. Hifleri düz duvarlı, şeffaf veya soluk yeşilsi renkte ve 2,5-5 µm boyutlarında olduğu belirlenmiştir. Konidyumlar fertil hiflerde uçlardan veya yanlardan kısa veya uzun pedisellerin (2,0-5 × 2,2-38 µm) ucunda doğduğu belirlenmiştir. Blastik konidyumlar tekli veya 2-3’lü gruplar halinde ampulform şişkinliklerin uçlarından doğduğu gözlenmiştir. Konidyumlar globoz veya subgloboz, başlangıçta şeffaf, soluk sarı- kahve sonradan kalın ve düzensiz şekilde pürüzlü duvarlı, siyahımsı kahverengine dönüştüğü belirlenmiştir.

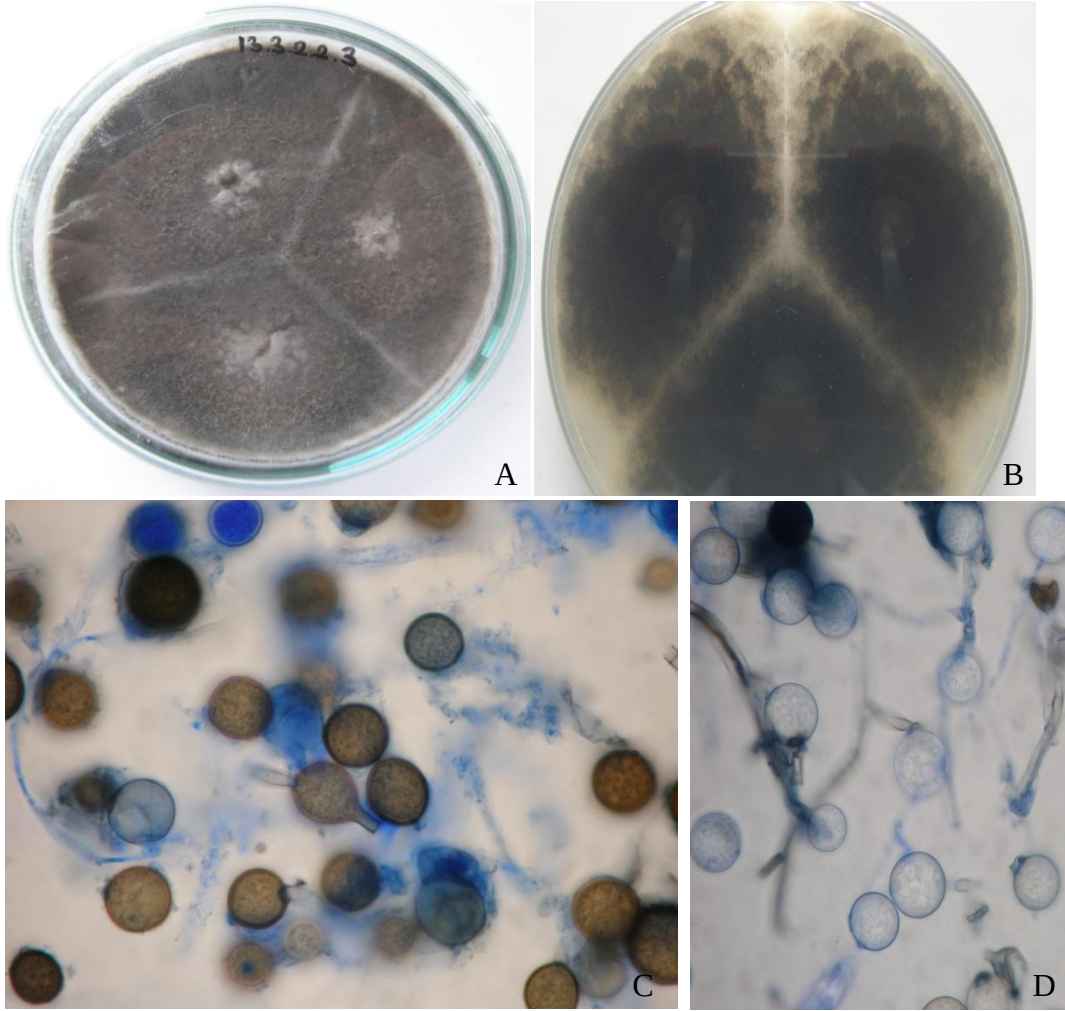


Şekil 3.4. *Myceliophthora hinnulea*'nın (A-B). MPCNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D). Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; Aleurospor oluşum tipleri ve hifler)

3.5.4. *Humicola insolens* Cooney & R. Emers. (1964)

(Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Sordariomycetidae, Sordariales, Chaetomiaceae)

Yapılmış olan tanılama çalışması ile 13.3.2.2.3 kod numaralı izolatın *Humicola insolens* türüne ait olduğu belirlenmiştir. Bu izolat Hisarcık ilçesi Esire kaplıcasından izole edilmiştir. 13.3.2.2.3 numaralı izolat MPÇNA ortamında oldukça hızlı gelişim göstererek, 45 °C'de 7 günde tüm petriyi kaplamıştır. Başlangıçta beyaz olan genç koloni aleurosporların gelişip olgunlaşması ile grimsi kahve renk almıştır. Işık mikroskopunda incelendiğinde; hiflerin renksiz ve 1-3,5 µm çapında ve septalı oldukları görülmüştür. Bu türde 3 tip sporlanma gözlenmiştir. Sporların interkalar olarak tek veya zincirler halinde, hiflerin uçlarında veya yan dalların uçlarından tek tek, bazen de yan dalların uçlarından kısa zincirler halinde oluştukları gözlenmiştir. Olgunlaşmamış sporlar renksiz veya sarı renkte olgunlaşınca açık kahve renk aldıkları belirlenmiştir. Aleurosporların genellikle dairemsi şekillerde ve 7-10 µm boyutlarında olduğu gözlenmiştir. Şişe şeklinde olan aleurosporlar ise 9-11 x 6-7 µm boyutlarında olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık iğ şeklindeki interkalar sporların ise diğerlerinden daha büyük olup 14-20x8-15 µm boyutlarında olduğu belirlenmiştir.

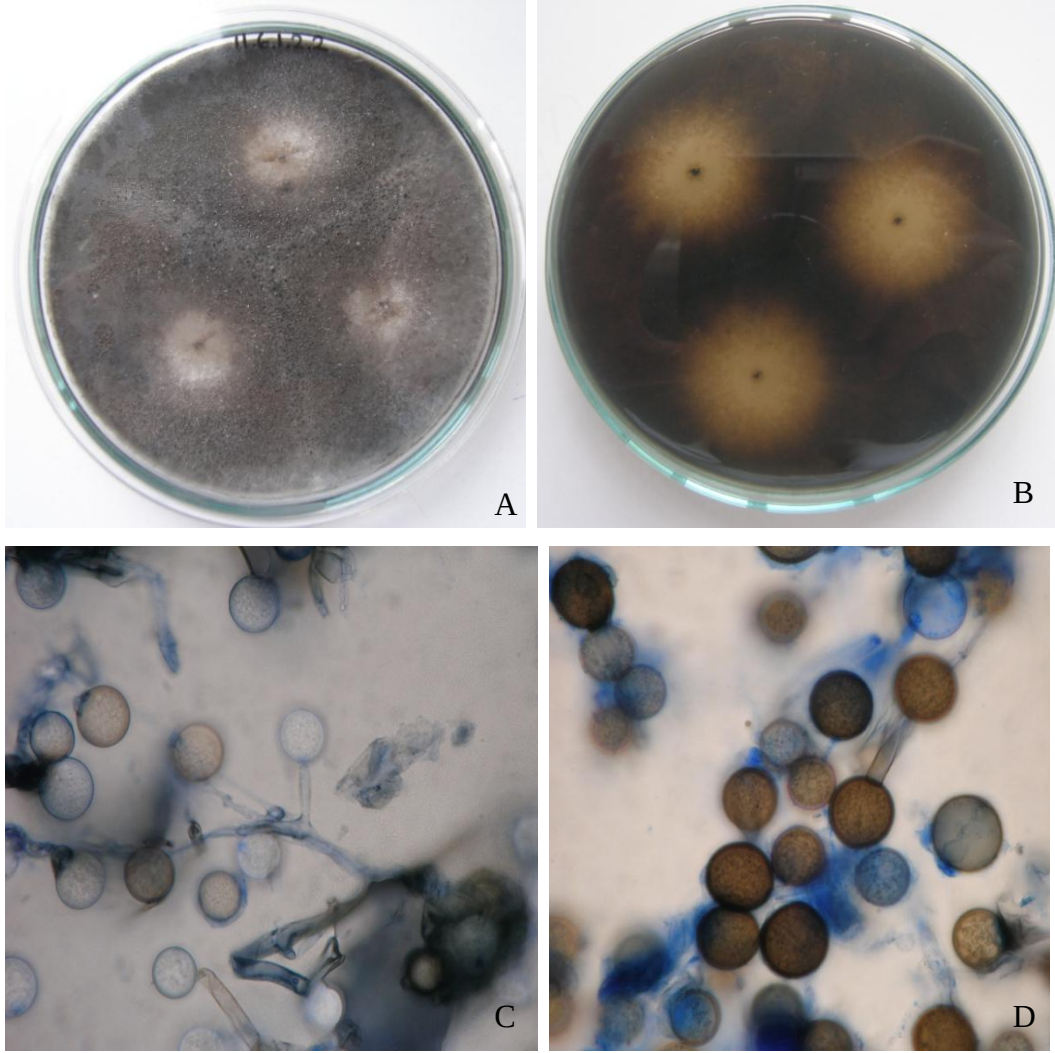


Şekil 3.5. *Humicola insolens*'in (A-B). MPÇNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D).
Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; Aleurosporlar ve hifler)

3.5.5. *Humicola grisea* var. *thermoidea* Cooney & R. Emers. (1964)

(Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Sordariomycetidae, Sordariales, Chaetomiaceae)

Yapılmış olan incelemeler sonucunda 11.6.1.2.2 kod numaralı izolat *Humicola grisea* var. *thermoidea* olarak tanımlanmıştır. İzolat Simav Naşa kaplıcasından izole edilmiştir. Bu izolat MPCNA ortamında oldukça hızlı gelişim göstererek, 45 °C'de 7 günde 60 mm çapına ulaşmıştır. Başlangıçta beyaz olan genç koloni aleuriyosporların gelişip olgunlaşması ile soluk siyah renk almıştır. Agarda çözünür pigmentasyon nedeniyle herhangi bir renk değişikliği olmamıştır. Işık mikroskopunda incelendiğinde; hifler renksiz ve 0,5-4,5 µm çapında olduğu belirlenmiştir. Bu türde sporlar dik açıyla oluşturulan yan dalların uçlarından tek tek oluştuğu gözlenmiştir. Bu yan dalların çok kısa ve aleuriyosporların ise soğan şeklinde olduğu görülmüştür. Olgunlaşmamış sporlar sarımsı kahve renkte olgunlaşınca koyu kahve renk aldığı gözlenmiştir. Aleuriyosporlar genellikle dairesi şekillerde, pürüzsüz duvarlı ve 8-16 µm boyutlarında olduğu belirlenmiştir. Bazen oval şeklinde gözlenen aleuriyosporların ise 12-16x8-12 µm boyutlarında olduğu belirlenmiştir.

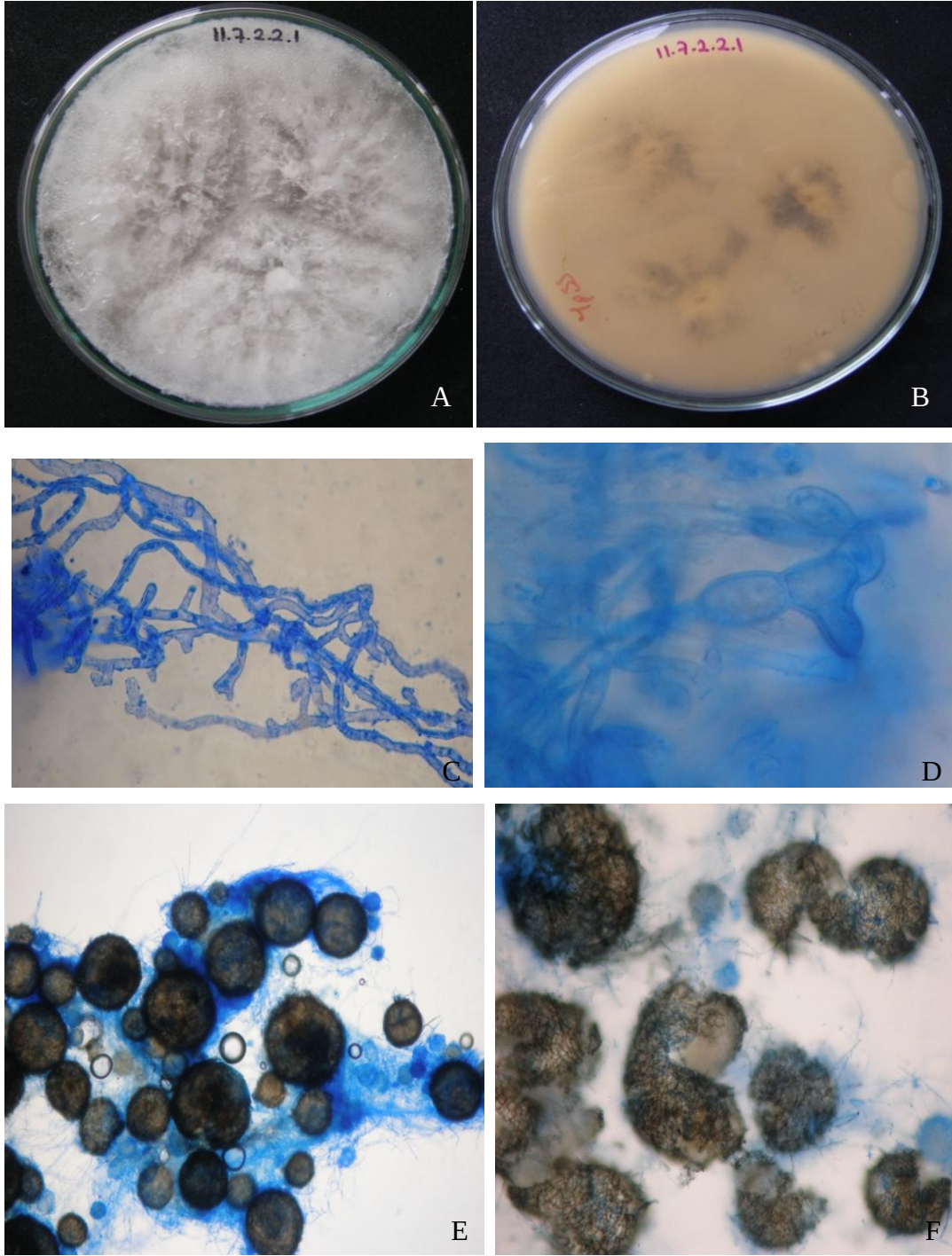


Şekil 3.6. *Humicola grisea* var. *thermoidea*'nın (A-B). MPÇNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D). Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; Genç ve olgun aleurosporlar ve hifler)

3.5.6. *Myriococcum albomyces* Cooney & R. Emers. (1964)

(Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Sordariomycetidae, Sordariales, Incertae sedis)

Makroskobik ve Mikroskobik incelemeler sonucunda *Myriococcum albomyces* türü olarak tayin edilen izolatların kod numaraları 11.6.2.2.1, 11.7.1.2.6, 11.7.1.2.12, 11.7.1.2.13, 11.7.2.2.1 dir ve bu izolatların tümü Gediz Ilıca kaplıcasından izole edilmiştir. Bu izolatların 45 °C’de MPÇNA ortamında geliştirilen kültürleri 7 günde tüm petriyi kaplamıştır. Koloni renkleri beyaz olup ve ters yüzden renksiz olarak görünmüştür. Stereo mikroskopla incelendiğinde agar yüzeyine yakın ve koloni merkezi etrafında siyah askokarplar görülmüştür. Işık mikroskopuyla incelendiğinde; İki tip misel yapısı görülmüştür. Havai hiflerin septalı, değişik kalınlıklarda, ince olanların 2 µm çapında, kalın olanların ise 12 µm’a kadar kalın olabildikleri belirlenmiştir. Sürünücü ve batık hiflerin ise septumlarla ayrılarak zincirler halinde gözlenen; silindirik, oval, dairemsi ve düzensiz olabilen çok değişik şekillerdeki kalın duvarlı hücrelerden oluştuğu gözlenmiştir. Bu hücrelerin çok kolay şekilde kopup, tek tek sanki bir konidyummuş gibi görüldüğü saptanmıştır. Bu türün bazı üyleri homothallic bazıları ise heterothallic olabilmektedir. *M. albomyces* olarak tanılanan izolatlardan 11.7.2.2.1, 11.7.1.2.13, 11.7.1.2.6 homotallik, 11.6.2.2.1, 11.7.1.2.12 ise heterotallik olduğu belirlenmiştir. Homotallik olanlarda gözlenen askokarpın dairesel şekilli, ostiolsüz, başlangıçta renksiz olgunlaşınca koyu kahverengi, 100-250 µm boyutlarında olduğu görülmüştür. Bazı türlerinde steril askokarplar oluşturulabilen bu fungusun incelenen askokarplarının da steril olduğu yani askospor oluşturmadığı belirlenmiştir.

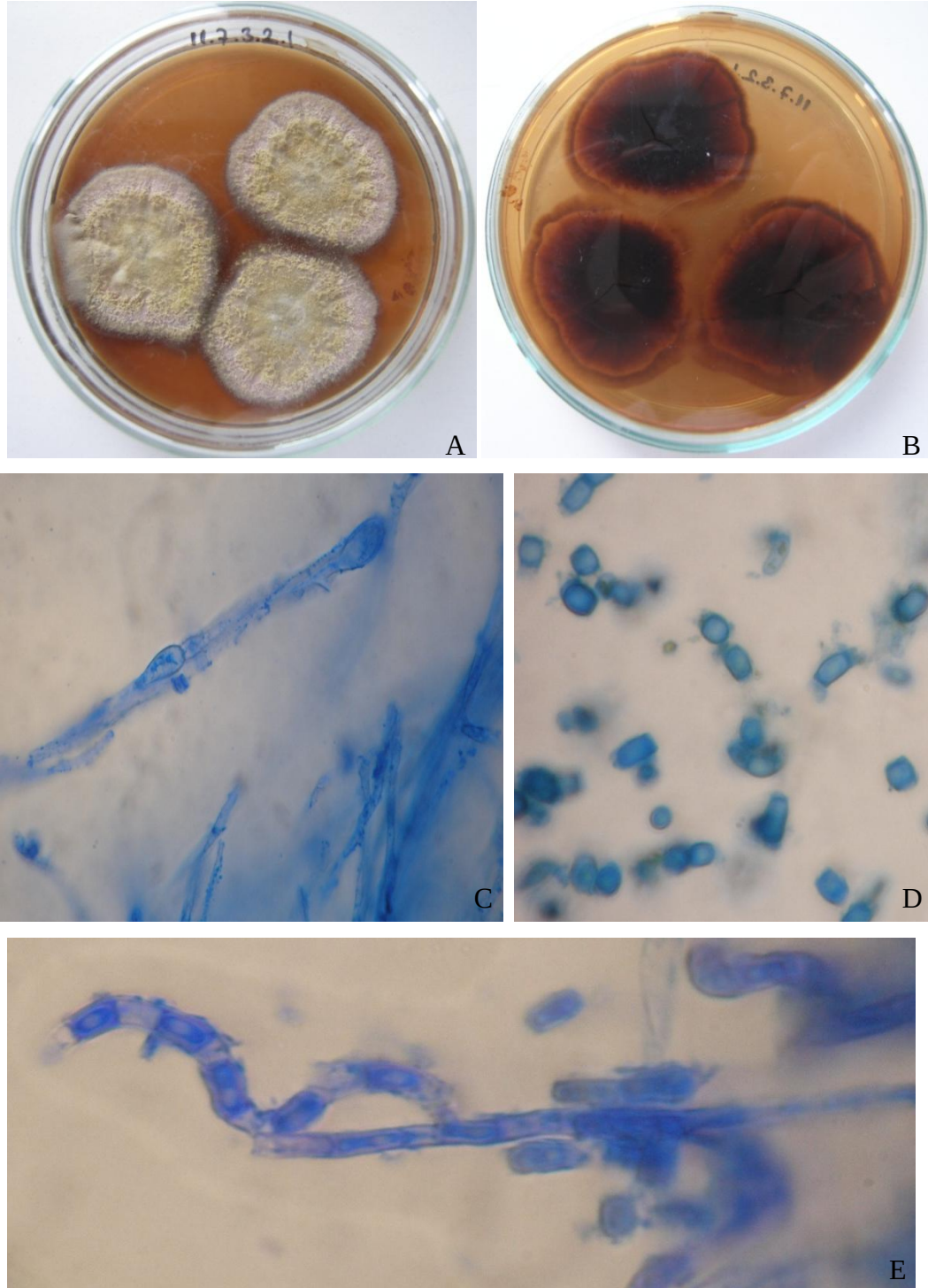


Şekil 3.7. *Myriococcum albomyces*'in (A-B). MPÇNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D-E-F). Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; havai, sürünücü ve batık hifler, genç ve olgun askokarplar)

3.5.7. *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* (Miehe) Cooney & R. Emers. 1964

(Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Incertae sedis, Incertae sedis, Myxotrichaceae)

11.7.1.2.2, 11.7.1.2.3, 11.7.2.2.2, 11.7.2.2.3, 11.7.3.2.1, 12.2.2.2.6, 13.2.2.1.1 kod numaralı izolatlar *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* olarak tanımlanmıştır. Kod numaraları 11.7.1.2.2, 11.7.1.2.3, 11.7.2.2.2, 11.7.2.2.3 ve 11.7.3.2.1 olan izolatlar Gediz Ilca kaplıcasından, 12.2.2.2.6 numaralı izolat Simav ilçesi Naşa kaplıcasından ve 13.2.2.1.1 numaralı izolat ise Hisarcık ilçesi Esire kaplıcasından izole edilmiştir. İzolatların MPÇNA ortamında 45 °C’de 7 günde gelişen kolonileri yaklaşık 3cm çapına ulaştığı ölçülmüştür. Koloniler koyu sarıdan kükürt sarısına kadar değişen renklerde görülmüştür. Sarı renkli eksudalar genellikle koloni merkezine yakın bölgelerde görülmüştür. Myceliumun genellikle keçemsi görünüşte olduğu ve yüksekliğinin 1 mm’den az olduğu belirlenmiştir. Miselyum koloni kenarlarında beyaz renkli olgunlaşan hiflerin bulunduğu bölgelerde ise sarı renge dönüştüğü gözlemiştir. Koloniler arkadan merkezde koyu kahverengi kenarlarda ise şarap kırmızısı renk almıştır. Kırmızımsı pigmentin agara da düfüze olduğu görülmüştür. Işık mikroskopunda incelendiğinde; genç hiflerin renksiz olgunlaşanlar ise sarı renkte, çaplarının ise 1,5-4,5 µm boyutlarında olduğu görülmüştür. Üretken hif düzensiz olarak septumlarla ayrılmıştır ve septumlara yakın bölgelerde şişkinlikler bulunduğu görülmüştür. Bu şişkinliklerin 10 µm’den daha büyük çapta olabildiği belirlenmiştir. Blok şeklindeki sporların hiflerin uçlarından tabanına doğru septumlanıp sonrada kopması ile oluştuğu belirlenmiştir. Bazen bu kalın çeperli sporlar ince çeperli steril hücrelerle birbirine bağlı zincirler halinde görülmüştür. Sporların soluk sarı veya renksiz, silindiriğe yakın şekilde, 3-7x3-4,5 µm boyutlarında olduğu belirlenmiştir.

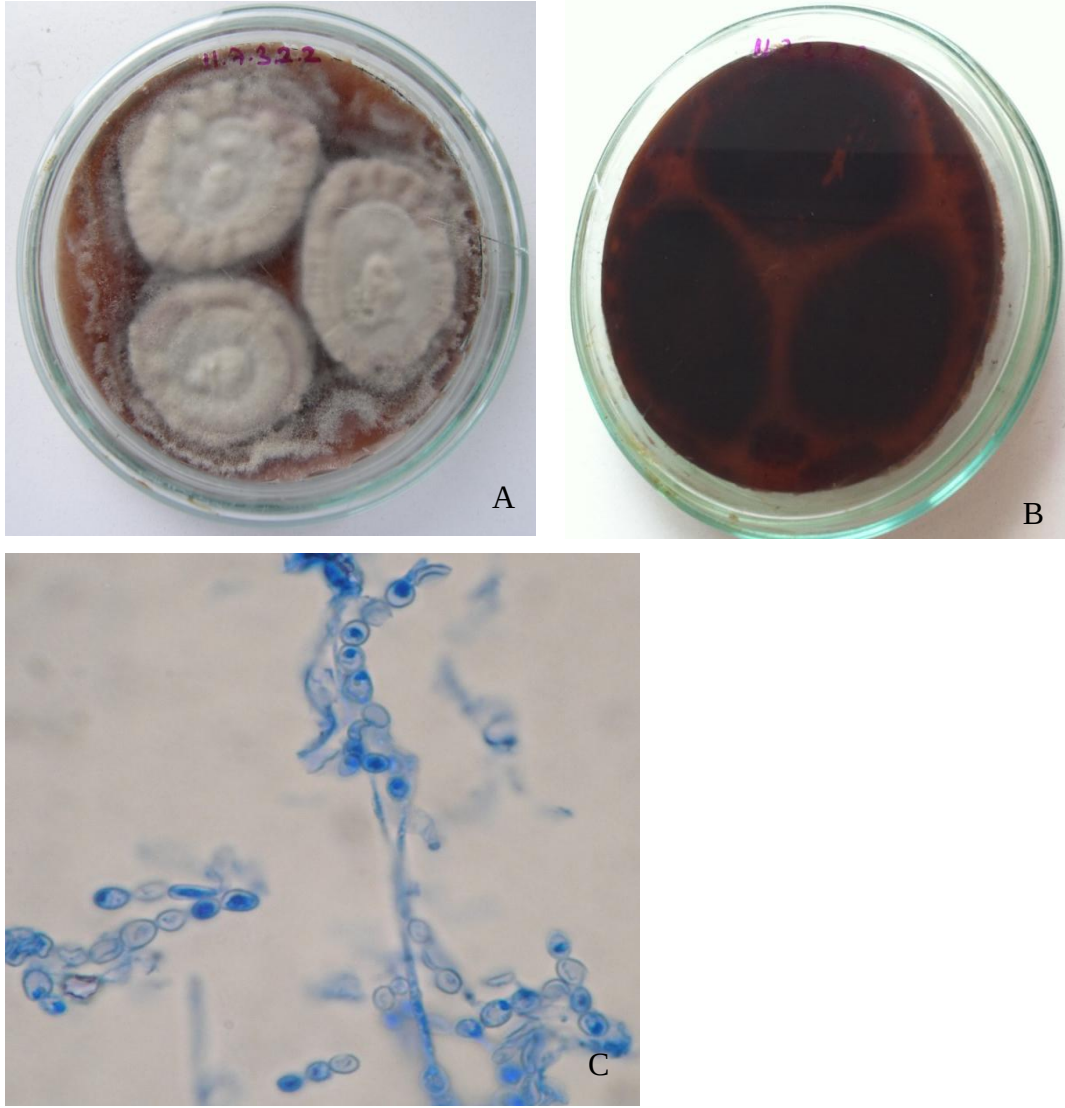


Şekil 3.8. *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*'nın (A-B). MPÇNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D-E). Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; üretken hif ve şişkinlikler, zincir ve tek tek blok benzeri sporlar)

3.5.8. *Myceliophthora thermophila* (Apinis) Oorschot (1977)

(*Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Onygenales, Incertae sedis*)

Makroskobik ve mikrokobik incelemeler sonucunda 11.7.3.2.2 kod numaralı izolat *Myceliophthora thermophila* olarak tanımlanmıştır. Bu izolat Gediz Ilıca kaplıcasından izole edilmiştir. MPÇNA ortamında ekildikten sonra 45 °C’de 7 günde gelişen koloniler yaklaşık 3 cm çapına ulaşmıştır. Koloniler ön yüzden soluk bej renginde ve hare hare görülen keçemsi bir yapıda olduğu görülmüştür. Koloniler ters yüzden ise kırmızımsı koyu kahverenginde görülmüştür. Eksuda oluşumu görülmemiştir. Çözünür pigmentasyon oluşturarak agarı portakal- kırmızımsı kahve renge dönüştürmüştür. Işık mikroskobunda incelendiğinde; hifleri renksiz ve 2 µm çapında, hiflerin yan dallarından oluşan konidyoforların uzunlukları bazen 35 µm’ı bulabildiği görülmüştür. Konidyoforların uçlarında oluşturulan konidyumların renksiz, oval veya armut şeklinde, 4-8x2-4 µm boyutlarında olduğu belirlenmiştir.

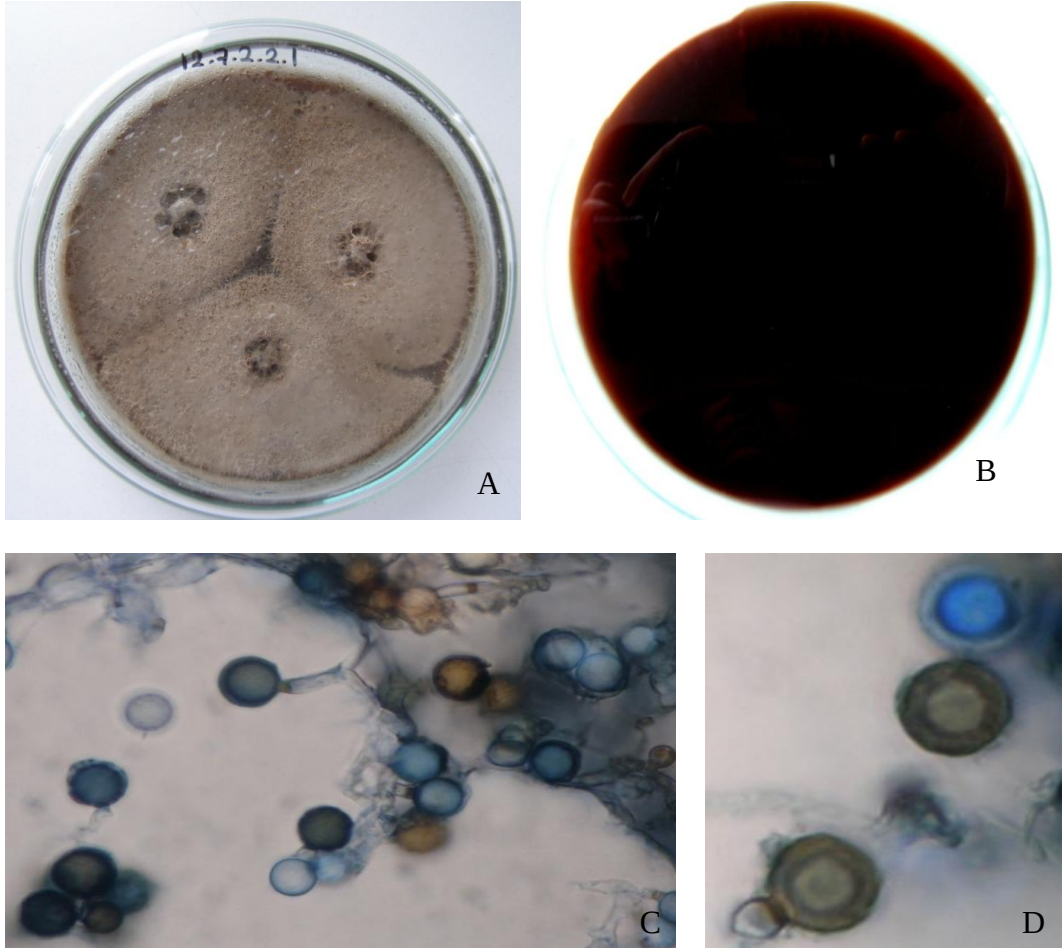


Şekil 3.9. *Myceliophthora thermophila*'nın (A-B). MPCNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C). Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; konidyofor ve zincir şeklindeki konidyumlar)

3.5.9. *Thermomyces lanuginosus* Tsiklinkskaya (1899)

(*Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Incertae sedis*)

Termofilik fungus izolatlarından 12.7.2.2.1 kod numaralı izolat *Thermomyces lanuginosus* olarak tanımlanmıştır. Bu izolat Simav ilçesi Naşa kaplıcasında izole edilmiştir. İzolat MPÇNA ortamında 45 °C’de 7 günlük koloni petri kabını tamamen kaplamıştır. Koloni başlangıçta beyaz ve keçe şeklinde olup, 1mm’den az yükseklikte olduğu belirlenmiştir. Daha sonra koloni merkezinden başlayarak gri-yeşilimsi gri renge dönmüştür. Olgunlaşan koloni eflatunumsu kahverengi bir hal almıştır. Koloni çözünür pigmentler salgılayarak agarı koyu pembe- şarap rengine boyamıştır. Işık mikroskobunda incelendiğinde; hiflerden dik açıyla oluşan kısa aleuriophoreların 10-15 µm uzunluğunda oldukları belirlenmiştir. Aleurosporlar aleurophoreların uçlarından tek tek oluştuğu görülmüştür. Olgunlaşmamış sporlar renksiz ve düz duvarlı görülürken, olgunlaşınca koyu kahverengi olup, kalın duvarlı bir hale geldiği belirlenmiştir. Olgun sporlardaki kalınlaşmış duvarın buruşuk bir hal alması ayırt edici bir özellik olarak gözlenmiştir. Olgun sporların daire şeklinde ve 6-10 µm boyutlarında olduğu belirlenmiştir. Hem genç hem de olgun aleurosporların aleurophorlardan kolayca ayrılabilirdiği görülmüştür. Genellikle aleurosporlar aleurophorlardan ayrılırken bağlantı noktasının biraz altından koptuğu için sporların küçük bir aleurophor parçasını bir çıkıntı halinde üzerinde taşıdıkları belirlenmiştir.

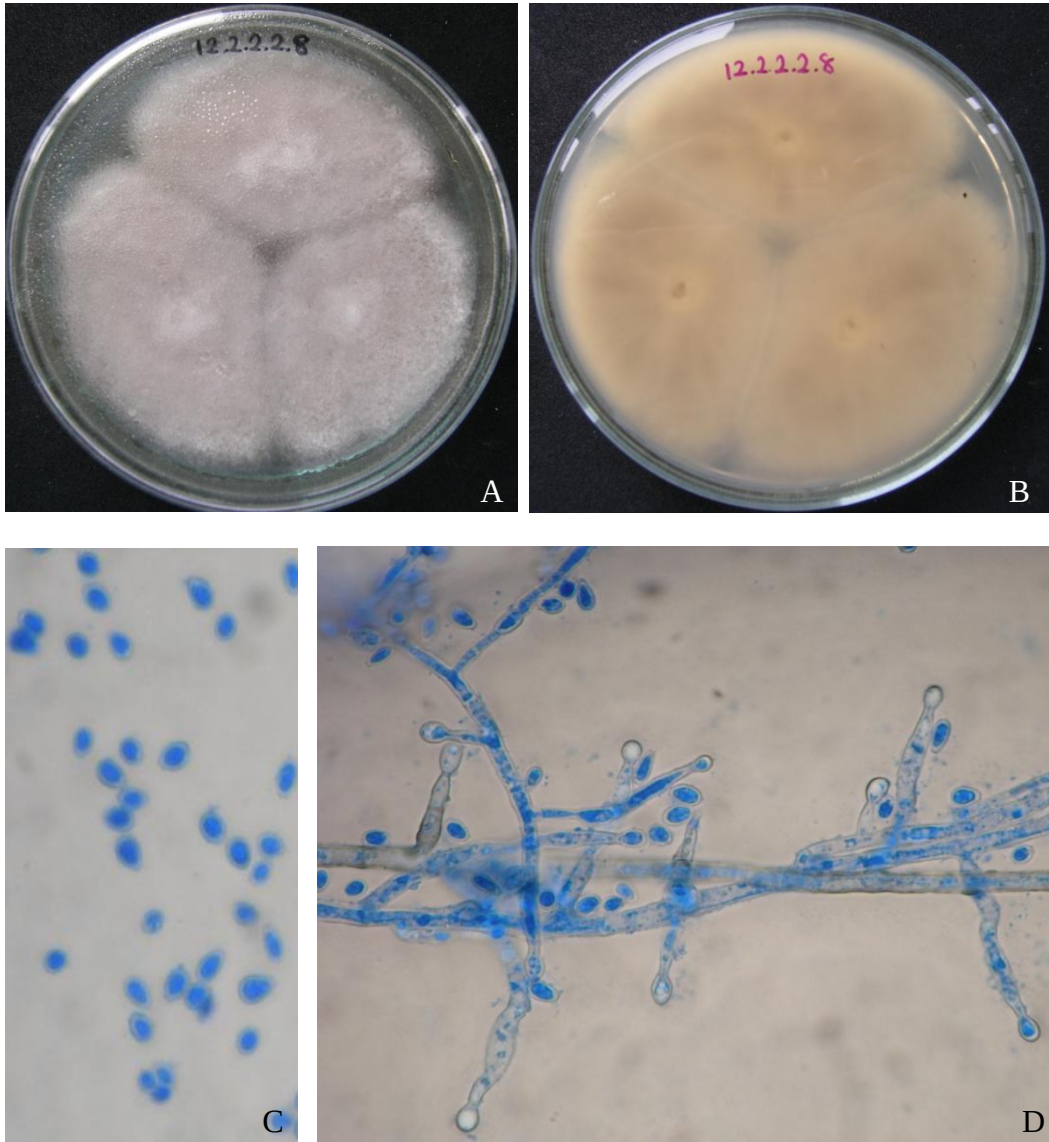


Şekil 3.10. *Thermomyces lanuginosus*'un (A-B). MPÇNA besiyerlerinde ön ve ters yüzen görünüşü, (C-D). Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; Genç ve olgun aleurosporlar ve aleurphorlar)

3.5.10. *Thielavia terrestris* (Apinis) Malloch & Cain (1972)

(Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Sordariomycetidae, Sordariales, Chaetomiaceae)

Morfolojik tanılama çalışması için yapılan incelemelerle 12.2.2.2.8 kod numaralı isolat *Thielavia terrestris* olarak tanımlanmıştır. Bu izolat Simav ilçesi Naşa kaplıcasından izole edilmiştir. MPCNA ortamında 45 °C’de 7 günde gelişen koloniler petri kabını tamamen kaplamıştır. Kolonilerin ön yüzden soluk pembemsi-beyaz renkte ve yünümsü bir yapıda olduğu görülmüştür. Kolonilerin ters yüzden ise pembemsi soluk bej renkte olduğu belirlenmiştir. Eksuda ve çözünür pigmentasyon gözlenmemiştir. Işık mikroskobunda incelendiğinde; havasal misellerin şeffaf veya açık kahverengi, düzenli olarak septalı, 2-4 µm çapında ve genellikle kısmen şişkin hücrelerden oluştuğu belirlenmiştir. Hiflerin yan dallarında oluşan konidyogenik hücrelerin başlangıçta kısa ancak konidyumların oluşumu esnasında uzadıkları görülmüştür. Konidyoforların uçlarında tek tek oluşturulan konidyumlar clavate, obovate veya pyriform şekilde, tabanı turunkat, tek hücreli, renksiz, 3-6 x 2-4 µm boyutlarında olduğu belirlenmiştir. İncelenen izolatta askomata gözlenmemiştir.

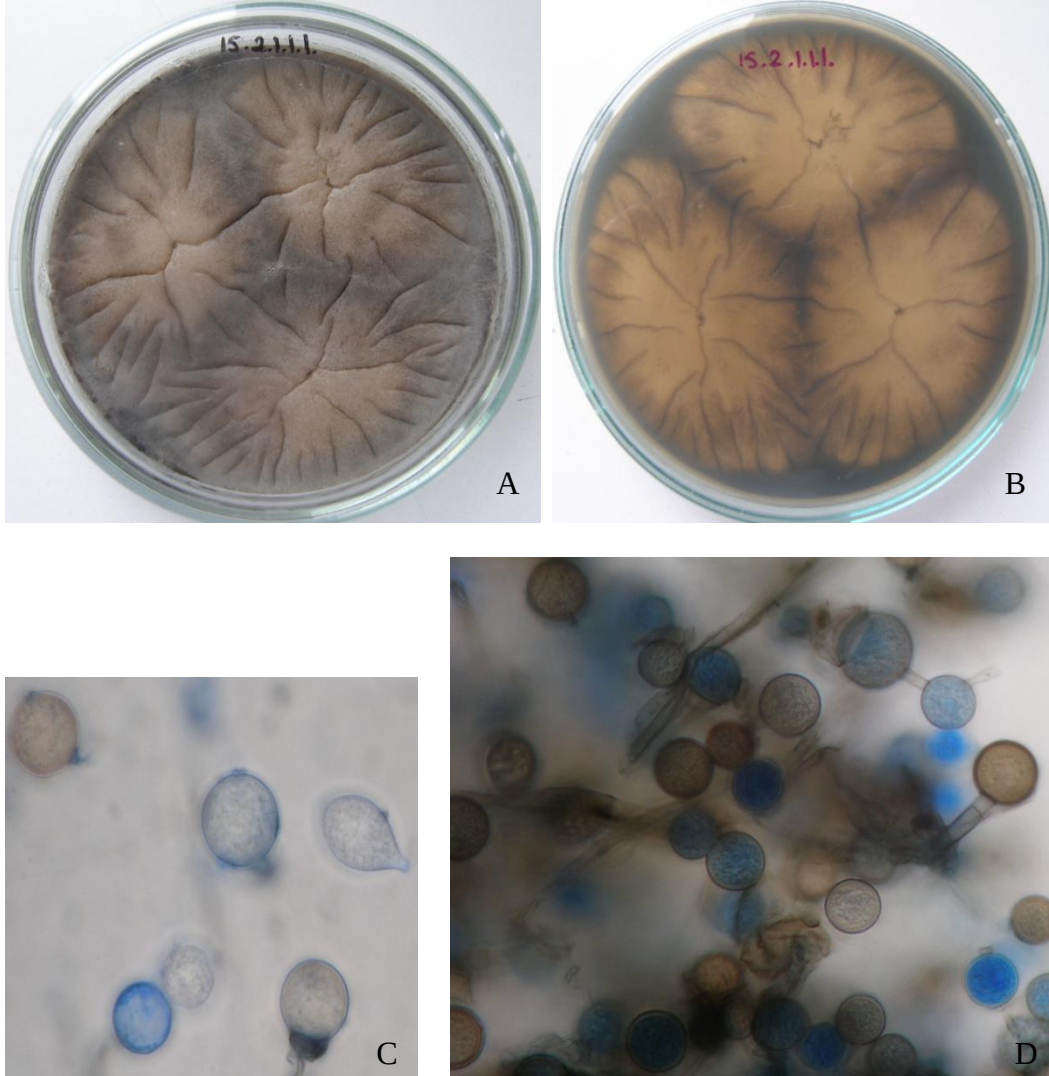


Şekil 3.11. *Thielavia terrestris*'in (A-B). MPÇNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D). Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; konidyumlar ve hifler üzerindeki konidyoforlar)

3.5.11. *Scytalidium thermophilum* (Cooney & R. Emers.) Austwick (1976)

(Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Leotiomyces, Leotiomycetidae, Helotiales, Incertae sedis)

Morfolojik tanımlama için yapılmış olan incelemeler sonucunda *Scytalidium thermophilum* olarak tanımlanan izolatların kod numaraları 13.3.1.2.2 ve 15.2.1.1.1 dir. 13.3.1.2.2 numaralı izolat Hisarcık ilçesi Esire kaplıcasından ve 15.2.1.1.1 numaralı izolat ise Dereli kaplıcasından izole edilmiştir. İzolatlar MPÇNA ortamında oldukça hızlı gelişim göstererek, 45 °C’de 7 günde tüm petriyi kaplamışlardır. Başlangıçta beyaz olan genç koloniler aleuriyosporların gelişip olgunlaşması ile grimsi siyah renk almıştır ve ışınal yarıklar oluşmuştur. Işık mikroskopunda incelendiğinde; hiflerin renksiz ve 2-3,5 µm çapında ve septalı oldukları görülmüştür. Aleuriyosporların yan dalların uçlarından tek tek ve ya kısa zincirler halinde oluştuğu gözlenmiştir. Olgunlaşmamış sporların renksiz veya sarı renkte olgunlaşınca açık kahve renk aldığı belirlenmiştir. Aleuriyosporların genellikle dairemsi şekillerde ve 9-12 µm boyutlarında, şişe şeklinde olan aleuriyosporların ise 10-11 x 6-7 µm boyutlarında olduğu belirlenmiştir.

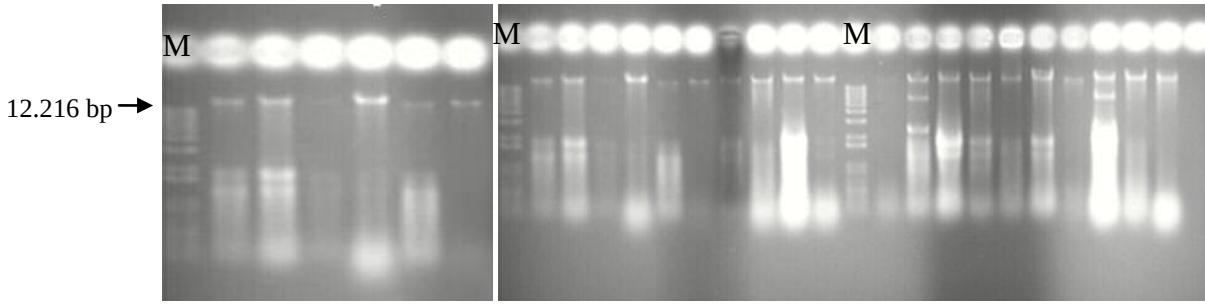


Şekil 3.12. *Scytalidium thermophilum*'un (A-B). MPCNA besiyerlerinde ön ve ters yüzden görünüşü, (C-D). Mikroskopik görünüşü (ışık mikroskobu 100x; Genç ve olgun aleurosporlar ile hifler)

3.6. Termofilik Fungusların Moleküler Tanılanması

3.6.1. DNA İzolasyonu

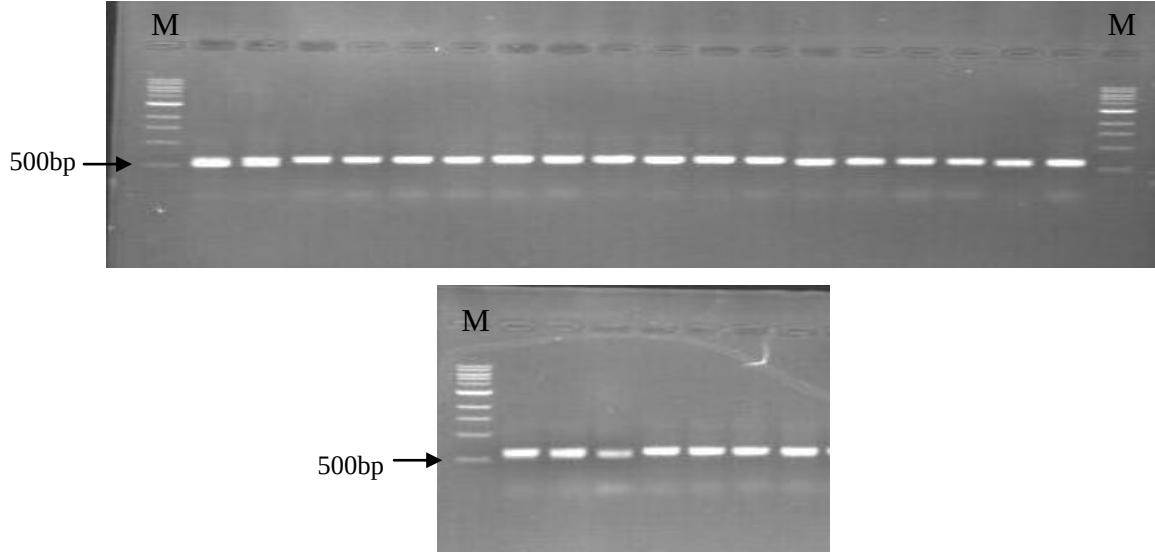
Morfolojik tanılamaları tamamlanmış olan termofilik mikrofungus izolatlarının moleküler tanılamalarının ilk adımı olan genomik DNA ekstraksiyon sonucu Şekil 3.13’de verilmiştir. Termofilik fungusların moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere DNA ekstraksiyonlarının cam boncuk ve vorteksleme yöntemi (Van Burik ve ark., 1998, Janso ve ark., 2005) modifiye edilerek kullanılmasının uygun olduğu sonucuna varılmıştır. 12.216 bp daha büyük olduğu belirlenen DNA bantlarının altlarında kalan bantlaşmaların yöntem içerisinde RNaz uygulanmamasından dolayı gözlenen RNAlar olduğu düşünülmüştür.



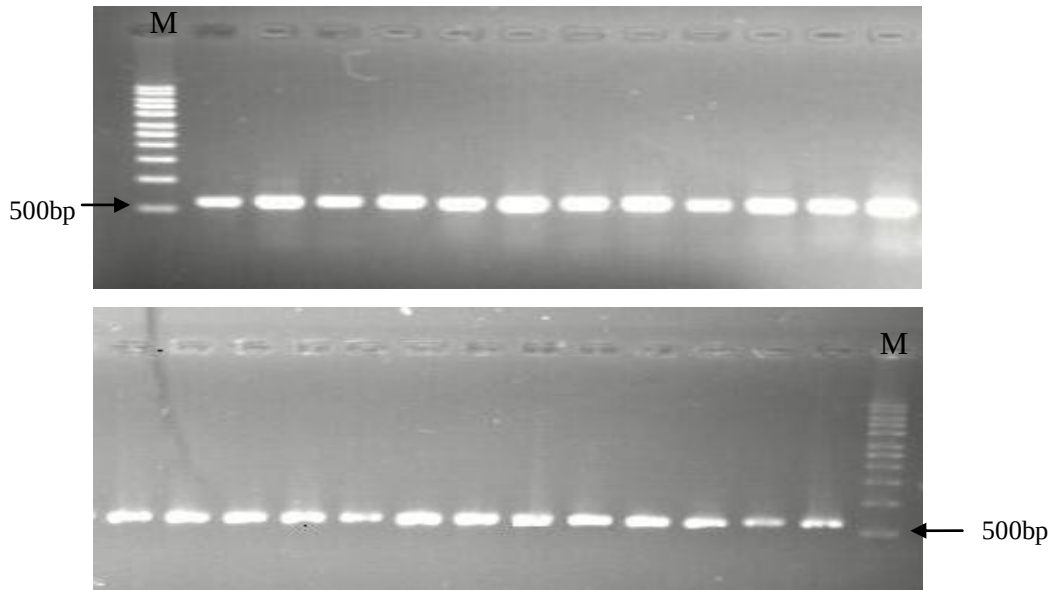
Şekil 3.13. Genomik DNA izolasyon sonucu (M: 1 kb marker, izolat numaraları soldan sağa: 11.2.1.2.1, 11.1.1.1.1, 11.6.1.2.1, 11.6.1.2.2, 11.6.2.2.1, 11.7.1.2.3, 11.7.2.2.3, 11.7.1.2.13, 11.7.3.2.2, 12.2.2.2.8, 12.6.1.2.1, 12.6.3.2.2, 13.1.2.1.1, 12.2.2.2.6, 12.7.2.2.1, 11.7.3.2.1, 11.7.2.2.2, 11.7.1.2.2, 11.7.1.2.12, 11.7.2.2.1, 11.7.1.2.6)

3.6.2. İncelenen Gen Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifikasyonu ve Saflaştırılması

ITS1-ITS4 primer çifti kullanılarak ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi 570 bp boyutunda (Şekil 3.14), LR0R and LR3 primer çifti kullanılarak rDNA (26–28S)’nın büyük alt ünitesinin yüksek değişken D1/D2 bölgesi 550 bp boyutunda (Şekil 3.15) amplifiye edilmiştir. Ve elde edilen PCR ürünleri, Illustra GFX PCR



Şekil 3.14. Kısmi ITS1-5.8S-ITS2 bölgesine ait PCR sonucu (M: 1 kb marker, izolat numaraları soldan sağa: 11.1.1.1.1, 11.6.1.2.1, 11.6.2.2.1, 11.7.1.2.3, 11.7.2.2.3, 11.2.1.2.1, 11.7.3.2.2, 12.2.2.2.8, 12.6.1.2.1, 12.6.3.2.2, 13.1.2.1.1, 12.2.2.2.6, 12.7.2.2.1, 11.7.3.2.1, 11.7.2.2.2, 11.6.1.2.2, 11.7.1.2.2, 11.7.1.2.12, 11.7.2.2.1, 11.7.1.2.6, 11.7.1.2.13)



Şekil 3.15. D1/D2 bölgesine ait PCR sonucu (M: 1 kb marker, izolat numaraları soldan sağa: 11.6.1.2.1, 11.7.1.2.3, 11.7.2.2.3, 11.2.1.2.1, 11.7.3.2.2, 12.2.2.2.8, 12.6.1.2.1, 12.6.3.2.2, 13.1.2.1.1, 12.2.2.2.6, 12.7.2.2.1, 11.7.3.2.1, 11.7.2.2.2, 11.6.1.2.2, 11.7.1.2.2, 11.6.2.2.1, 11.7.1.2.12, 11.7.2.2.1, 11.1.1.1.1, 11.7.1.2.6, 11.7.1.2.13)

DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, formerly Amersham Biosciences, 28-9034-71) kullanılarak saf halde elde edilmiştir.

3.6.3. Saflaştırılmış PCR Ürünlerinden Dizi Analizi

Termofilik fungus izolatlarının kısmi ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi ve rDNA (26–28S)’nın büyük alt ünitesinin yüksek değişken D1/D2 bölgelerinin dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dizi bilgileri Blast programı ile değerlendirilerek her bir izolatın NCBI gen bankasında benzerlik gösterdiği türler belirlenmiştir (Tablo 3.8). NCBI gen bankasındaki karşılaştırmalar sonucunda: 11.1.1.1 numaralı izolat ITS bölgesine göre %91, D1/D2 bölgesine göre ise %90 oranında *Talaromyces thermophilus* ile benzeştiği; 11.2.1.2.1 numaralı izolat ITS bölgesine göre %98, D1/D2 bölgesine göre ise %99 oranında *Rhizomucor pusillus* ile benzeştiği; 11.6.1.2.1 numaralı izolat ITS bölgesine göre %98, D1/D2 bölgesine göre ise %95 oranında *Myceliophthora hinnulea* ile benzeştiği; 11.6.1.2.2 numaralı izolat ITS ve D1/D2 bölgelerine göre ise %99 oranında *Humicola grisea* ile benzeştiği; 11.6.2.2.1 numaralı izolat ITS bölgesine göre %100, D1/D2 bölgesine göre ise %99 oranında *Melanocarpus albomyces* ile benzeştiği; 11.7.1.2.2 numaralı izolat ITS bölgesine göre %96, D1/D2 bölgesine göre ise %99 oranında *Malbranchea cinnamomea* ile benzeştiği; 11.7.1.2.3 numaralı izolat ITS bölgesine göre %98, D1/D2 bölgesine göre ise %100 oranında *Malbranchea cinnamomea* ile benzeştiği; 11.7.1.2.6 numaralı izolat ITS bölgesine göre %99, D1/D2 bölgesine göre ise %97 oranında *Melanocarpus albomyces* ile benzeştiği; 11.7.1.2.12 numaralı izolat ITS bölgesine göre %99, D1/D2 bölgesine göre ise %97 oranında *Melanocarpus albomyces* ile benzeştiği; 11.7.1.2.13 numaralı izolat ITS bölgesine göre %99, D1/D2 bölgesine göre ise %100 oranında *Melanocarpus albomyces* ile benzeştiği; 11.7.2.2.1 numaralı izolat ITS bölgesine göre %99, D1/D2 bölgesine göre ise %90 oranında *Melanocarpus albomyces* ile benzeştiği; 11.7.2.2.2 numaralı izolat ITS ve D1/D2 bölgesine göre ise %99 oranında *Malbranchea cinnamomea* ile benzeştiği; 11.7.2.2.3 numaralı izolat ITS bölgesine göre %95, D1/D2 bölgesine göre ise %99 oranında *Malbranchea cinnamomea* ile benzeştiği; 11.7.3.2.1 numaralı izolat ITS bölgesine göre %94, D1/D2 bölgesine göre ise %95 oranında *Malbranchea cinnamomea* ile benzeştiği; 11.7.3.2.2 numaralı izolat ITS bölgesine göre %99, D1/D2 bölgesine göre ise %97

oranında *Myceliophthora thermophila* ile benzeştiği; 12.2.2.2.6 numaralı izolat ITS bölgesine göre %96, D1/D2 bölgesine göre ise %98 oranında *Malbranchea cinnamomea* ile benzeştiği; 12.2.2.2.8 numaralı izolat ITS bölgesine göre %99, D1/D2 bölgesine göre ise %95 oranında *Thielavia terrestris* ile benzeştiği; 12.6.1.2.1 numaralı izolat ITS bölgesine göre %98, D1/D2 bölgesine göre ise %91 oranında *Talaromyces thermophilus* ile benzeştiği; 12.6.3.2.2 numaralı izolat ITS bölgesine göre %97, D1/D2 bölgesine göre ise %99 oranında *Rhizomucor pusillus* ile benzeştiği; 12.7.2.2.1 numaralı izolat ITS bölgesine göre %98, D1/D2 bölgesine göre ise %95 oranında *Thermomyces lanuginosus* ile benzeştiği; 13.1.2.1.1 numaralı izolat ITS bölgesine göre %99, D1/D2 bölgesine göre ise %91 oranında *Rhizomucor pusillus* ile benzeştiği; 13.2.2.1.1 numaralı izolat ITS bölgesine göre %98, D1/D2 bölgesine göre ise %100 *Malbranchea cinnamomea* ile benzeştiği; 13.3.1.2.2 numaralı izolat ITS bölgesine göre %97, D1/D2 bölgesine göre ise %99 oranında *Scytalidium thermophilum* ile benzeştiği; 13.3.2.2.3 numaralı izolat ITS bölgesine göre %99, D1/D2 bölgesine göre ise %96 oranında *Humicola insolens* ile benzeştiği; 15.2.1.1.1 numaralı izolat ITS bölgesine göre %94, D1/D2 bölgesine göre ise %99 oranında *Scytalidium thermophilum* ile benzeştiği belirlenmiştir.

3.6.4. Dizilenen Gen Bölgelerinin Analizi

Filogenetik ağaç “MEGA v. 5.0” programı kullanılarak, Neighbour-Joining metoduna göre elde edilmiştir. Oluşan dalların istatistiksel olarak doğruluğu “bootstrap” analizi ile 1000 kez örnekleme yapılarak belirlenmiştir. 2 filogenetik ağaç elde edilmiştir. Birincisi ITS1-5.8S-ITS2 bölgesine ait dizi bilgileri, ikincisi ise D1/D2 bölgesine ait dizi bilgileri ve NCBI gen bankasındaki en yakın ilişkili oldukları türlerin dizi bilgileri kullanılarak çizilmiştir. İncelenen izolatlarla ait ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi ve rDNA (26–28S)’nın büyük alt ünitesinin yüksek değişken D1/D2 bölgesi genlerine ait dizi analizi bilgileri kullanılarak elde edilen soy ağaçları ve evrimsel gelişim süreçleri Şekil 3.16-3.17’de verilmiştir.

Şekil 3.16’de görüldüğü gibi elde edilen izolatların ITS1-5.8S-ITS2 gen tabanında birbirleri ile olan evrimsel ilişki ele alınmıştır. Ağacın istatistiksel

güvenilirliği incelendiğinde “bootstrap” değerlerinin %50’nin üzerinde olduğu noktalarda dallanma topolojisinin güvenilir olduğu anlaşılmıştır. *Rhizomucor pusillus* olarak tanımlanan 11.2.1.2.1, 12.6.3.2.2, 13.1.2.1.1 kod numaralı 3 izolatın gen bankasından alınan diğer *Rhizomucor pusillus*lar ile %99 yakın akraba olduklarını ve aynı küme içerisinde yer aldıklarını göstermiştir. *Melanocarpus albomyces* olarak tanımlanan 11.6.2.2.1, 11.7.1.2.6, 11.7.1.2.12, 11.7.1.2.13, 11.7.2.2.1 kod numaralı 5 izolat aynı küme içerisinde çıkmıştır. *Humicola grisea* olarak tanımlanan 11.6.1.2.2 kod numaralı izolat, *Humicola insolens* olarak tanımlanan 13.3.2.2.3 kod numaralı izolat ve *Scytalidium thermophilum* olarak tanımlanan 13.3.1.2.2, 15.2.1.1.1 kod numaralı 2 izolat ile yakın akraba türler “bootstrap” tekrarlarının %67sinde birbirleri ile akraba oldukları bir grup içerisinde toplanmışlardır. Fakat *Humicola insolens* türleri bu grup içerisinde bazal bir grup oluşturmuşlardır. *Malbranchea cinnamomea* olarak tanımlanan 11.7.1.2.2 hariç 11.7.1.2.3, 11.7.2.2.2, 11.7.2.2.3, 11.7.3.2.1, 12.2.2.2.6, 13.2.2.1.1 kod numaralı 6 izolat %99 aynı küme içerisinde toplandığı görülmektedir. 11.7.1.2.2 ise bu grup ile bazal konumda bir dalda bulunmaktadır. ITS1-5.8S-ITS2 bölgesinin dizi bilgilerine dayanarak *Talaromyces thermophilus* türlerinin *Thermomyces lanuginosus* türleri ile yakın akraba oldukları görülmüştür. BLAST ile elde edilen sonuçlar ağacın topolojisini desteklemektedir.

Şekil 3.17’de görüldüğü gibi elde edilen izolatların rDNA (26–28S)’nın büyük alt ünitesinin yüksek değişken D1/D2 bölgesi gen tabanında birbirleri ile olan evrimsel ilişki ele alınmıştır. Ağacın istatistiksel güvenilirliği incelendiğinde %39 değeri hariç “bootstrap” değerlerinin oldukça yüksek olduğu ve bu nedenle ağaç topolojisinin güvenilirliğinin çok iyi olduğu anlaşılmıştır. *Rhizomucor pusillus* olarak tanımlanan 11.2.1.2.1, 12.6.3.2.2, 13.1.2.1.1 kod numaralı 3 izolatın gen bankasından alınan diğer *Rhizomucor pusillus*lar ile %100 yakın akraba olduklarını ve aynı küme içerisinde yer aldıklarını göstermiştir. *Melanocarpus albomyces* olarak tanımlanan 11.6.2.2.1, 11.7.1.2.6, 11.7.1.2.12, 11.7.1.2.13, 11.7.2.2.1 kod numaralı 5 izolat %98 güvenilirlikle aynı küme içerisinde çıkmıştır. *Humicola grisea* olarak tanımlanan 11.6.1.2.2 kod numaralı izolat, *Humicola insolens* olarak tanımlanan 13.3.2.2.3 kod numaralı izolat ve *Scytalidium thermophilum* olarak tanımlanan 13.3.1.2.2, 15.2.1.1.1 kod numaralı

Tablo 3.8. Dizi analizi gerçekleştirilen izolatların belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri

İzolat no.	Dizi analizinde kullanılan primer	Ulaşım numarası	NCBI Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı	Elde edilen dizi uzunluğu, Eşleşen Sayısı Baz	Benzeşme Yüzdesi (%)
11.1.1.1.1	ITS4	FJ548825.1	<i>Talaromyces thermophilus</i> strain YM14	617 537/588	91
	LR3	JF412001.1	<i>Talaromyces thermophilus</i> strain NRRL 2155	478 407/452	90
11.2.1.2.1	ITS4	HQ404246.1	<i>Rhizomucor pusillus</i> strain SC-A1	591 502/510	98
	LR3	JX088738.1	<i>Rhizomucor pusillus</i> strain GSMBKU-09	586 559/562	99
11.6.1.2.1	ITS4	JF412015.1	<i>Myceliophthora hinnulea</i> strain ATCC 52474	761 434/444	98
	LR3	JQ067900.1	<i>Myceliophthora hinnulea</i>	502 439/460	95
11.6.1.2.2	ITS4	AJ131856.1	<i>Humicola grisea</i> isolate IMI 126329	530 464/468	99
	LR3	AB625578.1	<i>Humicola grisea</i> isolate	532 465/468	99
11.6.2.2.1	ITS4	JF412014.1	<i>Melanocarpus albomyces</i> strain ATCC 16460	445 445/445	100
	LR3	JQ067902.1	<i>Melanocarpus albomyces</i>	556 537/538	99
11.7.1.2.2	ITS4	JF412018.2	<i>Malbranchea cinnamomea</i> strain CBS 343.55	510 480/500	96
	LR3	JQ067903.1	<i>Malbranchea cinnamomea</i>	511 499/509	99
11.7.1.2.3	ITS4	JF922020.1	<i>Malbranchea cinnamomea</i> strain CBS960.72	591 502/510	98
	LR3	JQ067903.1	<i>Malbranchea cinnamomea</i>	569 531/531	100

Tablo 3.8. (Devam) Dizi analizi gerçekleştirilen izolatların belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri

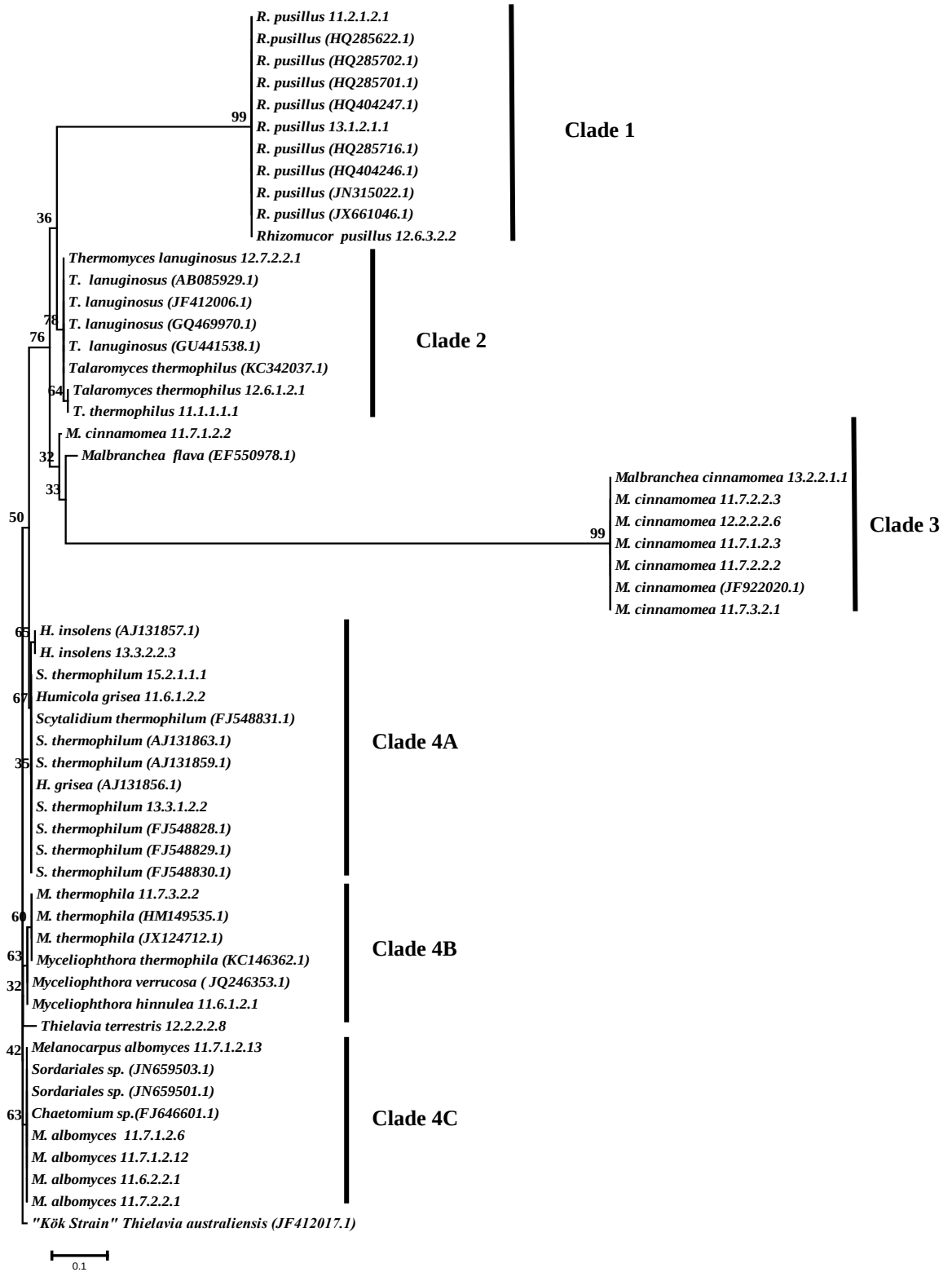
İzolat no.	Dizi analizinde kullanılan primer	Ulaşım numarası	NCBI Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı	Elde edilen dizi uzunluğu, Eşleşen Baz Sayısı	Benzeşme Yüzdesi (%)
11.7.1.2.6	ITS4	JF412014.1	<i>Melanocarpus albomyces</i> strain ATCC 16460	726 398/400	99
	LR3	JQ067902.1	<i>Melanocarpus albomyces</i>	449 435/448	97
11.7.1.2.12	ITS4	JF412014.1	<i>Melanocarpus albomyces</i> strain ATCC 16460	500 443/445	99
	LR3	JQ067902.1	<i>Melanocarpus albomyces</i>	593 552/568	97
11.7.1.2.13	ITS4	JF412014.1	<i>Melanocarpus albomyces</i> strain ATCC 16460	752 414/417	99
	LR3	JQ067902.1	<i>Melanocarpus albomyces</i>	562 562/562	100
11.7.2.2.1	ITS4	JF412014	<i>Melanocarpus albomyces</i> strain ATCC 16460	606 586/592	99
	LR3	JQ067902.1	<i>Melanocarpus albomyces</i>	410 386/427	90
11.7.2.2.2	ITS4	JF412018.2	<i>Malbranchea cinnamomea</i> strain CBS 343.55	565 509/513	99
	LR3	JQ067903.1	<i>Malbranchea cinnamomea</i>	584 580/584	99
11.7.2.2.3	ITS4	JF922020.1	<i>Malbranchea cinnamomea</i> CBS960.72	889 547/575	95
	LR3	JQ067903.1	<i>Malbranchea cinnamomea</i>	583 579/583	99
11.7.3.2.1	ITS4	JF922020.1	<i>Malbranchea cinnamomea</i> strain CBS960.72	342 300/320	94
	LR3	JQ067903.1	<i>Malbranchea cinnamomea</i>	502 467/491	95

Tablo 3.8. (Devam) Dizi analizi gerçekleştirilen izolatların belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri

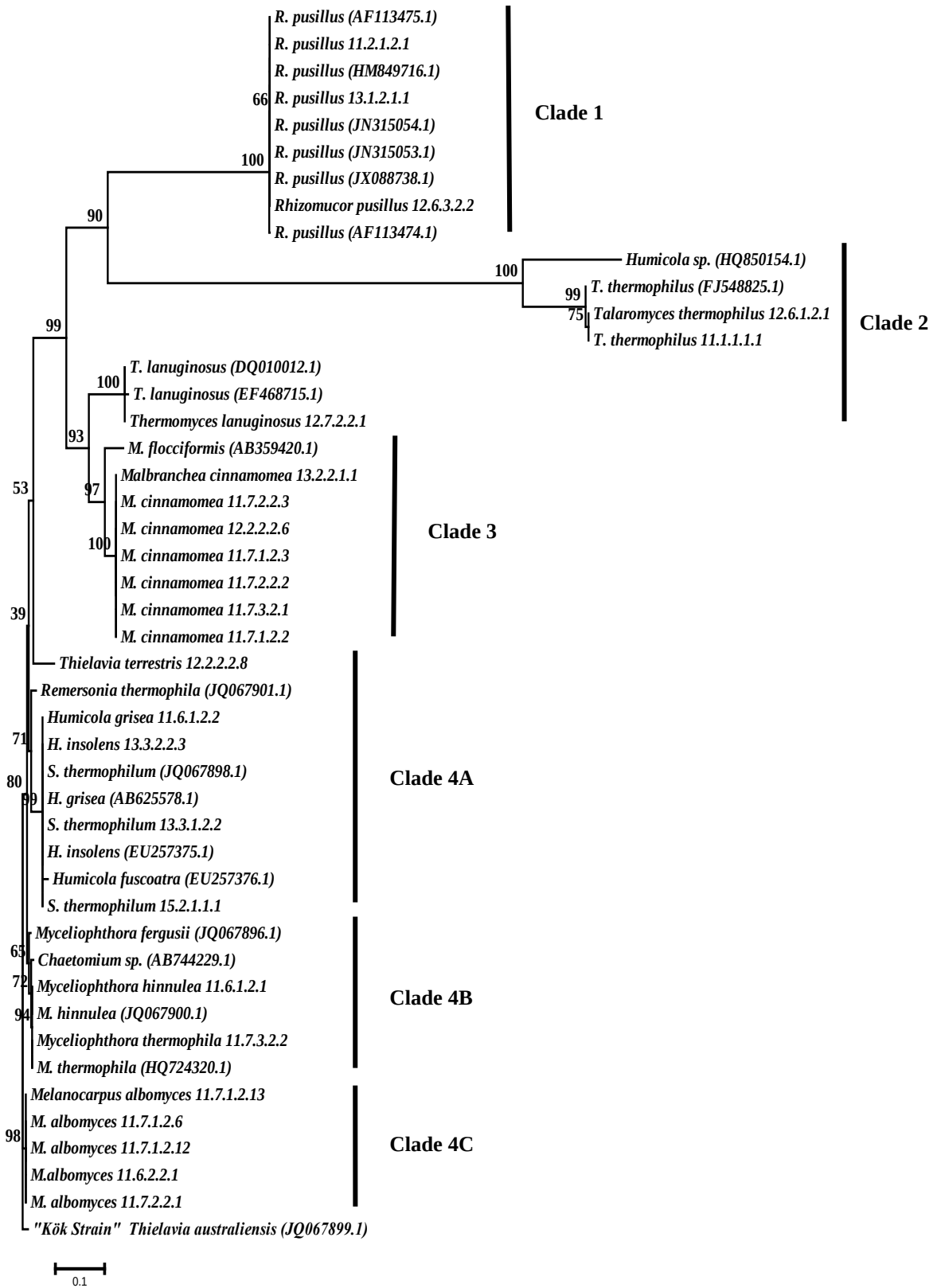
İzolat no.	Dizi analizinde kullanılan primer	Ulaşım numarası	NCBI Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı	Elde edilen dizi uzunluğu, Eşleşen Baz Sayısı	Benzeşme Yüzdesi (%)
11.7.3.2.2	ITS4	HQ724321.1	<i>Myceliophthora thermophila</i> strain UAMH	506 460/467	99
	LR3	KC146378.1	<i>Myceliophthora thermophila</i> strain ATCC 48104	499 458/471	97
12.2.2.2.6	ITS4	JF922020.1	<i>Malbranchea cinnamomea</i> strain CBS960.72	469 283/296	96
	LR3	JQ067903.1	<i>Malbranchea cinnamomea</i>	595 512/523	98
12.2.2.2.8	ITS4	AJ271589.1	<i>Thielavia terrestris</i> NRRL 8126	506 460/467	99
	LR3	HQ231972.1	<i>Thielavia terrestris</i> strain CBS 456.75	592 554/582	95
12.6.1.2.1	ITS1	FJ548825.1	<i>Talaromyces thermophilus</i> strain YM14	1037 581/590	98
	LR3	JF412001.1	<i>Talaromyces thermophilus</i> strain NRRL 2155	517 457/403	91
12.6.3.2.2	ITS4	HM999962.1	<i>Rhizomucor pusillus</i> strain CBS 425.78	874 510/525	97
	LR3	HM849716.1	<i>Rhizomucor pusillus</i> strain CBS 354.68	579 554/557	99
12.7.2.2.1	ITS4	FJ548827.1	<i>Thermomyces lanuginosus</i> strain T12	808 458/467	98
	LR3	AY323232.1	<i>Thermomyces lanuginosus</i> YNUCC4154	465 424/446	95

Tablo 3.8. (Devam) Dizi analizi gerçekleştirilen izolatların belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri

İzolat no.	Dizi analizinde kullanılan primer	Ulaşım numarası	NCBI Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı	Elde edilen dizi uzunluğu, Eşleşen Baz Sayısı	Benzeşme Yüzdesi (%)
13.1.2.1.1	ITS4	HQ404243.1	<i>Rhizomucor pusillus</i> strain HS-A5	600 588/590	99
	LR3	JX088738.1	<i>Rhizomucor pusillus</i> strain GSMBKU-09	617 537/588	91
13.2.2.1.1	ITS4	JF922020.1	<i>Malbranchea cinnamomea</i> strain CBS960.72	485 473/482	98
	LR3	JQ067903.1	<i>Malbranchea cinnamomea</i>	523 523/523	100
13.3.1.2.2	ITS4	FJ548831.1	<i>Scytalidium thermophilum</i> strain B1	508 458/471	97
	LR3	JQ067898.1	<i>Scytalidium thermophilum</i>	573 567/570	99
13.3.2.2.3	ITS4	AJ131857.1	<i>Humicola insolens</i> isolate IMI 126330	528 514/520	99
	LR3	EU257375.1	<i>Humicola insolens</i>	585 497/517	96
15.2.1.1.1	ITS4	AJ131862.1	<i>Scytalidium thermophilum</i> strain IMI 243118	466 428/457	94
	LR3	JQ067898.1	<i>Scytalidium thermophilum</i>	580 556/564	99



Şekil 3.16. İncelenen izolatların ITS dizilerine dayalı filogenetik ilişkilerinin incelenmesi: Tamura-Nei modeline dayalı olarak Neighbor Joining yöntemi, 1000 tekrarlı (Bootstrap 1000). Dış grup: *Thielavia australiensis* (JF412017.1)



Şekil 3.17. İncelenen izolatların D1/D2 dizilerine dayalı filogenetik ilişkilerinin incelenmesi: Tamura-Nei modeline dayalı olarak Neighbor Joining yöntemi, 1000 tekrarlı (Bootstrap 1000). Dış grup: *Thielavia australiensis* (JQ067899.1)

2 izolat ile yakın akraba türler “bootstrap” tekrarlarının %99’unda birbirleri ile akraba oldukları bir grup içerisinde toplanmışlardır. *Malbranchea cinnamomea* olarak tanımlanan 11.7.1.2.2, 11.7.1.2.3, 11.7.2.2.2, 11.7.2.2.3, 11.7.3.2.1, 12.2.2.2.6, 13.2.2.1.1 kod numaralı 7 izolat %100 aynı küme içerisinde toplandığı görülmektedir. BLAST ile elde edilen sonuçlar ağacın topolojisini desteklemektedir.

3.7. Fitaz Enzimi Üreten Türlerin Kültürel Ortamlarda Belirlenmesi

Fitaz tarama besiyerinde gerçekleştirilmiş olan tarama sonucunda izolatlarımızın %44’ ünün az veya çok seviyede olmak üzere fitaz ürettiği belirlenmiştir. Fitaz enzimi ön tarama çalışmaları sonucunda termofilik küflerden 3 tanesinin (11.7.1.2.3- *Malbranchea cinnamomea*, 11.7.3.2.2- *Myceliophthora thermophila*, 12.7.2.2.1- *Thermomyces lanuginosus*) ekildikleri petrilerde 0,3 cm’den daha büyük şeffaf zon oluşumu gözlenmiştir. 12.7.2.2.1 kodlu izolat ise petriyi tamamen dolduracak şekilde yaygın gelişim göstermiş ve PSM besiyerindeki opaklığı tamamen gidermiştir (Şekil 3.18). Tarama çalışmaları sonucunda izolatların fitaz tarama ortamında oluşturdukları zonlar değerlendirilerek en büyük şeffaf zonu oluşturan beş izolat KFF üretiminde değerlendirilmek üzere seçilmiştir. Bu izolatlar 11.7.3.2.2 numaralı *Myceliophthora thermophila*, 11.7.1.2.12 numaralı *Melanocarpus albomyces*, 11.2.1.2.1 numaralı *Rhizomucor pusillus*, 11.7.1.2.6 numaralı *Melanocarpus albomyces* ve 12.7.2.2.1 numaralı *Thermomyces lanuginosus* dur. Bu tarama çalışmasının detaylı sonuçları Tablo 3.9’da verilmiştir.

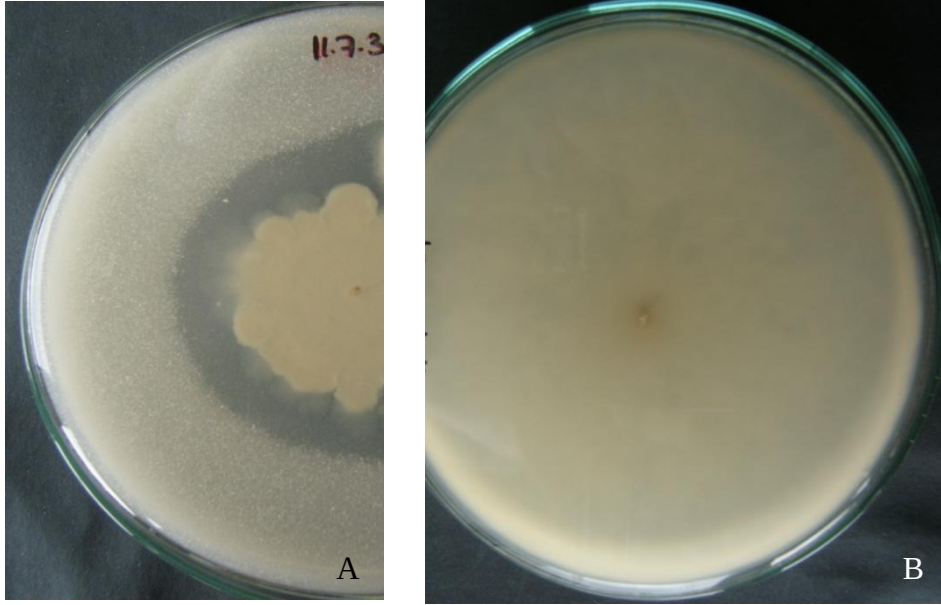
3.8. Katı Faz Fermentasyonu (KFF) Yoluyla Fitaz Üretimi

3.8.1. Kalibrasyon Grafiğinden Eğim Değerinin Belirlenmesi

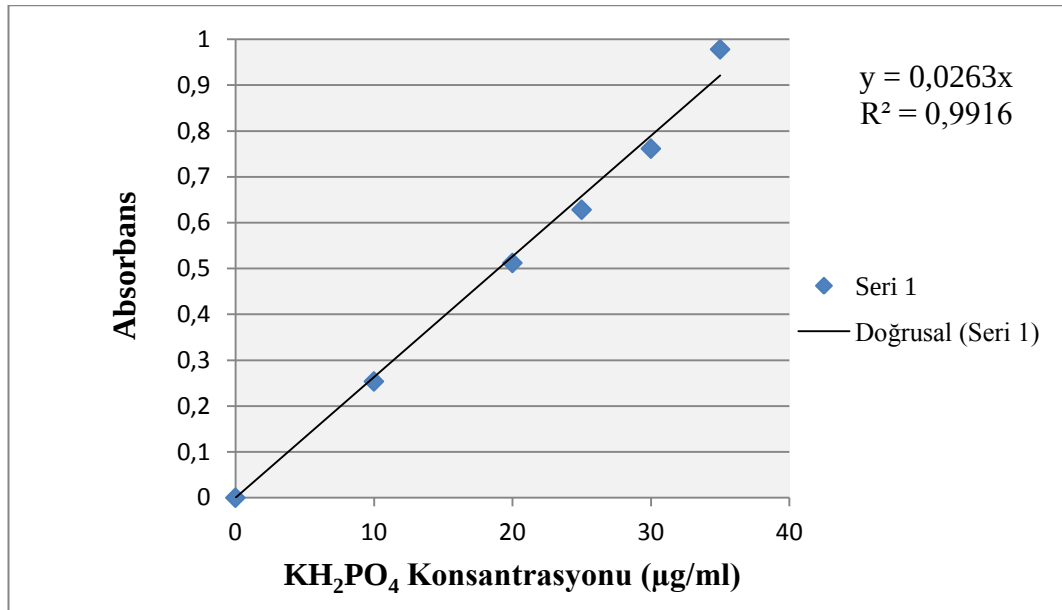
Fitaz aktivitesinin yorumlanması için, 10µg/ml ile 35µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanan KH_2PO_4 çözeltilerinin 820 nm’deki absorbans değerleri saptanmıştır. Şekil 3.19’da KH_2PO_4 konsantrasyonları ve absorbans değerleri arasındaki doğrusal ilişki verilmiştir.

Tablo 3.9. Termofilik fungusların fitaz tarama sonuçları ***[(-) : gelişim var, şeffaf zon yok, (+): şeffaf zon<0,3 cm, (++) : 0,3 cm<şeffaf zon<0,5 cm, (+++): 0,5 cm<şeffaf zon]**

İzolat no.	Zon oluşum derecesi*
11.1.1.1.1	+
11.2.1.2.1	+
11.6.1.2.1	-
11.6.1.2.2	-
11.6.2.2.1	gelişmedi
11.7.1.2.2	+
11.7.1.2.3	-
11.7.1.2.6	++
11.7.1.2.12	+
11.7.1.2.13	-
11.7.2.2.1	-
11.7.2.2.2	+
11.7.2.2.3	gelişmedi
11.7.3.2.1	+
11.7.3.2.2	+++
12.2.2.2.6	+
12.2.2.2.8	-
12.6.1.2.1	+
12.6.3.2.2	+
12.7.2.2.1	+++
13.1.2.1.1	gelişmedi
13.2.2.1.1	+
13.3.1.2.2	-
13.3.2.2.3	-
15.2.1.1.1	-



Şekil 3.18. Fitaz tarama ortamında gerçekleştirilmiş olan tarama sonucu görünüşü (A: 11.7.3.2.2; B: 12.7.2.2.1)



Şekil 3.19. Fitaz aktivitesi için kalibrasyon grafiği

3.8.2. KFF Ortamında En İyi Fitaz Aktivitesine Sahip Türün Seçilmesi

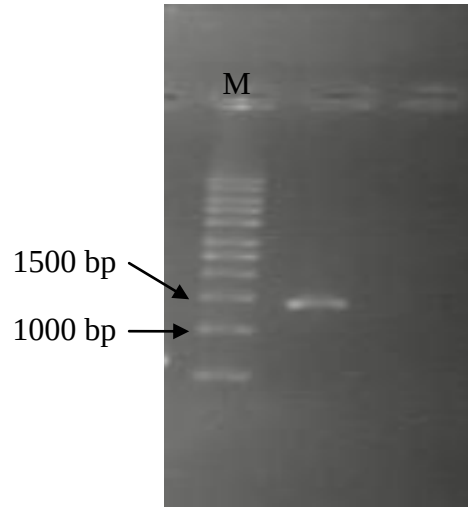
Fitaz enzimi üreten türlerin kültürel ortamlarda belirlenmesi için yapılan taramalar sonucunda seçilen beş izolat KFF üretimine alınmıştır. Enzim üretimi ve optimizasyonu için kullanılmak üzere, seçilen 11.7.3.2.2 (*Myceliophthora thermophila*), 11.7.1.2.12 (*Melanocarpus albomyces*), 11.2.1.2.1 (*Rhizomucor pusillus*), 11.7.1.2.6 (*Melanocarpus albomyces*) ve 12.7.2.2.1 (*Thermomyces lanuginosus*) kod numaralı beş termofilik fungus KFF üretim ortamında 45 °C’de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında elde edilen ham enzim ekstraktları ile yapılan fitaz aktivite analizleri sonucunda 12.7.2.2.1 izolat numaralı *Thermomyces lanuginosus*’un en yüksek aktivite (0,286 U/ml/dk) gösteren tür olduğu belirlenmiştir (Tablo 3.10). Yapılmış olan optimizasyon ve diğer analizlerde bu suşun ürettiği ekstraselüler fitaz enzimi kullanılmıştır.

Tablo 3.10. Kültürel ortamda seçilmiş izolatlardan KFF ile elde edilen fitaz aktiviteleri

İzolat No.	Fitaz Aktivitesi (U/ml/dk)
11.2.1.2.1	0,011130
11.7.1.2.6	0,006138
11.7.1.2.12	0,009575
11.7.3.2.2	0,006138
12.7.2.2.1	0,286433

3.9. Fitaz Geninin Varlığının Moleküler Tekniklerle Taranması

Bu aşamada, kültürel ortamda yapılan taramalar ve KFF çalışması ile diğer suşlara kıyasla yüksek oranda fitaz ürettiği belirlenen ve katı faz fermentasyon ile fitaz üretimi için seçilen 12.7.2.2.1 izolat numaralı *Thermomyces lanuginosus*’un fitaz geninin varlığı belirlenmiştir. Bu fungusun fitaz enzimini üretmekten sorumlu gen bölgesinin bu bölgeye özel UP ve DP primerleri ile pozitif amplifikasyon oluşturmaları sağlanmıştır. Fitaz enzimini üretmekten sorumlu gen bölgesi 1488 bp boyutunda (Şekil 3.20) amplifiye edilmiştir. Ve elde edilen PCR ürünü, Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, formerly Amersham Biosciences, 28-9034-71) kullanılarak saf halde elde edilmiştir.



Şekil 3.20. Kısmi 3-phytaseA bölgesine ait PCR sonucu (M: 1 kb marker)

Thermomyces lanuginosus izolatlarının kısmi fitaz gen bölgesinin DP primeri ile dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dizi bilgisi aşağıda fasta formunda verilmiştir. Bu dizi bilgisinin blast programı ile değerlendirilerek “Genozymes Project Public Genomes” gen bankasında “3-phytaseA, *Thermomyces lanuginosus*” geni ile %98 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 3.11).

>*Thermomyces lanuginosus*’un dizi analizi ile belirlenen fitaz enzimini üretmekten sorumlu kısmi gen dizisi

```
ATGGCGGGGATAGGTTTGGGGTCCTTTCTGGTCCTGCTGCTGCAATTGTACGCA
TTCTTCTAGACCCTAATTATAGAGGTCTGTTGCTGATATTCTGACTAGTTCGGC
ATTATTGACGGCCTCGCCGGCCATTTCCTCCTTTCTGGAGGAAGAAGCATCCCAA
CGTGGACATTGCCCCGCCACTGGGGCCAGTACTCGCCCTTCTTCTCGCTGGCCGA
GGTCTCTGAAATCTCGCCTGCGGTGCCAAGGGCTGTCGTGTCGAGTTTGTGCA
GGTGCTGTCCCGGCACGGAGCTCGGTATCCTACTGCTCACAAGAGTGAAGTCTA
CGCCGAGTTGCTTCAAAGGATCCAGGACACTGCGACCGAGTTCAAGGGCGATTT
TGCCTTTCTCCGAGACTATGCCTATCATCTCGGTGCCGATAATTTGACGCGCTT
TGGCGAGGAGCAGATGATGGAATCGGGCCGCCAGTTCTACCACCGGTATCGTGA
GCAGGCCCCGAGAGATTGTGCCATTTGTGCGTGCGGCAGGCTCCGCGCGAGTCAT
TGCGTCGGCAGAGTTCTTCAACCGCGGATTCCAGGATGCCAAAGACCGGGATCC
CAGGTCTGAACAAGGACCAGGCAGAGCCTGTGATCAACGT
```

Tablo 3.11. Dizi analizi gerçekleştirilen fitaz gen bölgesinin belirlenen en yakın Genozymes Project Public Genomes gen bankası temsilcisi

Dizi analizi primeri	Ulaşım numarası	Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı	Dizi uzunluğu, Eşleşen Baz Sayısı	Benzeşme Yüzdesi (%)
DP	Thela2p4_004929	3-phytaseA <i>Thermomyces lanuginosus</i>	635 581/590	98

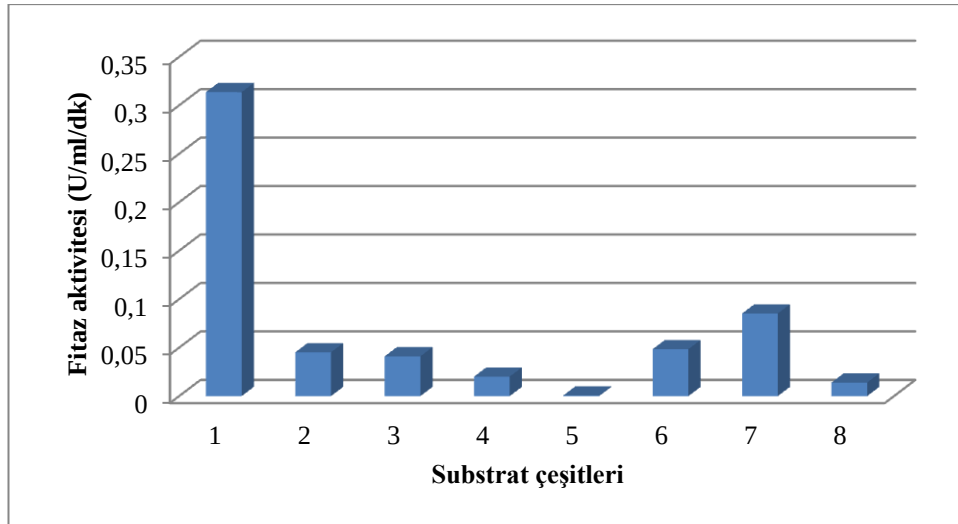
3.10. KFF'deki Üretim Koşullarının *Thermomyces lanuginosus*'un Fitaz Sentezi Üzerine Etkisi

3.10.1. Klasik Yöntemle Optimizasyon

KFF'de fungustan enzim üretiminde substrat türü, başlangıç nem düzeyi, inokulum miktarı ve üretim süresi; her bir parametrenin birbirinden bağımsız olarak test edilmesi ile optimize edilmiştir.

3.10.1.1. Uygun Substrat Seçimi

Thermomyces lanuginosus'dan enzim üretiminde en uygun substratı belirlemek için KFF'de buğday kepeği, pirinç kepeği, yulaf kepeği, çavdar kepeği, arpa kepeği, bonkalit, öğütülmüş ayçiçeği sapı ve öğütülmüş fındık kabuğu substrat olarak kullanılmıştır. En yüksek enzim sentezinin pirinç kepeği içeren KFF ortamında gerçekleştiği yapılan aktivite ölçümleri sonucu belirlenmiştir. Substrat olarak çavdar kepeği içeren KFF ortamında fitaz enzim aktivitesinin en düşük miktarı elde edilmiştir (Şekil 3.21).



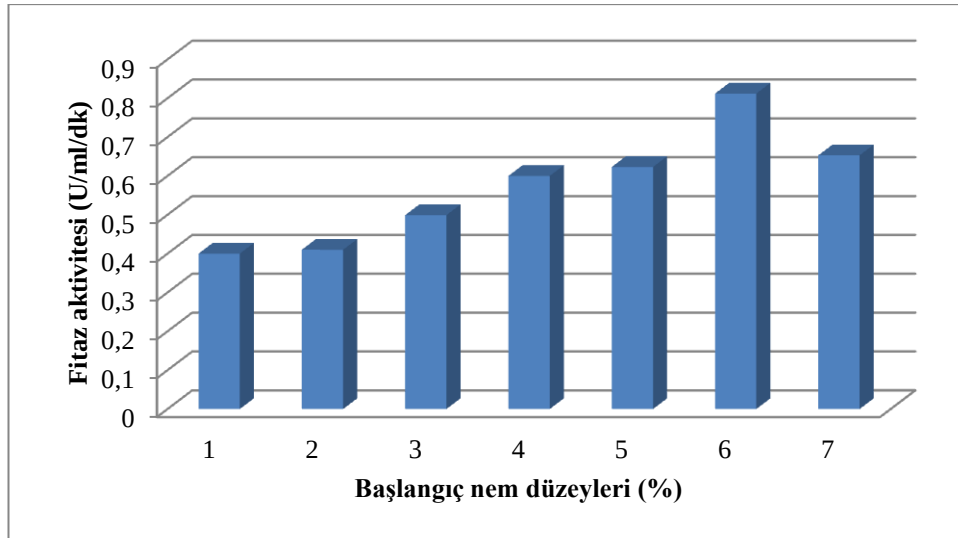
Şekil 3.21. Fitaaz sentezine bazı substratların etkisi (1, pirinç kepeği; 2, yulaf kepeği; 3, buğday kepeği; 4, bonkalit; 5, çavdar kepeği; 6, arpa kepeği; 7, ayçiçeği sapı; 8, fındık kabuğu)

3.10.1.2. Başlangıç Nem Düzeyinin Etkisi

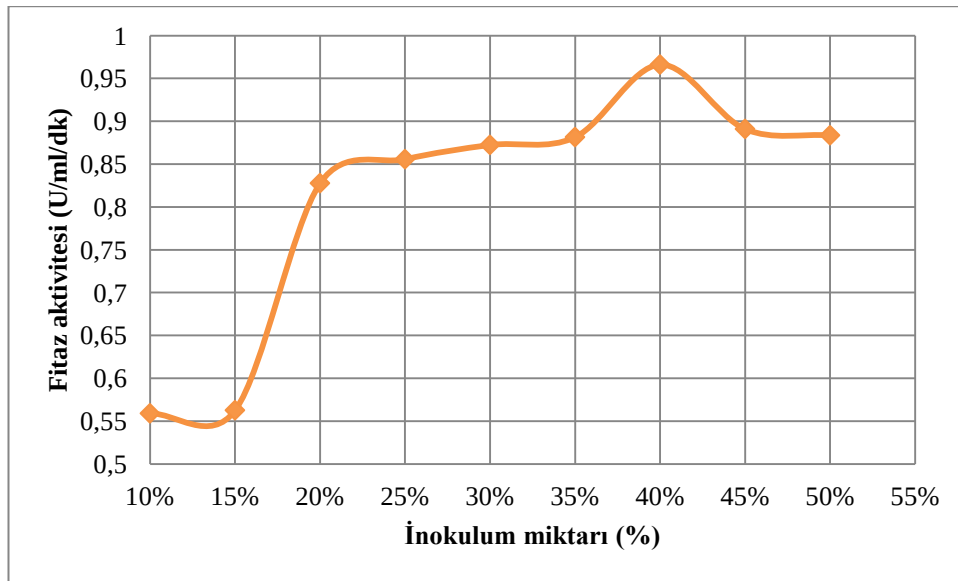
Farklı oranlarda başlangıç nem düzeylerine sahip, substrat olarak pirinç kepeğinin kullanıldığı KFF çalışmalarının sonucunda en yüksek enzim aktivitesi nem oranı %70 olan ortamda elde edilmiştir. Ortamlardan elde edilen aktivitelerin küçükten büyüğe başlangıç nem düzeyine göre sıralanışı; % 20, 30, 40, 50, 60, 80, 70 şeklindedir (Şekil 3.22).

3.10.1.3. İnokulum Miktarının Etkisi

İnokulum miktarını optimize etmek için aşı kültür miktarları % 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 (v/w) olarak ayarlanmıştır. Maksimum enzim aktivitesinin 0,966 U/ml/dk olarak elde edildiği inokulum miktarı % 40 olarak saptanmıştır. %10'luk inokulant miktarında ise en düşük aktivite olan 0,559 U/ml/dk elde edilmiştir (Şekil 3.23).



Şekil 3.22. KFF’da başlangıç nem düzeyinin fitaz aktivitesi üzerine etkisi (1-7 sırasıyla % 20, % 30, % 40, % 50, % 60, % 70, % 80)

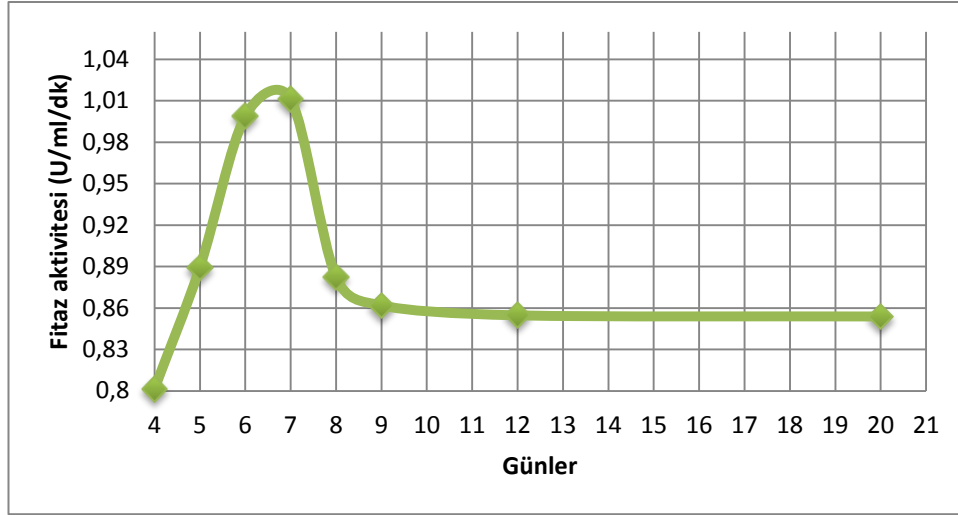


Şekil 3.23. KFF’da inokulum miktarının fitaz aktivitesi üzerine etkisi

3.10.1.4. Üretim Süresinin Optimizasyonu

Thermomyces lanuginosus’un maksimum enzim sentezlediği üretim süresini bulmak için 4. günden itibaren 5, 6, 7, 8, 9, 12 ve 20. günlerde enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır. Enzim aktivitesi 4. günden 7. güne kadar yükseliş göstermiştir ancak 8. günde hızlı bir düşüş meydana gelmiştir. Bu durum Şekil

3.24’de gösterilmiştir. Üretim sürecinin 7. gününde maksimum düzeye ulaşan enzim aktivitesi 1,011 U/ml/dk olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda 7. gün optimum üretim süresi olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.24. KFF kültürlerinde üretim süresinin fitaz aktivitesine etkisi

3.10.2. Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) ile Optimizasyon

CYY’nin Merkezi Bileşke Tasarımı (CCD: Central composite design) fitaz üretimini etkileyen dört parametrenin [inkübasyon sıcaklığı (T), başlangıç pH (pH), havalandırma alanı (H) ve aşı kültürün yaşı (Y)] optimum seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır ve ortalama tahmin edilen ve gözlenen cevaplar Tablo 3.12’de verilmiştir.

Deneyler tamamlandıktan sonra modelin istatistiksel testi Fisher’ın varyans analizleri (ANOVA) ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen regresyon eşitlikleri, inkübasyon sıcaklığı, başlangıç pH, havalandırma alanı ve aşı kültürün yaşı’nın değerlerinin fonksiyonuyla üretilen fitaz seviyelerini ifade etmektedir. Tahmini regresyon katsayıları Tablo 3.13’de verilmiştir. Fitaz aktivite miktarı model tarafından aşağıdaki regresyon eşitliği ile tahmin edilebilmektedir. Modelde kullanılan dört faktörün optimizasyonu için hesaplanan regresyon eşitliği bu değişkenlerin bir fonksiyonu olarak fitaz aktivitesini (y) göstermektedir.

Tablo 3.12. CYY ile optimizasyon deneyleri, tahmin edilen aktiviteler ve deneyler sonucunda gözlenen aktiviteler

Deney Akışı	T	pH	H	Y	Ekstraselüler fitaz aktivitesi (U/ml/dk)	
					Gözlenen	Tahmin edilen
1	47,500	5,50	20,0	3,00	0,312	0,282
2	47,500	5,50	20,0	3,00	0,188	0,282
3	47,500	5,50	20,0	3,00	0,367	0,282
4	47,500	5,50	20,0	3,00	0,210	0,282
5	47,500	5,50	20,0	4,63	0,520	0,535
6	55,000	7,50	30,0	4,00	0,725	0,713
7	55,000	7,50	10,0	4,00	0,184	0,160
8	55,000	7,50	10,0	2,00	0,000	0,037
9	55,000	7,50	30,0	2,00	0,459	0,418
10	55,000	3,50	10,0	4,00	0,040	0,032
11	59,725	5,50	20,0	3,00	0,192	0,217
12	47,500	5,50	20,0	3,00	0,319	0,282
13	40,000	7,50	10,0	2,00	0,431	0,383
14	35,275	5,50	20,0	3,00	0,217	0,236
15	40,000	3,50	30,0	4,00	0,066	0,031
16	40,000	7,50	30,0	4,00	0,071	0,109
17	40,000	7,50	30,0	2,00	0,069	0,078
18	40,000	3,50	10,0	4,00	0,384	0,396
19	40,000	7,50	10,0	4,00	0,278	0,243
20	47,500	8,76	20,0	3,00	0,164	0,197
21	47,500	5,50	20,0	3,00	0,288	0,282
22	47,500	2,24	20,0	3,00	0,055	0,064
23	55,000	3,50	30,0	4,00	0,334	0,353
24	55,000	3,50	30,0	2,00	0,068	0,103
25	47,500	5,50	36,3	3,00	0,159	0,142
26	47,500	5,50	20,0	3,00	0,347	0,282
27	40,000	3,50	30,0	2,00	0,049	0,044
28	47,500	5,50	20,0	1,37	0,418	0,446
29	47,500	5,50	3,7	3,00	0,069	0,128
30	55,000	3,50	10,0	2,00	0,019	-0,048
31	40,000	3,50	10,0	2,00	0,566	0,579

$$y = 0,282 - 0,00595 \cdot T + 0,0407 \cdot \text{pH} + 0,0041 \cdot H + 0,0275 \cdot Y - 0,0210 \cdot T^2 - 0,0572 \cdot \text{pH}^2 - 0,0555 \cdot H^2 + 0,0783 \cdot Y^2 + 0,0703 \cdot T \cdot \text{pH} + 0,0577 \cdot \text{pH} \cdot H + 0,0426 \cdot H \cdot Y + 0,1716 \cdot T \cdot H + 0,0659 \cdot T \cdot Y + 0,011 \cdot \text{pH} \cdot Y$$

Eşitlikte: y, fitaz aktivitesi (U/ml/dk); T, inkübasyon sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$); pH, başlangıç pH; H, havalandırma alanı (%) ve Y, aşı kültürün yaşı (gün) dır.

Tablo 3.13. Aktivite için tahmini regresyon katsayıları, ANOVA sonuçları

Terim	katsayılar	SE kats.	T	P
Sabit	0,282326	0,02034	13,878	0,000
T	-0,005956	0,01226	-0,486	0,634
pH	0,040736	0,01226	3,323	0,004
H	0,004090	0,01226	0,334	0,743
Y	0,027529	0,01226	2,246	0,039
T*T	-0,021043	0,01453	-1,448	0,167
pH*pH	-0,057168	0,01453	-3,934	0,001
H*H	-0,055464	0,01453	-3,817	0,002
Y*Y	0,078309	0,01453	5,389	0,000
T*pH	0,070330	0,01415	4,971	0,000
T*H	0,171645	0,01415	12,132	0,000
T*Y	0,065887	0,01415	4,657	0,000
pH*H	0,057655	0,01415	4,075	0,001
pH*Y	0,011008	0,01415	0,778	0,448
H*Y	0,042631	0,01415	3,013	0,008
S = 0,0565926 PRESS = 0,179692				
R ² = % 94,85 R ² (pred)= % 81,93 R ² (adj)= % 90,34				

Modelin kalitesi pek çok kriter kullanılarak kontrol edilmektedir. Bunlardan bir tanesi belirlilik katsayısı (R^2) dir. Fitaz üretimi için belirlilik katsayısı (R^2) 0,95 olarak hesaplanmıştır. R^2 belirlilik katsayısı çoklu modellerde genellikle yeterli değildir. Çünkü çoklu regresyon modelleri için denkleme yeni değişken ilave edilmesi durumunda R^2 değeri genellikle artmaktadır. Bu yüzden anlamlı bir test yapabilmek için çoklu modellerde düzeltilmiş R^2 (adj. R^2) hesaplanmalıdır. Fitaz üretimi için düzeltilmiş R^2 % 90,34 olarak hesaplanmıştır. Fitaz üretimi için korelasyon (ilişki) katsayısının (pred R^2) değeri ise 0,82 dir (Tablo 3.13).

F ve P değerleri modelin ve model parametrelerinin anlamlılıklarını göstermek için kullanılmaktadır. Çalıştığımız modelin F değeri 21,04 ve P değeri 0,000 dır. Fitaz üretimi için kullanılan faktörlerin, etkileşimlerin ve karelerin F ve

P değerleri ANOVA çalışmasının sonuçları halinde Tablo 3.14’de verilmiştir. Uyguladığımız modelde uyum eksikliği F-değeri 0,52 dir.

Tablo 3.14. CYY için merkezi bileşke modeli sonuçlarının ANOVA tablosu

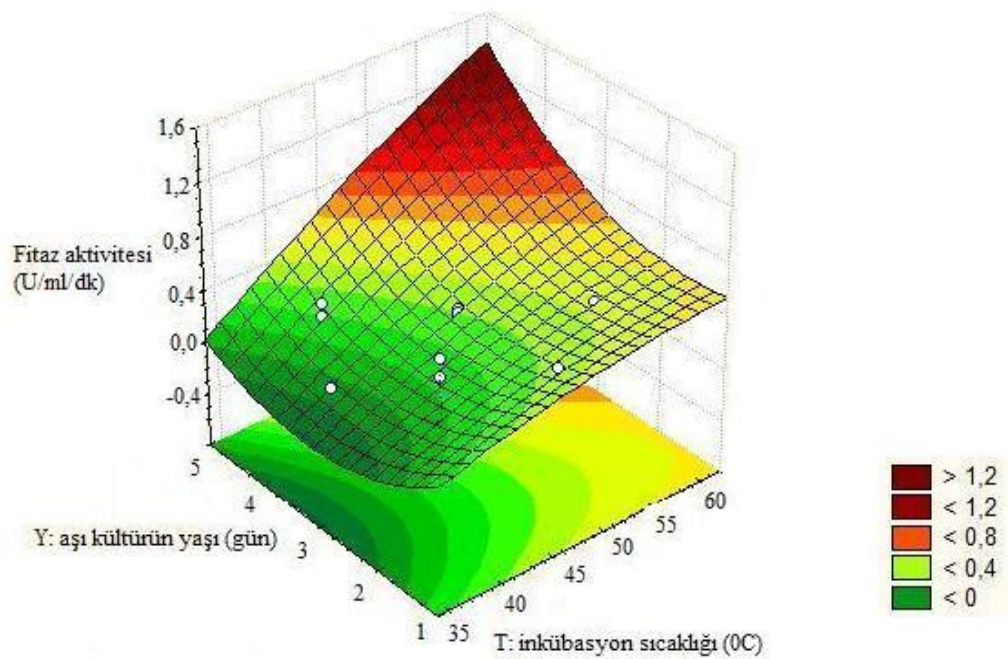
Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	MS	F	P (Prob > F)
Model	14	0,943356	0,943356	0,067383	21,04	0,000
Doğrusal	4	0,052635	0,052635	0,013159	4,11	0,018
T	1	0,000756	0,000756	0,000756	0,24	0,634
pH	1	0,035369	0,035369	0,035369	11,04	0,004
H	1	0,000357	0,000357	0,000357	0,11	0,743
Y	1	0,016153	0,016153	0,016153	5,04	0,039
Kare	4	0,186529	0,186529	0,046632	14,56	0,000
T*T	1	0,008930	0,006715	0,006715	2,10	0,167
pH*pH	1	0,046999	0,049562	0,049562	15,48	0,001
H*H	1	0,037604	0,046651	0,046651	14,57	0,002
Y*Y	1	0,092996	0,092996	0,092996	29,04	0,000
Etkileşim	6	0,704193	0,704193	0,117366	36,65	0,000
T*pH	1	0,079140	0,079140	0,079140	24,71	0,000
T*H	1	0,471393	0,471393	0,471393	147,19	0,000
T*Y	1	0,069457	0,069457	0,069457	21,69	0,000
pH*H	1	0,053186	0,053186	0,053186	16,61	0,001
pH*Y	1	0,001939	0,001939	0,001939	0,61	0,448
H*Y	1	0,029078	0,029078	0,029078	9,08	0,008
Kalıntı (Residual Error)	16	0,051244	0,051244	0,003203		
Uyum Eksikliği (Lack-of-Fit)	10	0,023872	0,023872	0,002387	0,52	0,826
Saf Hata (Pure Error)	6	0,027371	0,027371	0,004562		
Toplam	30	0,994600				

(DF, serbestlik derecesi; Seq SS, karalar toplamı; Adj SS, düzeltilmiş karalar toplamı; MS, ortalama karalar toplamı)

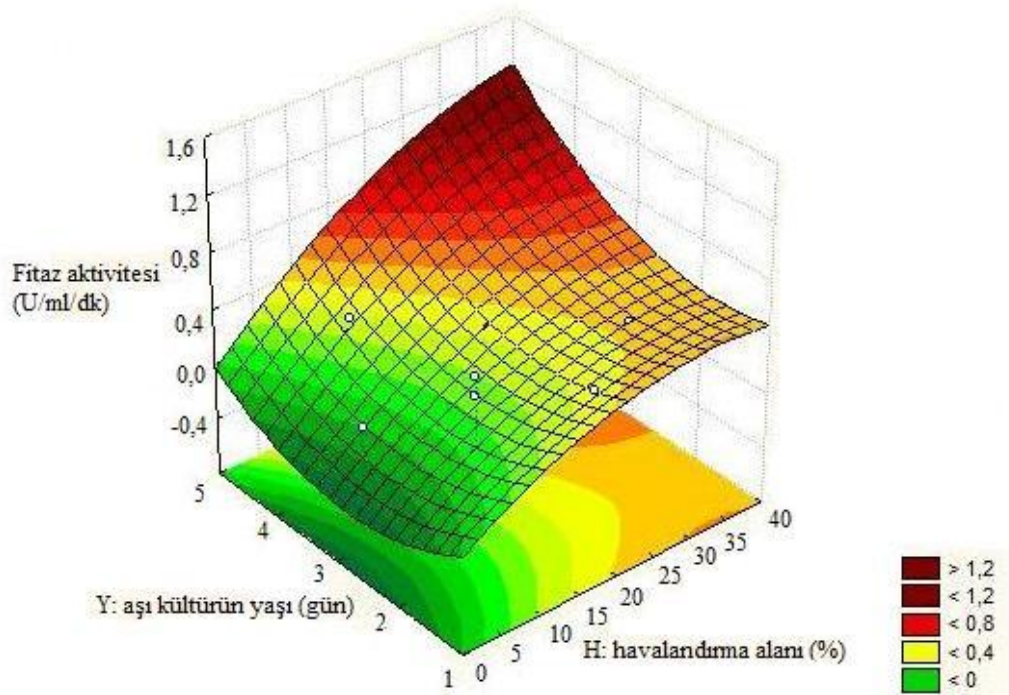
Değişkenler arasındaki etkileşimleri anlamak ve maksimum cevap için her bir değişkenin optimum seviyelerini belirlemek amacıyla cevap yüzey grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.25-3.27). Fitaz aktivitesine aşı kültürün yaşı ve sıcaklığın etkilerini gösteren üç boyutlu cevap yüzey grafiğinde pH 7,5 ve havalandırma alanı ise % 30’da sabit tutulmuştur (Şekil 3.25). Bu grafikte fitaz aktivitesi grafiğin en koyu kırmızı renkle gösterilmiş olan tepe noktasında maksimum seviye olan $> 1,2$ U/ml/dk.’ya ulaştığı gösterilmiştir. Fitaz aktivitesine aşı kültürün yaşı ve havalandırma alanının etkilerini gösteren cevap yüzey grafiğinde ise pH 7,5 ve inkübasyon sıcaklığı 55°C ’de sabit tutulmuştur (Şekil 3.26). Bu grafikte de bir önceki grafikte benzer şekilde fitaz aktivitesi grafiğin en koyu

kırmızı renkle gösterilmiş olan tepe noktasında maksimum seviye olan $> 1,2$ U/ml/dk.'ya ulaştığı gösterilmiştir. Fitaz aktivitesine inkübasyon sıcaklığı ve havalandırma alanının etkilerini gösteren üçüncü cevap yüzey grafiğinde ise yine pH 7,5 sabit iken aşı kültürün yaşıda 4 gün'de sabit tutulmuştur ve fitaz aktivitesinin $>1,2$ U/ml/dk'ya ulaştığı seviye koyu kırmızı renkte gösterilmiştir (Şekil 3.27). İstatistiksel model, maksimum fitaz üretiminin ($>1,4$ U/ml/dk) başlangıç pH 7,5, havalandırma alanı % 30, 5 günlük aşı kültür ve 55°C 'de inkübasyon koşullarında elde edileceğini öngörmüştür.

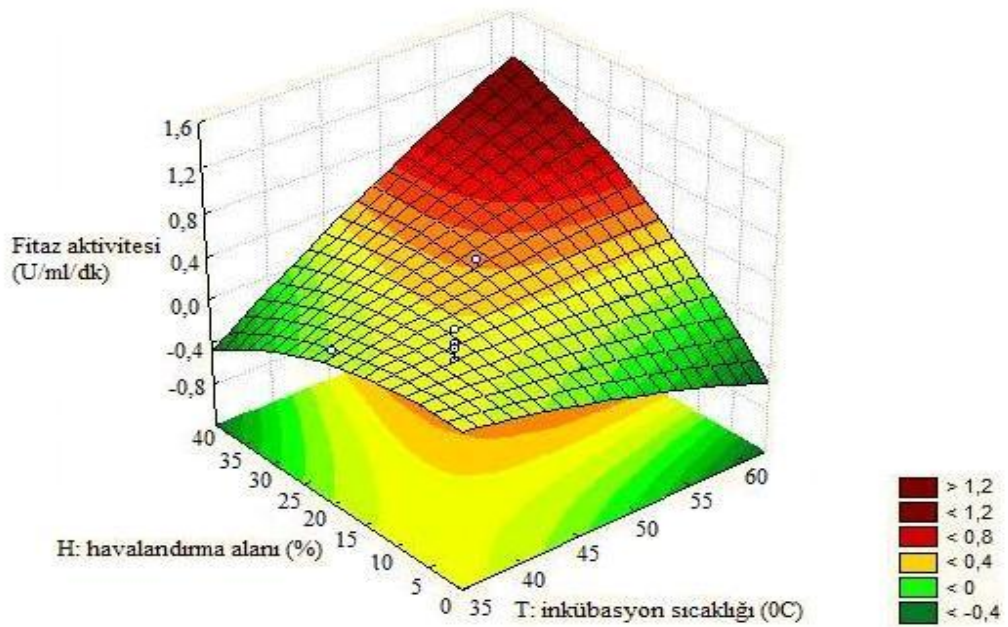
Şekil 3.25-3.27'da görülen üç boyutlu cevap yüzey grafikleri fitaz üretiminin optimizasyonunda kullanılan değişkenlerin aralarındaki doğrusal olmayan etkileşimleri göstermektedir.



Şekil 3.25. Fitaz aktivitesine aşı kültürün yaşı ve sıcaklığın etkilerini gösteren cevap yüzey grafiği (pH 7,5; havalandırma alanı % 30'da sabittir)



Şekil 3.26. Fitaz aktivitesine aşı kültürün yaşı ve havalandırma alanının etkilerini gösteren cevap yüzey grafiği (pH 7,5; inkübasyon sıcaklığı 55 °C’de sabittir)



Şekil 3.27. Fitaz aktivitesine inkübasyon sıcaklığı ve havalandırma alanının etkilerini gösteren cevap yüzey grafiği (pH 7,5; aşı kültürün yaşı 4 gün’de sabittir)

3.10.2.1. Deneysel Modelin Doğrulanması

Fitaz üretiminin model tarafından tahmin edilen optimum koşullar doğrultusunda gerçekleştirilmesi ile istatistiksel model doğrulanmıştır. Bu amaçla gerçekleştirilen fermentasyon sonucunda fitaz aktivitesi 3,156 U/ml/dk olarak belirlenmiştir. İstatistiksel model, belirlenen optimum koşullar altında, maksimum fitaz üretimini $>1,4$ U/ml/dk olarak tahmin etmiştir. Optimum koşullarda belirlenmiş olan aktivitenin 1,4 'ün üzerinde çıkması modeli doğrulamaktadır. CYY ile optimizasyon öncesinde klasik yöntemle optimize edilmiş koşullarda elde edilen fitaz aktivitesi ise 1,011 U/ml/dk dır. *Thermomyces lanuginosus*'dan katı faz fermentasyonla üretilen fitaz aktivitesi Cevap yüzey yöntemi ile optimizasyon yoluyla 3,122 kat arttırılmıştır.

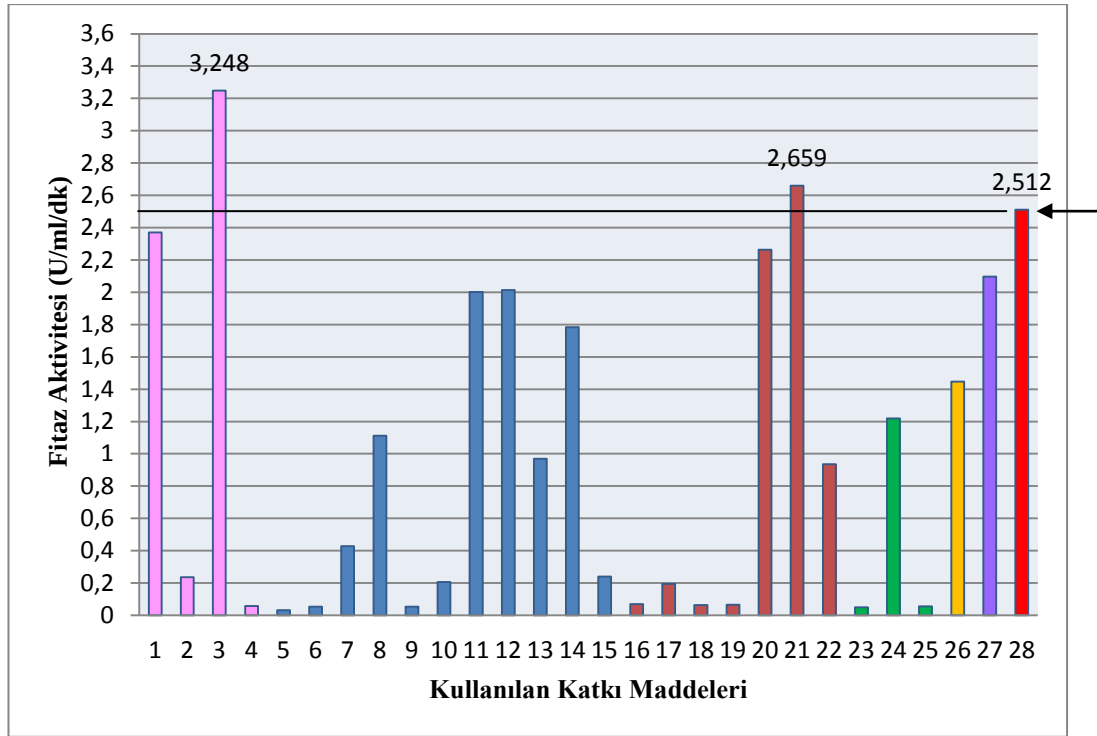
3.11. Katkı Maddelerinin Etkisi

Bu amaçla çeşitli karbon kaynakları, azot kaynakları, metal tuzları ve yüzey aktif maddeler belirtilen oranlarda fitaz üretim ortamına eklenmiştir (Tablo 3.15). İncelenen dört karbon kaynağı arasından 3,248 U/ml/dk'lık fitaz aktivitesi ile sükroz katkılı ortam, kontrol ortamında elde edilen 2,512 U/ml/dk fitaz aktivitesinin üzerine çıkmıştır, üretim sürecinde pozitif etkili olduğu gösterilmiştir. Glukoz'un ortama eklenmesi ile oluşan fermentasyonda ise kontrole çok yakın değerde bir aktivite elde edilmiş ve etkisiz bir madde olduğu belirlenmiştir. Ancak maltoz ve özellikle de mısır unu fitaz üretimine negatif yönde etki etmiştir. Onbir farklı azot kaynağının KFF ile fitaz enzimi üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Bu azot kaynaklarından hiçbirinin kontrol ortamındaki üretimde elde edilen fitaz aktivitesinin üzerine çıkamadıkları için fermentasyonu indükleyici etkileri olmadığına karar verilmiştir.

Tablo 3.15. Çeşitli katkı maddelerinin KFF ile fitaz üretimi üzerine etkileri

Madde	Fitaz aktivitesi (U/ml/dk)	Madde	Fitaz aktivitesi (U/ml/dk)
Karbon kaynakları		Metal tuzları	
glukoz	2,371	CaCl ₂	0,069
maltoz	0,235	MgCl ₂	0,195
sükroz	3,248	MnCl ₂	0,064
mısır unu	0,058	CuSO ₄	0,066
Azot kaynakları		Co(NO ₃) ₂	2,263
üre	0,032	ZnSO ₄	2,659
maya ekstraktı	0,053	NaNO ₃	0,935
tripton	0,429	Yüzey aktif maddeler	
triptik soy	1,112	tween 20	0,049
pepton	0,055	tween 80	1,219
nutrient broth	0,206	triton X-100	0,056
yağsız süt tozu	2	SDS	1,447
kazaminoasit	2,01	EDTA	2,096
soya unu	0,969	kontrol	2,512
malt ekstrakt	1,783		
NH ₄ NO ₃	0,241		

Diğer yandan üre, maya ekstraktı, pepton, nutrient broth ve NH₄NO₃ fermentasyon üzerinde oldukça negatif bir etki göstermişlerdir. KFF'ye etkileri incelenen 7 farklı metal tuzundan yalnızca ZnSO₄ 2,659 U/ml/dk aktivite ile kontrol ortamından elde edilen fitaz aktivitesinin üzerinde bir aktivite elde edilmesini sağlamıştır ve KFF üzerine pozitif bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Buna karşın CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂ ve CuSO₄ fitaz üretimi üzerinde oldukça inhibe edici bir etki göstermişlerdir. KFF'ye etkileri belirlenmeye çalışılan yüzey aktif maddeler ve SDS, EDTA'nın indükleyici bir etkiye sahip olmadıkları, tween 20 ve triton x-100 fermentasyonu oldukça negatif etkiledikleri belirlenmiştir. Kullanılan katkı maddelerinin etkileri Şekil 3.28'de verilmiştir. Uygulanan optimizasyon çalışmaları sonucunda fitaz aktivitesinde 10.83 kat artış sağlanmıştır (0.30 U - 3.248 U).

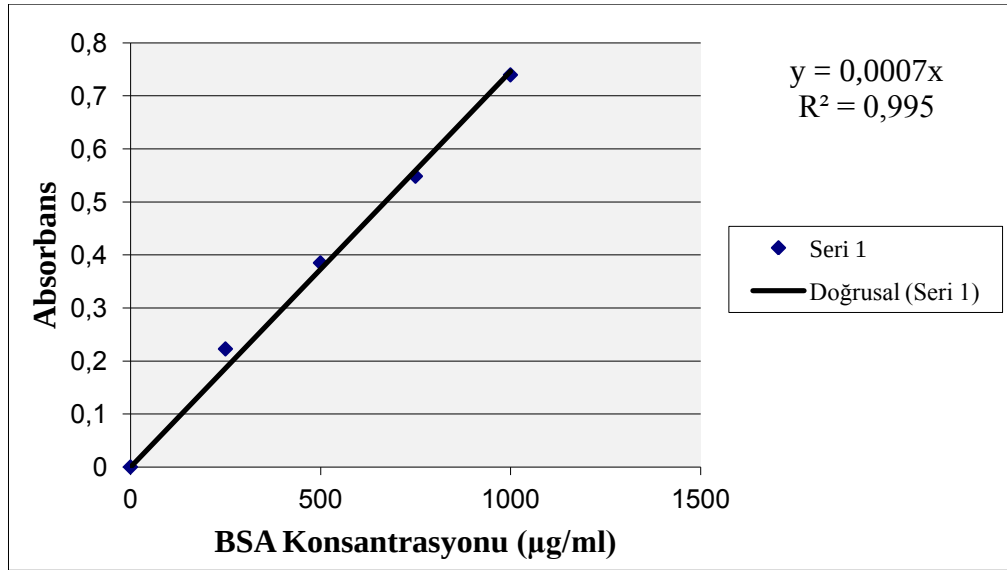


Şekil 3.28. Fitaz enzimi üretimine çeşitli katkı maddelerinin etkisi (karbon kaynakları: 1- glukoz, 2- maltoz, 3- sükröz, 4- mısır unu; azot kaynakları: 5- üre, 6- maya ekstraktı, 7- tripton, 8- triptik soy, 9- pepton, 10- nutrient broth, 11- yağsız süt tozu, 12- kazamino asit, 13- soya unu, 14- malt ekstrakt, 15- NH_4NO_3 ; metal tuzları: 16- CaCl_2 , 17- MgCl_2 , 18- MnCl_2 , 19- CuSO_4 , 20- $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, 21- ZnSO_4 , 22- NaNO_3 ; yüzey aktif maddeler: 23- tween20, 24- tween80, 25- triton x-100; 26- SDS; 27- EDTA; 28- kontrol)

3.12. Spesifik Fitaz Aktivitesi

3.12.1. Kalibrasyon Grafiği

Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi için, 1000- 250 $\mu\text{g/ml}$ arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanan standart protein çözeltilerinin (BSA) bradford reaktifi ile muamelesinden sonra 595 nm'deki absorbans değerleri saptanmıştır. Şekil 3.29'de BSA konsantrasyonları ve absorbans değerleri arasındaki doğrusal ilişki verilmiştir.



Şekil 3.29. Protein miktarlarının belirlenmesi için hazırlanan kalibrasyon grafiği

3.12.2. Protein Konsantrasyonu ve Spesifik Aktivite

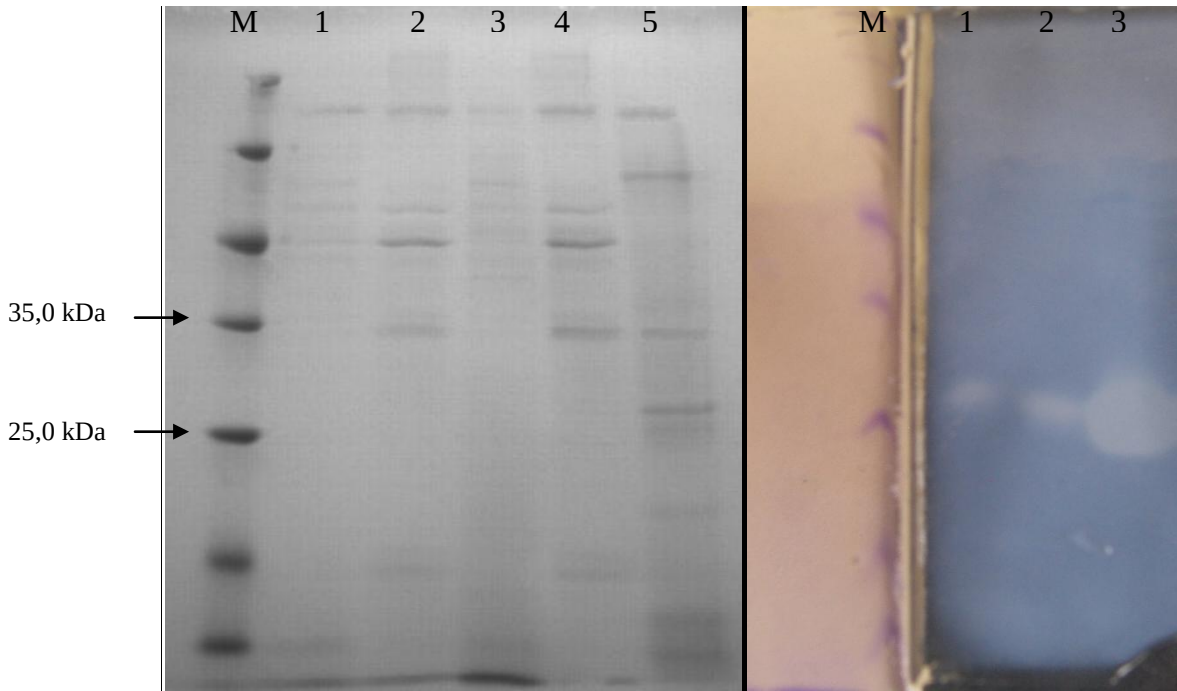
Optimum koşullarda elde edilen ham enzim ekstresinden Bradford yöntemi ile ölçülmüş olan absorbans 0,253 dür. Yukarıda elde edilmiş olan grafikte oluşturulan $y = 0,0007x$ denklemi yoluyla derişimi bilinmeyen maksimum fitaz aktivitesine sahip çözeltinin protein miktarı 0,362 mg/ml olarak hesaplanmıştır. Spesifik aktivite ise 8,97 U/mg olarak hesaplanmıştır.

3.13.Enzimin SDS-PAGE ve Zimogram Analizine Ait Bulgular

Thermomyces lanuginosus'dan katı faz fermentasyonla üretilen fitaz enziminin %10'luk homojen SDS-PAGE sistemi kullanılarak yapılan analiz sonucu elde edilen protein bandları Şekil 3.30 (solda)'da gösterilmiştir. Elde edilen protein bandlarının moleküler ağırlıklarının saptanmasında 14,4- 18,4- 25,0- 35,0- 45,0- 66,0- 116,0 kDa boyutlarında protein karışımını içeren boyanmamış protein moleküler ağırlık markırı (Thermo Scientific) kullanılmıştır. SDS-PAGE jelinde 1, 2, 3 ve 4. kuyucuklara optimizasyon öncesinde elde edilmiş olan enzim ekstrere, 5. kuyucuğa ise optimizasyondan sonra elde edilmiş olan enzim ekstresi yüklenmiştir. Jelde protein bantlarının görünür hale getirilmesinden sonra 1, 2, 3 ve 4. sütunlarda 25,0-35,0 kDa büyüklüğündeki

markır bantları arasına denk gelen alanda belirgin protein bandı (~30 kDa) gözlenmemiştir. Ancak optimizasyon sonrasında elde edilen ekstrenin yüklendiği 5. sütunda 25,0-35,0 kDa büyüklüğündeki markır bantları arasına denk gelen alanda belirgin bir protein bandı olduğu saptanmıştır.

Zimogram analizinde 1 ve 2. sütunlara optimizasyon öncesinde elde edilmiş enzim ekstreleri, 3. Sütuna ise optimizasyon sonrasında elde edilmiş enzim ekstresi yüklenmiştir. Elektroforez işleminden sonra jel boyama işlemi yapılmadan 0,1 M Na-asetat tamponunda (pH 5,0) hazırlanmış %1 Triton X-100'de bekletilerek fitaz enziminin renaturasyonu sağlanmıştır. Jelin fitaz enziminin substratı (Na-fitat) ile muamelesi sonucu enzim-substrat reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve fitaz aktivitesinin olduğu bölgeler jelin CaCl_2 çözeltisine konulması ile şeffaf zonlar halinde görünür hale getirilmiştir. Zimogram analizi sonucunda, *T. lanuginosus* fitaz enziminin molekül ağırlığının yaklaşık 30 kDa olan tek protein bandı oluşturduğu ve bu bandın fitaz enzime ait olduğu doğrulanmıştır (Şekil 3.30; sağda). Protein bantlarının moleküler ağırlıklarının saptanmasında boyanmamış protein moleküler ağırlık markırı (14,4- 18,4- 25,0- 35,0- 45,0- 66,0- 116,0 kDa; Thermo Scientific) kullanılmıştır. Zimogram jeline toplan protein miktarları yaklaşık olarak aynı miktarda (0,250 mg/ml) olan örnekler yüklenmesine karşılık 1 ve 2. sütunlara optimizasyon öncesinde elde edilmiş enzim ekstreleri yüklendiğinden daha küçük bantlar, 3. sütuna ise optimizasyon sonrasında elde edilmiş enzim ekstresi yüklendiğinden diğerlerine göre daha belirgin ve büyük bir bant elde edilmiştir.



Şekil 3.30. Fitaz enziminin SDS-PAGE (solda; M: protein moleküler ağırlık markırı; 1, 2, 3, 4. sütunlar optimizasyon öncesi, 5. sütun optimizasyon sonrası enzim ekstresi) ve Zimogram Sonucu (Sağda; M: protein moleküler ağırlık markırı; 1 ve 2. sütunlar optimizasyon öncesi, 3. sütun optimizasyon sonrası enzim ekstresi)

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Ekstrem ekolojik koşullarda yaşayan mikroorganizmalar yaşadıkları ortamların özelliklerine göre termofilik, asidofilik, alkalifilik ve halofilik şeklinde sınıflandırılmıştır. Bu ekstremofilik mikroorganizma gruplarından bir tanesi de termofilik funguslardır. Termofilik funguslar, ekstrem koşullara uyum göstermiş özel yapıları nedeniyle biyoteknoloji alanında çalışan bir çok araştırmacının ilgisini çeken mikroorganizmalardır. Yüksek sıcaklıklara dayanıklı enzimleri, ortam sıcaklığını tolere ederek hücre bütünlüğünün korunmasını sağlayan lipidleri, ısı şok proteinleri ve bunlar gibi kendilerine has olan özellikleri, onların biyoteknoloji alanında son derece değerli araçlar olarak görülmelerine yol açmaktadır. Termofilik funguslar pek çok açıdan öneme sahip organizmalardır. Ancak enzimlerinin sahip olduğu termostabilite onların yüksek ısıların uygulandığı endüstriyel proseslerde kullanımı açısından ön plana çıkmasını sağlamıştır. Yapılan çalışmalarda termofilik funguslar, jeotermal topraklardan (Redman ve ark., 1999), enfiyeden (Tansey, 1974), organik gübrelerden (Sarma ve ark., 2008; Hashimoto ve ark., 1972; Anastasi ve ark., 2005), tarım arazilerinden (Haliki, 1992) ve mantar kompostundan (Straatsma ve ark., 1994; Arifoğlu ve Ögel, 2000) izole edilmiştir. Termofilik fungusların toprakta, sıcak sularda, ölü bitki parçalarının yığınları üzerinde, tarım ve orman ürünlerinin yığınlarında ve diğer tüm sıcak, nemli ve aerobik bir çevrede bulunan organik materyaller üzerinde yaşayabildikleri bilinmesine karşılık sıcak su kaynaklarından izolasyonuna ilişkin çalışmaya rastlanamamıştır. Ülkemiz sıcak su kaynakları açısından oldukça zengindir. İlçelerinde 8 adet kaplıca ve hamam olarak tesis halinde ayrıca birçok tesisleşmemiş termal sulara sahip olan Kütahya ili, etraflarında pek çok termal tesisi barındıran 5 adet kaplıcası ile Afyon ili ülkemizdeki termal su zenginliğinin önemli temsilcilerdir. Kütahya ve Afyon illerindeki sıcak su kaynaklarının mikrobiyolojik olarak incelenerek sahip olduğu termofilik mikrofungusların tanımlanarak ortaya konması hem termofilik fungusların sıcak sulardan izolasyonunda ilk olması nedeniyle, hem de ülkemiz termofilik fungal florasının belirlenmesi açısından çok önemlidir.

Çalışmamızda 20.09.2008 ve 20.10.2009 tarihlerinde yapılmış olan örnekleme çalışmalarında Kütahya ilindeki kaplıcadan alınmış olan sıcak su örneklerinin pH değerlerine bakıldığında, çoğu kaplıcadan alınan su pH'larının

7'nin üzerindeki bazik değerlerde olduğu görülmüştür. Alınan su örneklerinin sıcaklıkları ise kaplıcalara göre değişiklik göstermektedir. En yüksek su sıcaklığı olan 90 °C Simav ilçesindeki Naşa kaplıcasından alınan örneklerden, en düşük su sıcaklığı olan ise 33 °C ise Tavşanlı ilçesindeki Göbel kaplıcasından alınan örneklerden ölçülmüştür. Birinci ve ikinci örnekleme çalışmalarında aynı kaplıcalardan alınan su örneklerinin pH ve sıcaklık değerlerinde belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Kütahya'daki sıcak su örneklerinin kimyasal analizlerinde klor, amonyak azotu, nitrit azotu, nitrat azotu, mangan, florür ve magnezyum miktarları belirlenmiştir. Amonyak azotu ve nitrat azotu miktarlarının tüm sıcak su örneklerinde 0,5 mg/l' den az olduğu, diğer kimyasal parametrelerin ise sular arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Afyon ilindeki kaplıcadan alınmış olan sıcak su örneklerinin pH değerlerine bakıldığında Kütahya'dan alınan sıcak su örneklerinde görüldüğü gibi tüm su örneklerinin bazik özellikte olduğu dikkati çekmektedir. Alınan su örneklerinin sıcaklıkları ise kaplıcalara göre değişiklik göstermektedir. En yüksek su sıcaklığı olan 78 °C Ömerli kaplıcasından alınan örneklerden, en düşük su sıcaklığı olan ise 42 °C ise Gecek kaplıcasından alınan örneklerden ölçülmüştür. Her iki örnekleme çalışmasında da aynı kaplıcalardan alınan su örneklerinin pH ve sıcaklık değerlerinde belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Afyon ilinden alınan sıcak su örneklerinin kimyasal analizlerinde de Kütahya'dakilerde olduğu gibi amonyak azotu ve nitrat azotu miktarlarının tüm sıcak su örneklerinde 0,5 mg/l' den az olduğu, diğer kimyasal parametrelerin ise sular arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışmamızda termofilik fungusların belirlenmesi için 47 farklı sıcak su örneğinden yapılmış olan izolasyon işlemleri sonucunda toplam 137 adet izolat elde edilmiştir. Bu izolatlardan 55 tanesi belirtilen istasyonlardan 20.09.2008 tarihinde yapılmış olan 1. örnekleme çalışmasından, 82 tanesi ise 20.10.2009 tarihinde yapılmış olan örnekleme çalışmalarından elde edilmiştir. Elde edilen izolatların 3 tanesi Sandıklı Hüdai kaplıcaları ve 2 tanesi ise Afyon kaplıcalarından olmak üzere yalnızca 5 tanesi Afyon'daki kaplıcalardan izole edilmiştir. Toplam 132 adet izolat Kütahya'daki sıcak su kaynaklarından izole edilmiştir. Kütahya ilinden elde edilen izolatların 52 tanesi Gediz Ilıca kaplıcalarından, 52 tanesi Simav kaplıcalarından, 7 tanesi Emet kaplıcasından, 3 tanesi Tavşanlı Göbel kaplıcasından, 16 tanesi Hisarcık kaplıcasından, 2 tanesi Dereli kaplıcasından

izole edilmiştir. Kütahya ve Afyon illerindeki sıcak su kaynaklarının pH, sıcaklık ve kimyasal özelliklerinde çok büyük farklılıklar olmamasına karşılık mikrofungus izolat sayıları arasındaki büyük farkın tarımsal faaliyetler, bitki örtüsü, iklim şartları gibi çevresel faktörlere bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Elde ettiğimiz 137 izolat içerisinde termofilik mikrofungusları ayırt etmek amacıyla, sıcaklık testleri gerçekleştirilmiştir. Bu testler sonucunda; 20 °C’de gelişmeyen ancak 20 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda gelişebilen izolatlar termofilik, 20 °C ‘nin altından yaklaşık 55 °C’ye kadar olan geniş bir büyüme sıcaklığına sahip olanlar ise termotolerant formlar olarak ayrılmıştır. Elde edilen izolatlardan 112 adedinin 20 °C’den yaklaşık 50-55 °C’ye kadar olan geniş bir büyüme sıcaklık aralığına sahip termotolerant funguslar olduğu saptanmıştır. Bunların dışında kalan ve 20 °C gelişemeyen 25 izolatın ise termofilik olduğu belirlenmiştir.

Tüm termofilik izolatlar 2. izolasyon çalışmasında, Kütahya ilindeki sıcak su kaynaklarından elde edilmiştir. Termofilik olduğu belirlenen 25 adet izolatın su kaynakları arasındaki dağılımı; % 60’ı 11. Bölge Gediz Ilıca kaplıcalarından, % 20’si 12. Bölge Simav kaplıcalarından, % 16’sı 13. Bölge Hisarcık kaplıcalarından ve % 4’ü ise 15. Bölge Dereli kaplıcalarından şeklinde gerçekleşmiştir. Ayrıca elde edilen 25 termofilik izolatın %72’sinin değişik kaplıcalardan alınmış olan sedimentli birikinti suyu örneklerinden elde edildiği belirlenmiştir. Bu durumun birikinti sularında diğer su örneklerine kıyasla çürümüş bitki artıkları ve toprak partikülleri gibi kalıntılardan kaynaklanan organik madde miktarının daha fazla olması ve birikintilerin su sıcaklığının diğer kaynaklara göre daha düşük olmasından dolayı ortaya çıktığı düşünülmüştür. Termofilik fungusların sıcaklık gereksinimlerinin bakteriler kadar ekstrem olmaması ve habitatlarının genellikle çürümüş bitki artıkları gibi çevreler olması saydığımız sebeplerden dolayı sedimentli birikinti sularının diğer kapalı sıcak su kaynaklarına kıyasla bu mikroorganizmaların gelişimine daha uygun olduğunu ortaya koymuştur.

Termofilik izolatlardan 11.7.1.2.2, 11.7.1.2.3, 11.7.2.2.2, 11.7.3.2.2, 12.2.2.2.6, 12.6.1.2.1, 12.7.2.2.1, 13.2.2.1.1 kod numaralarına sahip olan 8 tanesinin 55 °C’de gelişim gösterebildiği belirlenmiştir. 55 °C’de gelişim gösterebilen bu 8 izolattan 12.6.1.2.1 kod numaralı izolatın 60 °C’de, 12.7.2.2.1 kod numaralı izolatın ise 62 °C’de gelişebildiği saptanmıştır.

Maheshwari ve ark. (2000) termofilik fungusların fizyolojileri ve enzimlerini konu alan derleme çalışmalarında birçok termofilik fungusun maksimum gelişim sıcaklıkları verilmiştir ve bunlar arasındaki en yüksek sıcaklık 61 °C olarak bildirilmiştir. Bu durum göz önüne alındığında 12.7.2.2.1 kod numaralı izolatın literatürde fungusların maksimum gelişim sıcaklığı olarak belirtilmiş olan 61 °C'nin üzerinde geliştiğinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu bilginin termofilik fungusların maksimum gelişim sıcaklığını değiştirebilecek nitelikte olduğu düşünülmektedir.

Biolog sistemi 95 farklı karbon kaynağını mikroorganizmaların kullanıp kullanamamalarına göre indikatör boyanın renk değişimine ve oluşan bulanıklığa bağlı olarak tanılama yapan bir sistemdir (www.biolog.com). Ancak funguslar için cihaz veritabanında bulunan türler tanılama yapmak için yeterli değildir. Bu nedenle yöntem tanılama amaçlı değil karbonhidrat testlerinin gerçekleştirilmesi ve bu test sonuçları ile termofilik türler arası benzerlik ilişkilerinin ortaya konması amacı ile kullanılmıştır. Ayrıca kit plaklarında mevcut olan ve kullanımı test edilen glukoz, laktoz, süktroz, asparagin gibi bazı maddeler fitaz enzimi üretiminde ortama indükleyici olarak ilave edilen maddelerden olduğu bilinmektedir (Hassouni ve ark., 2006; Bhavsar ve ark., 2010). Bu karbon kaynaklarını termofilik izolatların kullanımının enzim çalışmalarına başlamadan önce belirlenmiş olması enzim üretiminde kullanılacak substrat ve indükleyici maddelerin seçiminde kolaylık sağlamıştır.

Biolog sistemi ile 95 farklı karbon kaynağını kullanımlarının değerlendirilmesi sonucunda izolatlar çeşitli karbon kaynaklarını kullanma açısından farklı profiller göstermiştir. Bu sonuçlara göre α -D-glukoz, glikojen, D-trehaloz, L-alanin, L-alanil-glisin ve L-asparagin tüm termofilik organizmalar tarafından kullanılan karbon kaynakları olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık D-galakturonik asit, Bromosüksinik asit, p-hidroksifenil asetik asit ve sebasik asit ise test edilen çoğu termofilik organizma tarafından kullanılamadığı saptanmıştır. Fitaz enziminin tarama çalışmalarında çoğunlukla kullanılan α -D-glukoz'un bütün termofilik izolatlar tarafından metabolize ediliyor olması Gargova ve ark. (1997) kullandıkları yöntemin seçilmesini sağlamıştır. Ayrıca L-asparaginin fitaz enziminin katı faz fermentasyonu ile üretiminde ortamdaki temel indükleyici maddelerden olmasının uygun olacağına karar verilmiştir. Buna bağlı olarak Gulati ve ark. (2007a) kullandıkları besin ortamı KFF için seçilmiştir.

Biolog sistemi ile termofilik izolatların karbon kaynağını kullanımlarına bağlı profillerin karşılaştırılması yoluyla birbirleri ile olan evrimsel ilişki ele alınmıştır. Edilen veriler NTSYSp 21 programı ile analiz edilerek ağaç oluşturulmuştur. Oluşturulan ağacın istatistiksel güvenilirliğinin belirlenmesi için yine aynı program aracılığıyla “UPGMA” analizi gerçekleştirildiğinde elde edilen katsayıların genel olarak %50’nin üzerinde olduğu ve bu nedenle güvenilir bir ağaç topolojisi elde edildiği anlaşılmıştır. 11.7.1.2.2, 11.7.1.2.3, 11.7.2.2.3 ve 13.2.2.1.1 izolatlarının %100 aynı küme içerisinde toplandığı görülmüştür. Benzer şekilde 11.6.2.2.1 ile 11.7.1.2.6 izolatlarının ve 11.7.1.2.13 ile 11.7.1.2.12 izolatlarının da %100 aynı küme içerisinde toplandığı ortaya konmuştur. Bir sonraki adımda gerçekleştirilen morfolojik tanımlama çalışmaları ile bu kümelerin aynı türün bireyleri oldukları ortaya konmuştur.

Termofilik fungus izolatlarının tür seviyesinde tayinlerini gerçekleştirmek üzere makroskobik ve mikroskobik özelliklerini belirleyip tanımlama anahtarları vasıtasıyla tanımlamaları gerçekleştirilmiştir. Termofilik fungus izolatlarından bir tanesinin *Myceliophthora thermophila*, bir tanesinin *Myceliophthora hinnulea*, 5 tanesinin *Myriococcum albomyces*, 3 tanesinin *Rhizomucor pusillus*, 1 tanesinin *Thermomyces lanuginosus*, 1 tanesinin *Humicola grisea* var. *thermoidea*, 1 tanesinin *Humicola insolens*, 2 tanesinin *Scytalidium thermophilum*, 2 tanesinin *Talaromyces thermophilus*, 1 tanesinin *Thielavia terrestris*, 7 tanesinin ise *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* türünün üyeleri olduğu belirlenmiştir.

Sıcak su kaynaklarından termofilik fungusların izolasyonu ve tanımlanmasına yönelik Türkiye’den ve Dünya’da herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Buna karşın toprak, mantar kompostu, gübre vb. kaynaklardan termofilik fungusların izole edildiği benzer çalışmalar mevcuttur.

Çalışmamıza benzer bir çalışma olarak mezofilik, termofilik ve termotolerant fungusların izolasyonu ve tanımlanması ile ilgili Türkiye’de yapılan bir doktora tez çalışmasında, İzmir iline bağlı Bergama ilçesi çevresindeki değişik tarım ürünleri yetiştirilen ekili alanlardan iki yıl boyunca (1989-1991) alınan 40 toprak örneğinden fungus izolasyonu ve bu izolatların morfolojik yöntemlerle tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Termofilik ve termotolerant mikrofungus türleri ayırt edilmiştir. Morfolojik analiz ve sıcaklık testlerine göre *Aspergillus fumigatus* Fres., *A. nidulans* (Eid.) Windt., *A. terreus* Thom, *Aspergillus* sp. AH I, *Talaromyces emersonii* Stolk, *Humicola insolens* Cooney et Emerson, *Mucor* sp. I

Mich ex St. ve *Mucor sp.* II Mich ex St., *Rhizomucor miehei* (Cooney et Emerson) Schipper, *R. pusillus* (Lindt) Schipper, *Rhizopus arrhizus* Fischer, *Stilbella thermophila* Fergus'mn, *Aspergillus flavus* Link ve *A.niger* Van Tieghem termotolerant ve termofilik türler olarak belirlenmiştir (Haliki, 1992).

Çalışmamızda izolasyonunu ve tanılamasını gerçekleştirdiğimiz *Scytalidium thermophilum* türü Ögel ve ark. (2001) tarafından kompleks lignoselülozik ortamda endoglukanaz üretimi amacıyla mantar kompostundan izole edilmiştir.

Çalışmamıza benzer olarak termofilik fungusların çeşitli kaynaklardan izolasyonu ve tanılanmasına yönelik olarak yapılan çalışmalarda, jeotermal topraklardan *Dactylaria constrictum* ve *Acremonium alabamense* (Redman ve ark., 1999), enfiyeden *Humicola lanuginosa*, *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*, *Thermoascus aurantiacus*, *Thielavia albomyces* ve *Talaromyces thermophilus* (Tansey, 1974), organik gübrelerden *Chaetomium thermophilum*, *T. aurantiacus*, *R. pusillus*, *M. flava*, *H. insolens*, *H. fuscoatra*, *Myceliophthora sp.*, *Melanocarpus albomyces*, *Mucor indicus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Corynascus sepedonium*, *Acrophialophora nainiana*, *Emericella nidulans* var. *nidulans*, *E. nidulans* var. *Lata*, *Aspergillus caespitosus*, *Penicillium janthinellum* (Sharma ve ark., 2008), *Chaetomium thermophile*, *Chaetomium thermophile* var. *dissitum*, *H. lanuginosa*, *M. pulchella* var. *sulfurea*, *M. pusillus*, *M. albomyces*, *P. duponti* (Hashimoto ve ark., 1972; Anastasi ve ark., 2005) türlerine ait termofilik funguslar izole edilmiş ve morfolojik yöntemlerle tanılanmıştır.

Termofilik fungusların sınıflandırılması ve isimlendirilmesi zor ve karmaşıktır bu nedenle de genellikle tanımlayamama ve karışıklıklarla sonuçlanmaktadır. İlk sınıflandırmalarda, İngilizce dışındaki dillerde yazılışları, tür adında karışıklıklara neden olmuştur. Bu nedenle fungusların bazı türleri birden fazla adla açıklanmış ve yeni sınıflandırma yapıldığında aynı fungus farklı adlar ile tanımlanmıştır. Ayrıca fungusların eşeyli ve eşeysiz evrelerine göre farklı isimler almaları da karışıklığa neden olmaktadır. Termofilik fungusların tanımlanmasının zorluğu termofilik ve termotolerans ayırımı ile daha da karmaşılaşmıştır. Termofilik olarak tanımlanmış bazı türler günümüzde termotolerant olarak bilinmektedir (Maheshwari ve ark., 2000). Ayrıca geleneksel yöntemlerle tanılamada morfolojik kriterlerin esas alınması ve bu kavramlarında genellikle kişiden kişiye göreceli olarak değişebiliyor olması tanılamayı

zorlaştırmakta ve yakın akraba türlerin ayrımında sıkıntı yaşanmaktadır. Yeni uygulamalarda moleküler markırların kullanımı ile doğal bir sınıflandırma sistemi oluşturulmaya çalışılması fungal sistematığın hissedilir şekilde gelişmesini sağlamaktadır. Giderek artan sayıdaki ulaşılabilir dizilenmiş genomlar filogenetik analizlerin yönünü değiştirmiştir. Tek bir moleküler markır kullanılarak yapılan analizler yerini birden fazla markırın kullanıldığı analizlere bırakmakta ve filogenetik çalışmalar iyi çözümlenmiş ağaçlarla ortaya konmaktadır (Morgenstern ve ark., 2012).

Sharma ve ark. (2008) ksilanaz üreten termofilik ve termotolerant fungusların moleküler karakterizasyonunu ITS bölgesini (ITS1-5.8S-ITS2) ve 26S rRNA'nın yüksek değişken D1D2 bölgesini kullanarak polifazik taksonomi yoluyla gerçekleştirmişlerdir. ITS ve D1D2 bölgelerinin PCR ile çoğaltılması ve dizilenmesi yoluyla ortaya çıkan sonuçlar ve oluşturulan filogenetik ağaçların birbirlerini tamamlar nitelikte olduğunu bildirmişlerdir.

Pan ve ark. (2010) yapmış oldukları çalışmada Çin'in Tengchong Rehai Ulusal Park'ındaki jeotermal bölgelerden aldıkları toprak örneklerinden 102 termofilik fungusu izole etmişler ve morfolojik ve ITS bölgesini kullandıkları moleküler yöntemlerle tanılamalarını gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları tanılama çalışmaları sonucunda *Rhizomucor miehei*, *Chaetomium* sp., *Talaromyces thermophilus*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Thermoascus aurantiacus* Miehe var. *levisporus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Scytalidium thermophilum*, *Malbranchea flava*, *Myceliophthora* sp. 1, *Myceliophthora* sp. 2, *Myceliophthora* sp. 3, *Coprinospora* sp., *T. lanuginosus* ve *S. thermophilum* bu topraklarda bulunan dominant türler olarak tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda; termofilik fungus izolatlarının karakterizasyonu, ITS (ITS1-5.8S-ITS2) ve 26-28S rRNA'nın yüksek değişken D1D2 bölgelerinin uygun primerler vasıtasıyla çoğaltıp elde edilmiş olan PCR ürünlerinin dizi analizleri ve Blast çalışmaları sonucunda tanılamaları gerçekleştirilmiştir. Yukarıda bahsedilen çalışmalarla benzer şekilde her iki bölgeye ait tanılama sonuçları birbirleri ile tamamen uyuşmuştur ve birbirlerini doğrulamıştır. Moleküler tanılama sonucunda 11.7.3.2.2 kod numaralı izolatın *Myceliophthora thermophila*, 11.6.1.2.1 kod numaralı izolatın *Myceliophthora hinnulea*, 11.6.2.2.1, 11.7.1.2.6, 11.7.1.2.12, 11.7.1.2.13, 11.7.2.2.1 kod numaralı 5 izolatın *Melanocarpus albomyces*, 11.2.1.2.1, 12.6.3.2.2, 13.1.2.1.1 kod numaralı 3

izolatın *Rhizomucor pusillus*, 12.7.2.2.1 kod numaralı izolatın *Thermomyces lanuginosus*, 11.6.1.2.2 kod numaralı izolatın *Humicola grisea*, 13.3.2.2.3 kod numaralı izolatın *Humicola insolens*, 13.3.1.2.2, 15.2.1.1.1 kod numaralı 2 izolatın *Scytalidium thermophilum*, 11.1.1.1.1, 12.6.1.2.1 kod numaralı 2 izolatın *Talaromyces thermophilus*, 12.2.2.2.8 kod numaralı izolatın *Thielavia terrestris*, 11.7.1.2.2, 11.7.1.2.3, 11.7.2.2.2, 11.7.2.2.3, 11.7.3.2.1, 12.2.2.2.6, 13.2.2.1.1 kod numaralı 7 izolatın ise *Malbranchea cinnamomea* türünün üyeleri olduğu saptanmıştır.

Bu çalışma ile izole edilen 25 termofilik fungusun morfolojik ve moleküler tanılama çalışmaları ile elde edilmiş sonuçlarının %100 birbirleri ile uyumlu oldukları belirlenmiştir. Ancak Biolog sistemi ile elde edilen verilerden yola çıkarak oluşturulmuş olan ağaçta morfolojik ve moleküler çalışmalar ile aynı tür içerisinde yer alan izotların çoğu benzer kümeler içerisinde yer almamıştır. Bu ağaçta 11.7.1.2.2, 11.7.1.2.3, 11.7.2.2.3 ve 13.2.2.1.1 izolatlarının %100 aynı küme içerisinde toplandığı görülmüştür. Tanılama çalışmaları ile elde edilen verilerde bu izolatların *Malbranchea cinnamomea* türünün üyeleri olduğu saptanmıştır ve ağaçta elde edilen topoloji doğrulanmıştır. Ancak aynı türe dahil olduğu belirlenen 11.7.2.2.2, 11.7.2.2.3, 12.2.2.2.6 numaralı izolatlar bu kümeye farklı dallar ile bağlı bazal konumda yerleşmişlerdir. Benzer şekilde 11.6.2.2.1 ile 11.7.1.2.6 ve 11.7.1.2.13 ile 11.7.1.2.12 izolatlarının izolatlarının da %100 aynı küme içerisinde toplandığı ortaya konmuştur ve tanılama çalışmaları ile bu izolatların *Melanocarpus albomyces* türünden olduğu saptanmıştır. Elde edilen bu iki ayrı küme ağaç üzerinde birbiri ile çok uzak mesafede konumlanmıştır. Ayrıca yine bu türe dahil olan 11.7.2.2.1 izolatı da ayrı bir konumda yerleşmiştir. Tanılamalar ile aynı tür içerisine giren diğer izolatlar içinde ağaç dallanmaları bu durumla örtüşmemektedir. Biolog sistemi ile gerçekleştirilen karbonhidrat testlerinin sonuçları ile oluşturulmuş olan ağaç güvenilir bir topoloji göstermesine karşılık birkaç izolat hariç türler arası ve tür içi ilişkileri doğrulayamamıştır. Bu durum karbon kaynaklarını kullanımlarının test edilmesi ile oluşturulan profillerin tek başına termofilik funguslarda akrabalık ilişkilerini ortaya koymakta yetersiz kaldığını göstermiştir.

Dizi analizi sonucunda elde edilen dizi bilgileri ile izolatların tür düzeyinde tanılamalarının yanı sıra birbirleri ile olan yakınlıklarının incelenmesi amacıyla filogenetik ağaçları çizilmiştir. Neighbour-Joining analizleri 2

filogenetik ağaç elde edilmiştir. Birincisi ITS1-5.8S-ITS2 bölgesine ait dizi bilgileri, ikincisi ise D1/D2 bölgesine ait dizi bilgileri ve NCBI gen bankasındaki en yakın ilişkili oldukları türlerin dizi bilgileri kullanılarak çizilmiştir.

Şekil 3.15’de görüldüğü gibi elde edilen izolatların ITS1-5.8S-ITS2 gen tabanında birbirleri ile ve gen bankasındaki en yakın türler ile olan evrimsel ilişki ele alınmıştır. Ağacın istatistiksel güvenilirliği incelendiğinde “bootstrap” değerlerinin %50’nin üzerinde olduğu noktalarda dallanma topolojisinin güvenilir olduğu anlaşılmıştır. “Bootstrap” değerlerinin %50’nin altında olduğu 5 dallanma noktası görülmüştür. *Rhizomucor pusillus* olarak tanımlanan 11.2.1.2.1, 12.6.3.2.2, 13.1.2.1.1 kod numaralı 3 izolatın gen bankasından alınan diğer *Rhizomucor pusillus* lar ile %99 yakın akraba olduklarını ve aynı küme içerisinde yer aldıklarını göstermiştir. ITS filogenetik ağacı üzerinde bir küme oluşturan *Thermomyces lanuginosus* türlerine *Talaromyces thermophilus* türlerinin yakın akraba oldukları ve *Talaromyces thermophilus* türlerinin de aynı kümede yer aldığı belirlenmiştir. *Malbranchea cinnamomea* olarak tanımlanan 11.7.1.2.2 hariç 11.7.1.2.3, 11.7.2.2.2, 11.7.2.2.3, 11.7.3.2.1, 12.2.2.2.6, 13.2.2.1.1 kod numaralı 6 izolat %99 aynı küme içerisinde toplandığı görülmüştür. 11.7.1.2.2 ise bu grup içerisinde bazal konumda bir dalda bulunmaktadır ve bu durumu ITS bölgesindeki mutasyon gibi faktörlerin oluşturabileceği düşünülmüştür. *Melanocarpus albomyces* olarak tanımlanan 11.6.2.2.1, 11.7.1.2.6, 11.7.1.2.12, 11.7.1.2.13, 11.7.2.2.1 kod numaralı 5 izolat *Sordariales* sp. ve *Chaetomium* sp. türleri ile aynı küme içerisinde çıkmıştır. Bu küme 11.6.1.2.1 numaralı *Myceliophthora hinnulea* ve 11.7.3.2.2 kod numaralı *M. thermophila*’nın içerisinde yer aldığı *Myceliophthora* türlerinin bulunduğu küme ile kardeş küme olarak konumlanmıştır. 12.2.2.2.8 numaralı *Thielavia terrestris* ise *Myceliophthora* kümesine bazal konumda bir dal üzerinde bulunmaktadır.

Humicola grisea olarak tanımlanan 11.6.1.2.2 kod numaralı izolat, *Humicola insolens* olarak tanımlanan 13.3.2.2.3 kod numaralı izolat ve *Scytalidium thermophilum* olarak tanımlanan 13.3.1.2.2, 15.2.1.1.1 kod numaralı 2 izolat ile yakın akraba türler “Bootstrap” tekrarlarının %67sinde birbirleri ile akraba oldukları bir grup içerisinde toplanmışlardır. Fakat *Humicola insolens* türleri bu grup içerisinde bazal bir grup oluşturmuşlardır. Bu üç organizmanın toplandığı kümedeki dallar bu grup içerisinde düşük genetik varyasyon olduğunu göstermektedir. Bu gruptaki türlerin morfolojik tanımlamalarında eşeysiz sporların

oluşum yeri ve tipi ile ilgili elde ettiğimiz farklar dışında büyük bir makroskobik ve mikroskobik fark bulunamamıştır. Ancak morfolojik tanılamada Cooney ve Emerson'un (1964) yayınladıkları çalışmaları esas alındığından farklı türler olarak tanımlanmışlardır.

Bu durumu aydınlatmak için Straarsma ve Samson (1993) yaptıkları çalışmada çok fazla sayıda *Torula thermophila*, *H. grisea* var. *thermoidea* ve *H. insolens* türünü karşılaştırmışlardır. Sonuçta bu fungusların bir değişken tür veya "morfolojik olarak ayırt edilemez türler kompleksi" olarak *S. thermophilum* içerisinde toplanabileceğini ve sonraki çalışmalarda bu hali ile kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

Çalışmamıza benzer olarak Lyons ve ark., (2000) ITS nükleotid dizilerini kullanarak *S. thermophilum*, *H. insolens*, *H. grisea*, *H. hyalothermophila*, *H. brevis* ve *H. indonesiacum*'nın türlerinin birbirleri ile ilişkilerini belli etmek için oluşturdukları filogenetik ağaçta *S. thermophilum*, *H. insolens*, *H. grisea*'nın aralarında düşük genetik varyasyon bulunan bir grup oluşturduklarını ve diğer türlerden ayrıldıklarını belirlemişlerdir. *S. thermophilum*, *H. insolens*, *H. grisea*'dan oluşan grubun "*Torula-Humicola* kompleksi" olarak daha önce belirtildiği şekilde veya tek bir tür altında toplanabileceğini ve bu grup içindeki genetik farklarının morfolojik ve termogravimetrik farklarla ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

Şekil 3.16'de görüldüğü gibi elde edilen izolatların rDNA (26–28S)'nın büyük alt ünitesinin yüksek değişken D1/D2 bölgesi gen tabanında birbirleri ile olan evrimsel ilişki ele alınmıştır. Ağacın istatistiksel güvenilirliği incelendiğinde %39 değeri hariç "Bootstrap" değerlerinin oldukça yüksek olduğu ve bu nedenle ağaç topolojisinin güvenilirliğinin çok iyi olduğu anlaşılmıştır. *Rhizomucor pusillus* olarak tanımlanan 11.2.1.2.1, 12.6.3.2.2, 13.1.2.1.1 kod numaralı 3 izolatın gen bankasından alınan diğer *Rhizomucor pusillus*lar ile %100 yakın akraba olduklarını ve aynı küme içerisinde yer aldıklarını göstermiştir. *Malbranchea cinnamomea* olarak tanımlanan 11.7.1.2.2, 11.7.1.2.3, 11.7.2.2.2, 11.7.2.2.3, 11.7.3.2.1, 12.2.2.2.6, 13.2.2.1.1 kod numaralı 7 izolatın %100 aynı küme içerisinde toplandığı görülmektedir. *Melanocarpus albomyces* olarak tanımlanan 11.6.2.2.1, 11.7.1.2.6, 11.7.1.2.12, 11.7.1.2.13, 11.7.2.2.1 kod numaralı 5 izolat %98 güvenilirlikle aynı küme içerisinde çıkmıştır. *Humicola grisea* olarak tanımlanan 11.6.1.2.2 kod numaralı izolat, *Humicola insolens* olarak

tanımlanan 13.3.2.2.3 kod numaralı izolat ve *Scytalidium thermophilum* olarak tanımlanan 13.3.1.2.2, 15.2.1.1.1 kod numaralı 2 izolat ile yakın akraba türler “bootstrap” tekrarlarının %99’unda aralarında düşük genetik varyasyon bulunan bir grup içerisinde toplanmışlardır. *Malbranchea cinnamomea* olarak tanımlanan 11.7.1.2.2, 11.7.1.2.3, 11.7.2.2.2, 11.7.2.2.3, 11.7.3.2.1, 12.2.2.2.6, 13.2.2.1.1 kod numaralı 7 izolatın %100 aynı küme içerisinde toplandığı görülmektedir.

Thermomyces lanuginosus ve *Talaromyces thermophilus* türleri ITS filogenetik ağacındaki kadar yakın ilişki halinde çıkmış olmasa da yine D1/D2 ağacı üzerinde de birbirleri ile kardeş dallarda konumlanmışlardır. Bu durumdan yola çıkarak *Talaromyces* genusunun tek termofilik üyesi olan *Talaromyces thermophilus*’un *Thermomyces lanuginosus* ile aynı grup içerisinde yer alması gerektiği sonucuna varılmıştır. Ancak bu değişikliğin farklı gen bölgelerinin her iki tür için analizleri ile desteklenmesi gerektiği düşünülmüştür.

Talaromyces ve *Penicillium* subgenus *Biverticillium* içerisindeki taksonların filogenisi ve adlandırılması için yapılmış olan benzer bir çalışmada ITS, RNA polimeraz II genleri dizilenmiştir. Dizi analizleri sonucunda oluşturulan filogenetik ağaçlarda *Talaromyces thermophilus*’un *Talaromyces s. str.* dışında yer aldığı ve *Thermomyces lanuginosus* ile yakın ilişki içerisinde olduğunu ortaya konmuştur ve yapılacak ileri çalışmalarla *Talaromyces thermophilus*’un *Thermomyces* içerisine kaydırılmasının söz konusu olabileceği ortaya konmuştur (Samson ve ark., 2011).

Termofilik fungus izolatlarının ITS1-5.8S-ITS2 ve rDNA (26–28S)’nın büyük alt ünitesinin yüksek değişken D1/D2 bölgelerinden ve bu bölgelerin blast analizlerinde elde edilen en yakın ilişkili türlerin dizileri ile oluşturulan dendogramların birbirleri ile benzer topolojiye sahip oldukları ve birbirlerini doğruladıkları görülmüştür. Zygomycetes içerisinde mucorales ordosunda yer alan *Rhizomucor pusillus* türleri her iki ağaçta da ayrı bir grup oluşturmuş ve bu grup clade1 olarak verilmiştir. Her iki ağaçta da *Rhizomucor pusillus* ile aynı düğüm noktasından ayrıldığı görülen *Thermomyces lanuginosus* ile *Talaromyces thermophilus*’dan oluşan clade 2 ve *Malbranchea cinnamomea*’ların oluşturduğu clade 3’ün bulundukları dallar oldukça farklı uzunluklarda olmaları filogenetik olarak uzak olduklarını göstermiştir. *Thermomyces lanuginosus* ve *Malbranchea cinnamomea* her ikisi de Ascomycetes’in üyeleri olmalarına karşılık farklı ordolar içerisinde bulunmaları bu durumu doğrular niteliktedir

(www.indexfungorum.org). Elde edilmiş olan her iki dendogramda da clade 4 üç ayrılmıştır. Clade 4 içerisinde yer alan üç kümeden clade 4A “*Torula thermophila* kompleks” (*S. thermophilum*), clade 4B *M. thermophila* grubu ve onunla bazal konumda yerleşmiş olan *M. hinnulea* ve *T. terrestris*, clade 4C ise *M. albomyces* grubundan oluşmaktadır. Bu kümeler filogenetik ağaçlar üzerinde oldukça yakın ilişkili çıkmışlardır. Ascomycetes içerisinde yer alan türlerden oluşan bu üç kümede ordoların dağılımında literatürler arasında bir karışıklık bulunmaktadır.

Mouchacca (1997) termofilik fungusların taksonomisi üzerine yaptığı çalışmada *H. insolens* ve *H. grisea*’nın Sordariales, *S.thermophilum*’un Helotiales, *M. albomyces*’in Sordariales, *T.terrestris*’in yine Sordariales, *Myceliophthora* türlerinin ise Onygonales içerisinde yer aldığını ortaya koymuştur.

Ancak çalışmamıza benzer şekilde Morgenstern ve ark. (2011) termofilik fungusların filogenisini inceledikleri araştırmalarında ITS1-5.8S-ITS2 bölgesini baz alarak Sordariales ordosunda yer alan Chaetomiaceae, Lasiosphariaceae ve Sordarieceae familyalarının ilişkilerini belirlemek amacıyla bir filogenetik ağaç oluşturmuşlardır. Elde ettikleri ağaçta uç dallanma noktalarındaki yüksek bootstrap değerleri pek çok türün aralarındaki ilişkileri güvenilir şekilde değerlendirmelerini sağlamıştır. Bu ağaca göre termofilik türler 3 temel clade oluşturmuşlardır. Birinci clade %99 güvenilirlikle *Myceliophthora thermophila*, *Myceliophthora hinnulea*, *Corynascus thermophilus* ve *Myriococcum thermophilum* tarafından, ikinci clade *Remersonia thermophila*’nın kardeş takson olarak yer aldığı *Scytalidium-Torula-Humicola complex*, üçüncü clade ise *Thielavia terrestris*, *Chaetomium thermophilum* ve *Melanocarpus albomyces* yer aldığı bildirilmiştir. Bu üç kümenin oluşturduğu ağaç topolojisinden dolayı da tamamının Chaetomiaceae familyasında yer aldıkları ortaya konmuştur. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz ağaç topolojileri Morgenstern ve ark. (2011) oluşturdukları filogenetik ağaç topolojisi ile oldukça uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Termofilik funguslar biyolojik dönüşüm proseslerinde görev almaktadırlar. Bu görevlerini yerine getirmek için çok sayıda enzimi ve endüstriyel olarak önemli pek çok metaboliti sentezleme yeteneğine sahiptirler (Mouchacca, 2007). Bu enzimlerden bir tanesi de termostabilite özelliğine sahip fitaz enzimi dir. Çalışmamızda sıcak su kaynaklarından termofilik fungusların izolasyonu ve

tanılanmasının devamında elde edilen termofilik fungusların fitaz enzimini üretme yeteneklerinin araştırılması da amaçlanmıştır.

Mikroorganizmalar tarafından üretilen fitaz enzimleri içerisinde termofilik fungusların ürettiği fitazlar, geniş pH aralığı, yüksek spesifik aktivite ve termostabilite gibi sebeplerden dolayı önem kazanmaktadır. Dünyada fitaz enziminin kullanımının artması nedeniyle bu enzim bilim ve teknolojinin oldukça ilgilendiği bir alan olmuştur. Fitaz enzimi özellikle yem ve gıdalara ilavesi ile fitik asit fosfatından faydalanmayı sağlaması, buna paralel olarak da hayvansal atıklardaki fosfatın oluşturacağı çevre kirliliğini önlemesiyle ön plana çıkmaktadır. Spesifik fitik asit veya inositol türevi ürünlerdeki gelişmeler de dikkati çekmekte ve fitaz enziminin kullanımı için yeni bir alan oluşturmaktadır. Fungal fitazlar üretimleri ve uygulanmalarının kolaylığı nedeni ile teknolojik ve ekonomik anlamda önerilmektedir (Aşan, 2007).

Tüm bu sebeplerden dolayı farklı bir kaynak olarak sıcak sulardan izole edilmiş termofilik bir fungus tarafından sentezlenen fitaz enziminin sahip olabileceği kendisine has özellikler bu alanda yeni gelişmeler sağlayabilecektir. Ayrıca üretilen enzimin KFF gibi ucuz maliyetli bir yöntem yoluyla maksimum miktarda üretilmesini sağlayacak optimizasyon çalışmaları da oldukça önem kazanmaktadır.

Termofilik izolatların fitaz enzimi üretim yeteneklerinin taranması fitaz tarama ortamında gerçekleştirilmiştir ve sonuçta izolatlarımızın %44' ünün az veya çok seviyede olmak üzere fitaz ürettiği belirlenmiştir. Ancak tarama ortamında fitaz enzimi ile birlikte fungusların ürettiyor olabilecekleri diğer asit fosfatazlardan kaynaklanan zonların da olabileceğinden dolayı ikinci bir seçim işlemi yapılmıştır. KFF ile gerçekleştirilecek tarama işleminde kullanılmak üzere izolatların fitaz tarama ortamında oluşturdukları zonlar değerlendirilerek en büyük şeffaf zonu oluşturan beş izolat seçilmiştir. Bu izolatlar 11.7.3.2.2 numaralı *M. thermophila*, 11.7.1.2.12 numaralı *M. albomyces*, 11.2.1.2.1 numaralı *R. pusillus*, 11.7.1.2.6 numaralı *M. albomyces* ve 12.7.2.2.1 numaralı *T. lanuginosus* dur. Seçilen beş termofilik fungus KFF üretim ortamında geliştirilerek enzim üretimi sağlanmıştır. Üretim sonrasında elde edilen ham enzim ekstraktları ile yapılan fitaz aktivite analizleri sonucunda 12.7.2.2.1 izolat numaralı *T. lanuginosus*'un en yüksek aktivite (0,286 U/ml/dk) gösteren tür olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamıza benzer şekilde Gargova ve ark. (1997) *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, ve *Rhizopus* genuslarını içeren 203 fungal strain ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında fitaz üretimini belirlemek için iki basamaklı tarama işlemini kullanmışlardır. Birinci aşamada fitaz tarama ortamında yapılan taramanın ardından mısır nişasta ortamında enzim üretimini gerçekleştirip fitaz aktivitesine bakarak hem asit fosfataz hemde fitaz üreten fungus olarak *Aspergillus sp.* 307'yi belirlemişlerdir.

Yine çalışmamıza benzer şekilde tarama çalışmalarında fitaz ürettiğini belirlediğimiz funguslardan *M. thermophila* (Hassouni ve ark., 2006), *R. pusillus* (Chadha ve ark., 2004) ve *T. lanuginosus* (Gulati ve ark., 2007a) KFF ile fitaz enzimi üretiminde daha önce yapılmış çalışmalarda kullanılmıştır.

Kültürel ortamda yapılan taramalar ve KFF çalışması ile diğer suşlara kıyasla yüksek oranda fitaz ürettiği belirlenen ve katı faz fermentasyon ile fitaz üretimi için seçilen 12.7.2.2.1 izolat numaralı *T. lanuginosus*'un fitaz geninin varlığı belirlenmiştir. Fitaz enzimini üretmekten sorumlu gen bölgesi 1488 bp boyutunda amplifiye edilmiştir. *T. lanuginosus* izolatlarının kısmi fitaz gen bölgesinin dizi bilgisinin blast programı ile değerlendirilerek "Genozymes Project Public Genomes" gen bankasında "3-phytaseA, *T. lanuginosus*" geni ile %98 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

T. lanuginosus'un fitaz geninin moleküler karakterizasyonu ve ekspresyonu üzerine yapılmış olan bir çalışmada phyA geni çoğaltılmış, klonlanmış ve ekspresyon sonrasında rekombinant gen ürünü biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Bu analizlerde fitaz geninin 1480 bp boyutunda olduğu belirlenmiştir ve bu sonuç elde ettiğimiz fitaz geni boyutu ile yaklaşık olarak aynıdır (Berka ve ark., 1998).

Yine benzer şekilde Balasubramanian ve Palanivelu (2011) *T. lanuginosus*'un fitaz geninin moleküler klonlanması ve ekspresyonu üzerine yaptıkları çalışmada fungal genomik DNA'nın spesifik primerler ile amplifikasyonu sonucu ~1400 bp boyutundaki fitaz genini çoğaltmışlardır.

Katı faz fermentasyon yüksek ürün konsantrasyonu, basit inkübasyon ekipmanları, daha saf ham fermente ürün gibi pek çok ekonomik ve pratik avantajlara sahiptir. Tüm bu sebeplerden dolayı son yıllarda oldukça ilgi çekmiştir. Mikroorganizmalar için özellikle de funguslar için fitaz enziminin optimum koşullarda üretilmesini sağlayacak tanımlanmış bir ortam

bulunmamaktadır. Özellikle KFF ile maksimum seviyede enzim üretiminde her fungus için spesifik koşullar ve besin ortamları bulunmaktadır. Bu nedenle üretim sürecinin ve kullanılan besin ortamının optimize edilmesi maksimum seviyede enzim üretimi için vazgeçilmezlerdendir.

KFF’de *T. lanuginosus*’dan fitaz enzimi üretiminde substrat türü, başlangıç nem düzeyi, inokulum miktarı ve üretim süresi; her bir parametrenin birbirinden bağımsız olarak test edilmesi ile optimize edilmiştir. *T. lanuginosus*’dan enzim üretiminde en uygun substratı belirlemek için KFF’de buğday kepeği, pirinç kepeği, yulaf kepeği, çavdar kepeği, arpa kepeği, bonkalit, öğütülmüş ayçiçeği sapı ve öğütülmüş fındık kabuğu substrat olarak kullanılmıştır. En yüksek enzim sentezinin pirinç kepeği içeren KFF ortamında (0,314 U/ml/dk) gerçekleştiği yapılan aktivite ölçümleri sonucu belirlenmiştir. Substrat olarak çavdar kepeği içeren KFF ortamında fitaz enzim aktivitesinin en düşük miktarı (0,048 U/ml/dk) elde edilmiştir. KFF’de kullanılan substratlar içerisinde en yüksek fitik asit konsantrasyonu pirinç kepeğinde bulunmaktadır (Afinah ve ark., 2010). Ancak buna karşılık termofilik funguslarla gerçekleştirilen pek çok KFF’de substrat olarak buğday kepeği kullanılmıştır (Chadha ve ark., 2004; Javed ve ark., 2010; Hassouni ve ark., 2006; Gulati ve ark., 2007a; Gulati ve ark., 2007b; Bhavsar ve ark., 2010). Tüm bu çalışmalardan farklı olarak *T. lanuginosus*’dan KFF yoluyla fitaz enzimi üretiminde en uygun katı substratın pirinç kepeği olduğu saptanmıştır.

Farklı oranlarda başlangıç nem düzeylerine sahip, substrat olarak pirinç kepeğinin kullanıldığı KFF çalışmalarının sonucunda en yüksek enzim aktivitesi (0,812 U/ml/dk) nem oranı %70 olan ortamda elde edilmiştir. Ortamlardan elde edilen aktivitelerin küçükten büyüğe 0,4, 0,41, 0,499, 0,6, 0,623, 0,653 U/ml/dk olarak sırasıyla % 20, 30, 40, 50, 60, 80, 70 başlangıç nem düzeyindeki ortamlardan elde edilmiştir.

KFF’de nem mikroorganizmaların büyümesi ve enzimlerin sentezinde önemli bir role sahiptir. Yüksek nem oranları substratın gözeneklerinin azalmasına sebep olarak oksijenin girişini engellemekte, diğer yandan düşük nem oranları ise zayıf mikrobiyal gelişime sebep olmaktadır (Pandey ve ark., 1999). Bunların yanında optimum nem oranı hem fungal türe hem de kullanılan substrata bağlıdır. Yapılmış olan bir çalışmada şeker kamışı posası üzerinde *M. thermophila* ile gerçekleştirilen KFF’de en yüksek fitaz aktivitesi %75 nemli ortamda elde

edilirken (Hassouni ve ark., 2006), diğ er bir çalışmada ise buğday kepeğinin kullanıldığı KFF’de *A. niger*’in %200 nemli ortamda en y uksek fitaz sentezini gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Bhavsar ve ark., 2010).

 nokulum miktarını optimize etmek için aşı kültür miktarları % 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 (v/w) olarak ayarlanmıştır. Maksimum enzim aktivitesinin 0,966 U/ml/dk olarak elde edildiği inokulum miktarı %40 olarak saptanmıştır. %10’luk inokulant miktarında ise en düşük aktivite olan 0,559 U/ml/dk elde edilmiştir.

Gulati ve ark., (2007a) buğday kepeği üzerinde KFF yöntemi ile gerçekleştirdikleri fermentasyonda mutant *T. lanuginosus* TL-7 kullanmışlardır. Yapmış oldukları optimizasyon çalışması ile maksimum fitaz aktivitesine %20 inokulum miktarı ile ulaştıklarını rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamız ile bu çalışma arasındaki optimum inokulum miktar farkının kullanılan fungal strain ve substrattan kaynaklandığı düşünülmektedir.

T. lanuginosus’un maksimum enzim sentezlediği üretim süresini bulmak için 4. günden itibaren 20. Güne kadar enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır. Enzim aktivitesi 4. günden 7. güne kadar y ukseliş göstermiştir ancak 8. günde hızlı bir düşüş meydana gelmiştir ve 20. güne kadar sabit bir düzeyde devam etmiştir. Üretim sürecinin 7. gününde maksimum düzeye ulaşan enzim aktivitesi 1,011 U/ml/dk olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda enzim aktivitesinin maksimum düzeye çıktığı 7. gün optimum üretim süresi olarak belirlenmiştir.

Fitaz  retim parametrelerinin tamamının geleneksel yöntemlerle optimizasyonu oldukça zaman alıcı ve pahalı çalışmalardır (Vohra ve Satyanarayana, 2002b). Diğ er taraftan istatistiksel uygulamalar oldukça kullanışlı bir alternatif olarak görülmektedir. Cevap yüzey yöntemi (CYY) oldukça ekonomik bir yöntemdir ve test edilen faktörler arasındaki etkileşimlerin ortaya konmasını ve aynı zamanda değişkenlerin optimum değerlerinin tahminini de sağlamaktadır. CYY enzim üretimi gibi biyoproses optimizasyonlarında en sık kullanılan yöntemlerdendir. Çok sayıda parametrenin optimizasyonuna olanak vermesi ile de oldukça kullanışlı olduğu düşünülmektedir (Vohra ve Satyanarayana, 2002b; Chadha ve ark., 2004).

CYY’nin Merkezi Bileşke Tasarımı (CCD: Central composite design) fitaz üretimini etkileyen dört parametrenin [ nk basyon sıcaklığı (T), başlangıç pH

(pH), havalandırma alanı (H) ve aşı kültürün yaşı (Y)] optimum seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır ve ortalama tahmin edilen ve gözlenen cevaplar karşılaştırılmıştır. Deneyler tamamlandıktan sonra modelin istatistiksel testi Fisher'ın varyans analizleri (ANOVA) ile gerçekleştirilmiş ve elde edilen regresyon eşitlikleri, inkübasyon sıcaklığı, başlangıç pH, havalandırma alanı ve aşı kültürün yaşı'nın değerlerinin fonksiyonuyla üretilen fitaz seviyelerini ifade etmektedir.

Modelin kalitesi pek çok kriter kullanılarak kontrol edilmektedir. Bunlardan bir tanesi belirlilik katsayısı (R^2) dir. R^2 değeri her zaman 0-1 arasında olmalıdır ve değerin $>0,75$ olması modelin uygunluğunu göstermektedir. R^2 değeri 1'e ne kadar yakınsa mevcut model o kadar uygun demektir. Fitaz üretimi için belirlilik katsayısı (R^2) 0,95 olarak hesaplanmıştır. Bu, fitaz üretimi için deneysel sonuçların %95'inin model tarafından tahmin edilen verilerle uyumlu olduğu anlamına gelmektedir. İyi bir istatistiksel modelde bizim çalışmamızda olduğu gibi kullanılan dört parametrenin pozitif ve birbirlerine yakın değerlerde olmaları gerekmektedir. R^2 belirlilik katsayısı çoklu modellerde genellikle yeterli değildir. Çünkü çoklu regresyon modelleri için denkleme yeni değişken ilave edilmesi durumunda R^2 değeri genellikle artmaktadır. Bu yüzden anlamlı bir test yapabilmek için çoklu modellerde düzeltilmiş R^2 (adj. R^2) hesaplanmalıdır. Fitaz üretimi için düzeltilmiş R^2 %90,34 olarak hesaplanmıştır. Fitaz üretimi için korelasyon (ilişki) katsayısının (pred R^2) değeri ise 0,82 dir ve fitaz üretiminin deneysel ve tahmin edilmiş olan değerleri arasındaki güçlü uyumu göstermektedir.

F ve P değerleri modelin ve model parametrelerinin anlamlılıklarını göstermek için kullanılmaktadır. P değerleri 0,05'den küçük ise o model terimi anlamlı demektir. Fakat P değeri 0,1'den büyük ise o model terimi anlamsız demektir. Çalıştığımız modelin F değeri 21,04 ve P değeri 0,000 dır ve bu bize modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Fitaz üretimi için kullanılan faktörlerinden pH ve Y modelin anlamlı terimlerindendir. Ayrıca Tablo 3.14'de görüldüğü gibi pH^2 , H^2 , Y^2 , TpH , TH , TY , pHH , HY etkileşimleri de *T. lanuginosus*'un fitaz veriminde oldukça anlamlı etkiye sahiptirler.

Elde edilen bu model gerçek yanıt fonksiyonuna sadece bir yaklaşım olduğu için, tahminlenen değerler ile deneysel veriler arasındaki fark (kalıntı, residual error), sadece saf deneysel hatayı (saf hata, pure error) değil modelin matematiksel formunun uygunsuzluğundan kaynaklanan hatayı (uyum eksikliği,

lack of fit) da içermektedir. Uyguladığımız modelde uyum eksikliği F-değeri 0,52 ve uyum eksikliği P-değeri ise 0,826 dır ve bu değerler model uyumsuzluğunun anlamsız olduğunu göstermektedir. Anlamsız model uyumsuzluğu (uyum eksikliği) kullanılan modelin uyumlu olduğunu göstermektedir ve bu ulaşılmak istenen sonuçtur.

Değişkenler arasındaki etkileşimleri anlamak ve maksimum cevap için her bir değişkenin optimum seviyelerini belirlemek amacıyla cevap yüzey grafikleri çizilmiştir. Şekil 3.25-3.27’da görülen üç boyutlu cevap yüzey grafikleri fitaz üretiminin optimizasyonunda kullanılan değişkenlerin aralarındaki doğrusal olmayan etkileşimleri göstermektedir. İstatistiksel model, maksimum fitaz üretiminin (>1,4 U/ml/dk) başlangıç pH 7,5, havalandırma alanı % 30, 5 günlük aşı kültür ve 55 °C’de inkübasyon koşullarında elde edileceğini öngörmüştür.

Fitaz üretiminin model tarafından tahmin edilen optimum koşullar doğrultusunda gerçekleştirilmesi ile istatistiksel model doğrulanmıştır. Bu amaçla gerçekleştirilen fermentasyon sonucunda fitaz aktivitesi 3,156 U/ml/dk olarak belirlenmiştir ve bu değer istatistiksel model tarafından optimum koşullar altında ulaşılması tahmin edilen >1,4 U/ml/dk değerinin üzerinde çıkması modeli doğrulamaktadır. CYY ile optimizasyon öncesinde klasik yöntemle optimize edilmiş koşullarda elde edilen fitaz aktivitesi ise 1,011 U/ml/dk dır. *T. lanuginosus*’dan katı faz fermentasyonla üretilen fitaz aktivitesi Cevap yüzey yöntemi ile optimizasyon yoluyla 3,122 kat (%212) arttırılmıştır.

Çalışmamıza benzer şekilde istatistiksel optimizasyon yöntemleri kullanılarak fitaz enzimi üretim miktarlarında *Aspergillus niger* NCIM 563 ile yapılan fermentasyonda 3,08 kat (Bhavsar ve ark., 2010), *Rhizomucor pusillus* ile yapılan fermentasyonda 1,30 kat (Chadha ve ark., 2004), *Mucor racemosus* ile yapılan fermentasyonda 1,85 kat (Bogar ve ark., 2003), *Sporotrichum thermophile* ile yapılan fermentasyonda 2,07 kat (Singh ve Satyanarayana, 2006) ve *Pichia anomala* ile yapılan fermentasyonda ise 1,746 kat (Vohra ve Satyanarayana, 2002) artış sağlanmıştır.

Katkı maddelerinin etkilerinin belirlenmesi amacıyla çeşitli karbon kaynakları, azot kaynakları, metal tuzları ve yüzey aktif maddeler belirtilen oranlarda fitaz üretim ortamına eklenmiştir. İncelenen dört karbon kaynağı arasından (glukoz, maltoz, sükroz, mısır unu) 3,248 U/ml/dk’lık fitaz aktivitesi ile sükroz katkılı ortam, kontrol ortamında elde edilen 2,512 U/ml/dk fitaz

aktivitesinin üzerine çıkmıştır, üretim sürecinde pozitif etkili olduğu gösterilmiştir. Glukoz'un ortama eklenmesi ile oluşan fermentasyonda ise kontrole çok yakın değerlerde bir aktivite elde edilmiş ve etkisiz bir madde olduğu belirlenmiştir. Ancak maltoz ve özellikle de mısır unu fitaz üretimine negatif yönde etki etmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçların aksine sentetik besiyeri ortamında *M. thermophila* ile gerçekleştirilen fitaz enzim üretimini glukoz ilavesinin arttırdığı (Hassouni ve ark., 2006) ve benzer şekilde *Aspergillus niger* NCIM 563 ile yapılan fermentasyonda da glukoz ilavesinin fitaz üretimini arttırıcı etki yaptığı bildirilmiştir (Bhavsar ve ark., 2010).

Çalışmamızda, onbir farklı azot kaynağının (Üre, maya ekstraktı, tripton, triptik soy, pepton, nutrient broth, yağsız süt tozu, kazaminoasit, soya unu, malt ekstrakt, NH_4NO_3) KFF ile fitaz enzimi üretimi üzerine etkileri incelenmiş ve bu azot kaynaklarından hiçbirinin fermentasyonu indükleyici etkileri olmadığına karar verilmiştir. Diğer yandan üre, maya ekstraktı, pepton, nutrient broth ve NH_4NO_3 fermentasyon üzerinde oldukça negatif bir etki gösterdikleri belirlenmiştir.

Çalışmamıza benzer şekilde Gulati ve ark. (2007b) tarafından *M. indicus* ile KFF yoluyla fitaz enzimi üretimi gerçekleştirilmiştir. Substrat olarak buğday kepeği kullanılmış olan fermentasyonun optimizasyonunda azot kaynaklarından $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, et ekstraktı, mısır ıslatma sıvısı, malt ekstrakt, pepton, soyafasulyesi, tripton, üre ve maya ekstraktının etkileri incelenmiş ve $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ dışındaki tüm azot kaynaklarının fermentasyonu indüklediği belirlenmiştir.

Diğer taraftan Hassouni ve ark. (2006) sentetik besiyeri ortamında *M. thermophila* ile gerçekleştirilen fitaz enzim üretimine çoktan aza sırasıyla $(\text{NH}_4)_2\text{HSO}_4$, KNO_3 , pepton ve NH_4NO_3 indükleyici etki yaptıklarını bildirmişlerdir. Benzer şekilde *S. thermophile* ile şeker kamışı melası kullanılarak yapılan fermentasyonda $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ün fitaz enzimi üretimini indüklediği belirlenmiştir (Singh ve Satyanarayana, 2006).

Bu çalışmada, KFF'ye etkileri incelenen 7 farklı metal tuzundan yalnızca ZnSO_4 2,659 U/ml/dk aktivite ile kontrol ortamından elde edilen fitaz aktivitesinin üzerinde bir aktivite elde edilmesini sağlamıştır ve KFF üzerine pozitif bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Buna karşın CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 ve CuSO_4 fitaz üretimi üzerinde oldukça inhibe edici bir etki göstermişlerdir.

Çeşitli çalışmalarda azot kaynaklarından bazılarının fitaz enzim üretimini indükleyici etkilerine ait tespitler bulunmaktadır. *S. thermophile* ile şeker kamışı melası kullanılarak yapılan fermentasyonda ortama $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ilavesinin fitaz enzimi üretimini indüklediği belirlenmiştir (Singh ve Satyanarayana, 2006). Diğer bir çalışmada ise sentetik besiyeri ortamında *M. thermophila* ile gerçekleştirilen fitaz enzim üretiminin $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ve $CaCl_2$ ile indüklendiği bildirilmiştir (Hassouni ve ark., 2006). *Aspergillus niger* NCIM 563 ile yapılan fermentasyonda ise ortama $NaNO_3$ ilavesinin fitaz üretimini arttırıcı etki yaptığı bildirilmiştir (Bhavsar ve ark., 2010).

KFF'ye etkileri belirlenmeye çalışılan yüzey aktif maddeler ve SDS, EDTA'nın indükleyici bir etkiye sahip olmadıkları, tween 20 ve triton x-100 fermentasyonu oldukça negatif etkiledikleri belirlenmiştir. Benzer şekilde *Aspergillus niger* NCIM 563 ile yapılan fermentasyona katkı maddesi olarak triton X-100 ilavesinin fitaz üretimini negatif yönde etkilediğini bildirilmiştir (Bhavsar ve ark., 2010). Diğer taraftan Singh ve Satyanarayana (2006) çalışmalarında *S. thermophile* ile şeker kamışı melası kullanılarak yapılan fermentasyonda ortama tween 80 ilavesinin fitaz enzimi üretimini indüklediğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada kullanılmış olan optimizasyon stratejisi geleneksel ve istatistiksel yöntemlerin bir kombinasyonunu oluşturmuştur. Maksimum fitaz aktivitesi substrat olarak pirinç kepeğinin kullanılması ile elde edilmiştir. Maksimum enzim aktivitesi elde edilmesini sağlayan parametrelerin optimum seviyeleri %70 nem, 7 gün fermentasyon süresi, %40 inokulum büyüklüğü, 55 °C inkübasyon sıcaklığı, başlangıç pH 7,5, % 30 havalandırma alanı, 5 günlük aşı kültür, %1 sükroz, 2,5 mM $ZnSO_4$ olarak belirlenmiştir. Uygulanan optimizasyon çalışmaları sonucunda fitaz aktivitesinde 10,83 kat artış sağlanmıştır (0,30 – 3,248 U/ml/dk).

Sadece istatistiksel optimizasyon yöntemleri kullanılarak fitaz enzimi üretim miktarlarında *Aspergillus niger* NCIM 563 ile yapılan fermentasyonda 3,08 kat (Bhavsar ve ark., 2010), *Rhizomucor pusillus* ile yapılan fermentasyonda 1,30 kat (Chadha ve ark., 2004), *Mucor racemosus* ile yapılan fermentasyonda 1,85 kat (Bogar ve ark., 2003), *Sporotrichum thermophile* ile yapılan fermentasyonda 2,07 kat (Singh ve Satyanarayana, 2006) ve *Pichia anomala* ile yapılan fermentasyonda ise 1,746 kat (Vohra ve Satyanarayana, 2002) artış

sağlanmıştır. Bu tezde geleneksel ve istatistiksel yöntemlerin bir kombinasyonunu oluşturularak kullanılmış olan kapsamlı optimizasyon çalışmaları ile *T. lanuginosus* kullanılarak KFF yoluyla fitaz enzimi üretiminde büyük bir artış (10,83 kat) sağlanmıştır.

Bu araştırmada optimizasyon çalışması ile optimum üretim sıcaklığı 55 °C olarak belirlenmiştir. Termofilik funguslar kullanılarak KFF yöntemi ile gerçekleştirilen fitaz üretim çalışmalarında genellikle üretim sıcaklığı olarak 45 °C (Gulati ve ark., 2007a; Singh ve Satyanarayana, 2006; Singh ve Satyanarayana, 2009 Hassouni ve ark., 2006) ve 50 °C (Chadha ve ark., 2004; Gulati ve ark., 2007b) kullanılmıştır. Bu durum göz önüne alındığında üretim sıcaklığına bağlı olarak elde ettiğimiz fitaz enziminin diğer bahsedilen enzimlere göre termal stabilitesinin daha yüksek olması beklenmektedir. İleriki çalışmalarda gerçekleştirilmesi planlanan saflaştırma işlemleri sonrasında bu durumun açığa çıkarılması planlanmaktadır.

Uygulanan optimizasyon çalışmaları sonucunda *T. lanuginosus* kullanılarak üretilen fitaz enziminin spesifik aktivitesi 8,97 U/mg olarak hesaplanmıştır.

Gulati ve ark., (2007a) mutant *T. lanuginosus* TL-7 suşunu kullanarak gerçekleştirdikleri KFF ile fitaz enzimi üretim çalışmasında, optimizasyon sonucunda spesifik fitaz aktivitesini 32,19 U/g olarak belirlemişlerdir. Elde etmiş oldukları aktivite bizim çalışmamızdaki sonuca göre oldukça düşüktür bu nedenle çalışmamızda daha kullanışlı bir fitaz enzimi elde edildiği düşünülmüştür. Aynı fungus türü kullanılmasına karşılık aktiviteler arasındaki bu fark fungus suş farkı, kullanılan substrat gibi parametrelerin önemini oraya koymuştur.

Başka bir çalışmada ise *R. pusillus* ile gerçekleştirilen fitaz enzimi üretimi Box-Behnken istatistiksel dizaynı kullanılarak üç değişken parametre (pH, kültür yaşı ve inkübasyon periyot) açısından optimize edilmiştir. Optimizasyon sonrasında elde edilen maksimum spesifik aktivite 9,18 U/g olarak belirlenmiştir. Bu değerde bizim çalışmamızla kıyaslandığında oldukça düşüktür.

SDS-PAGE ve zimogram analizleri sonucunda, *T. lanuginosus* fitaz enziminin molekül ağırlığının yaklaşık 30 kDa olan tek protein bandı oluşturduğu belirlenmiştir ve zimogram analizi ile bu bandın fitaz enzime ait olduğu doğrulanmıştır.

Termofilik ve termotolerant fungusların saflaştırılmış fitaz enzimlerinin molekül ağırlıkları *A. fumigatus*, *Emericella nidulans*, *M. thermophila* ve *Talaromyces thermophilus* için sırasıyla 60,77, 66,43, 62,89 ve 128,4 kDa olduğu bildirilmiştir (Pandey ve ark., 2001). Ayrıca bizim çalışmamızdan farklı olarak Gulati ve ark., (2007a) *T. lanuginosus* TL-7'nin fitaz enziminin molekül ağırlığını SDS-PAGE yoluyla yaklaşık olarak 54 kDa olarak belirlemişlerdir. Ancak zimogram analizi ile SDS-PAGE'de elde ettikleri bu bandın fitaz enzime ait olup olmadığını doğrulamamışlardır. Bu anlamda *T. lanuginosus*'un ürettiği fitaz enziminin ilk kez bizim çalışmamız ile zimogram analizi gerçekleştirilmiştir.

Funguslar pek çok açıdan öneme sahip organizmalardır. Gıda sektörü, ilaç yapımı, değerli enzimlerin ve organik maddelerin üretimi gibi birçok alanda kullanılmaktadırlar. Bunun yanında önemli insan ve bitki patojeni funguslar da bulunmaktadır.

Dünyada çeşitli endüstriyel alanlarda enzimlerin kullanımının gün geçtikçe artması nedeniyle enzimler bilim ve teknolojinin oldukça ilgilendiği bir alan olmuştur. Endüstriyel proseslerde uygulanan yüksek sıcaklıklarda aktivitesini koruyan termostabil enzimlerin elde edilebildiği funguslar da dolayısıyla büyük önem taşımaktadır. Ayrıca termostabilite özelliğinin yanında termofilik fungusların ürettikleri enzimler geniş pH aralığı, yüksek spesifik aktivite gibi özelliklerinden dolayı da ön plana çıkmaktadır. Bu fungusların belirlenmesini ve endüstriyel ve çevresel öneme sahip enzimlerinin ortaya konmasını içeren çalışmalar oldukça önem arz etmektedir.

Sonuç olarak;

Genellikle tamamen aydınlatılmamış olmasına rağmen, sıcak su kaynakları muazzam bir biyolojik çeşitliliğe sahiptir ve bilimsel çalışmalar açısından oldukça değerlidir. Dünyada sıcak sulardan termofilik fungusların izolasyonuna ilişkin çalışmaya rastlanamamıştır. Bu nedenle bu çalışma Kütahya ve Afyon illerindeki dolayısıyla da Türkiye'deki termal suların termofilik fungus varlığının ortaya konması açısından bir ilk olmuştur ve ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bunun yanı sıra ülkemizde termofilik fungusların moleküler tekniklerle tanımlanmasına ilişkin çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan da araştırmamız bir ilk olmuştur. Araştırma sonucunda termofilik fungusların tanımlanması için kullanılan

geleneksel yöntemlerin oluşturduğu karmaşık ve zor uygulamalar moleküler tekniklerin kullanımı ile çözümlenmiştir.

Morfolojik ve Moleküler tanılamalar sonucunda 25 termofilik fungus izolatının *Myceliophthora thermophila*, *Myceliophthora hinnulea*, *Melanocarpus albomyces*, *Rhizomucor pusillus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Scytalidium thermophilum*, *Talaromyces thermophilus*, *Thielavia terrestris* ve *Malbranchea cinnamomea* türlerini kapsayan 11 farklı türden oluştuğu belirlenmiştir. Termofilik fungusların yaklaşık 30 farklı tür ile temsil edildiği düşünüldüğünde, bu tez çalışması incelenen termal suların termofilik funguslar açısından oldukça zengin bir kaynak olduğunu ortaya koymuştur.

Termal su tesislerine ve doğal sıcak sulardaki yüzme gibi faaliyetlerin popularitesinin artması termofilik/termotolerant mikroorganizmalar ile teması kaçınılmaz kılmaktadır. Bu nedenle termal kaynaklardaki fungusların belirlenmesi insan sağlığı açısından da bu anlamda önem teşkil etmektedir.

Termofilik funguslar pek çok açıdan öneme sahip organizmalardır. Ancak enzimlerinin sahip olduğu termostabilite onların yüksek ısıların uygulandığı endüstriyel proseslerde kullanımı açısından ön plana çıkmasını sağlamıştır. Bu tez çalışması ile elde edilen termofilik funguslardan *Thermomyces lanuginosus*'un fitaz enzimi ürettiği kültürel ve fitaz geninin belirlenmesi yoluyla moleküler yöntemlerle saptanmıştır.

Termofilik fungal strain *T. lanuginosus* kullanılarak gerçekleştirilen katı faz fermentasyonu klasik yöntem ve cevap yüzey yönteminin bir kombinasyonu kullanılarak oldukça yüksek verimde optimize edilmiştir. Optimizasyon sonucunda fitaz üretiminde 10,83 kat artış sağlanmıştır. Bu sonuç bize etkin bir optimizasyon çalışması ile enzim üretiminin üst seviyelere taşınabileceğini göstermiştir.

Cevap yüzey yöntemi ile optimizasyon sayesinde değişkenler arası etkileşimlerin de göz önünde bulundurulduğu oldukça verimli ve zaman tasarrufu sağlayan bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon yoluyla fitaz enzim miktarları arttırılmış ve bu da katı faz fermentasyon ile enzim üretiminde maliyetin azaltılmasını sağlamıştır.

T. lanuginosus ile gerçekleştirilen fitaz enzimi üretiminde fitaz enzimi üretim tuz solüsyonu, sükroz ve $ZnSO_4$ ile zenginleştirilmiş pirinç kepeği

kullanılmıştır. Pirinç kepeği katı faz fermentasyonda kullanılan diğer katı substratlara kıyasla oldukça yüksek fitik asit içermektedir. Buna karşın fitaz enzimi üretiminde şimdiye kadar termofilik funguslarla yapılmış olan KFF çalışmalarının hemen hemen tamamında katı substrat olarak buğday kepeği kullanılmıştır. Bu anlamda çalışmamızın fitaz enzimi üretiminde alternatif bir substratı öngörmesinden dolayı önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Fitaz enzimi üretiminde katı faz fermentasyonun seçilmesi ve bu yöntemde de tarımsal sanayi artığı olan pirinç kepeğinin substrat olarak kullanılması, ekonomik besin ortamı sayesinde düşük maliyetli bir üretim yapılmasını sağlamıştır. Elde ettiğimiz fitaz enziminin aktivitesi ve termal stabilitesinden yola çıkarak gelecek vaat ettiği düşünüldüğünde, daha büyük ölçekli üretimlere katkı sağlamak için ekonomik bir üretim süreci elde edilmeye çalışılmıştır.

Bu tez çalışması ile *T. lanuginosus*'un pH 7,5 ve 55 °C' de gerçekleştirilen üretim koşullarında yüksek seviyede fitaz enzimi sentezlediği belirlenmiştir. Bu üretim sıcaklığı literatürde geçen çalışmalar ile kıyaslandığında oldukça yüksektir. Bu durum göz önüne alındığında üretim sıcaklığına bağlı olarak elde ettiğimiz fitaz enziminin termal stabilitesinin daha yüksek olması beklenmektedir. İleriki çalışmalarda gerçekleştirilmesi planlanan saflaştırma işlemleri sonrasında bu durumun açığa çıkarılması planlanmıştır.

Fitaz enzimi hayvanların yemlerine ve insan beslenmesinde kullanılan fitat içerikli gıdalara eklenerek, gıda ve yemlerdeki fitat fosforundan yararlanılmasını artırmakta, fitatın beslenme karşıtı etkisini ortadan kaldırmakta, hayvanlardaki fitat kaynaklı düşük mineral Emilimi sorununu çözmektedir. Aynı zamanda fitaz enziminin yemlere ilavesi, entansif hayvan yetiştiriciliği yapılan alanlarda hayvansal atıklardaki fosforun toprakta ve sularda birikiminden kaynaklanan çevre kirliliğini önlemektedir. Bu sayede kirliliğin insanlar ve hayvanlar üzerinde oluşturacağı toksik etkiler de ortadan kalkmaktadır. Bu anlamda fitaz enzimi gıda ve yem sanayi için önemli bir potansiyele sahiptir. Bu tez ile elde edilen fitaz enzimi sanayide kullanılan yüksek sıcaklıkları tolare edecek termostabilite özelliğine sahip olması ve aktivitesinin yüksek olmasından dolayı gıda ve yem sanayi için önemli bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

Dünya'da farklı termofilik fungusların ürettiği fitaz enzimlerinin karakterizasyonu yapılmaya devam edilmekte ve henüz her açıdan ideal özelliklere sahip bir fitaz enzimi üretimi tam olarak gerçekleştirilememiştir. Fitaz

enziminin öneminin giderek artmasından dolayı ülkemizde üretilecek, daha ucuz maliyetli ve ticari olarak kullanılabilecek özelliklere sahip fitaz enzimine gereksinim gün geçtikçe artmaktadır. Fitaz enziminin daha önce belirttiğimiz özellikleri ve önemi göz önüne alındığında çalışmamızın hayvan ve insan beslenmesinde, sağlığında, çevre kirliliğinin giderilmesinde önemli yaklaşımlar getirebileceği düşünülmüştür. Ayrıca bu enzimin ileriki çalışmalarla saflaştırılıp karakterize edilmesi sonucunda ülke ekonomisine de önemli bir katkı sağlayacağı öngörülmüştür.

KAYNAKLAR

- Afinah, S., Yazid, A.M., Anis Shobirin, M.H. ve Shuhaimi, M. (2010), “Phytase: application in food industry”, *International Food Research Journal*. 17, 13-21.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. ve Lipman, D.J. (1997), “Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs”, *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Anastasi, A., Varase, G.C. ve Marchisio, V.F. (2005), “Isolation and Identification of Fungal Communities and Vermicompost”, *Mycologia*. 97 (1), 33-34.
- Antony, J. (2003), *Design of Experiments for Engineers and Scientists*, Elsevier Science and Tecnology Books, ISBN: 0750647094.
- Arifoğlu, N. ve Ögel, Z.B. (2000), “Avicel-Adsorable Endoglucanase Production by the Thermophilic Fungus *Scytalidium thermophilum* Type Culture *Torula thermophila*”, *Enzyme and Microbial Technology*. 27, 560-569,
- Aşan, M. (2007), “Mikrobiyal fitazlar, uygulama alanları ve biyoteknoloji”, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 13(2), 147-155.
- Bae, H.D., Yanke, L.J., Cheng, K.-J. ve Selinger, L.B. (1999). “A novel staining method for detecting phytase activity”, *Journal of Microbiological Methods*, 39, 17–22.
- Bailey J. E. ve Ollis D. F. (1977), *Biochemical Engineering Fundamentals*: Mc Graw-Hill. USA. Pp: 3-13. 26-28. 50-67. 334-337.
- Balasubramanian, S. ve Palanivelu, P. (2011), “Molecular cloning and Expression of a Phytase Gene from the Thermophilic Fungus, *Thermomyces lanuginosus*-RMB”, *Journal of Phytology*, 3(9), 20-22.
- Banga J.R., Balsa-Canto E., Moles C.G. ve Alonso A.A. (2003), “Improving food processing using modern optimization methods”, *Trends Food Sci & Tech*, 14: 131-144.

- Barnett H.L. ve Hunter, B.B. (1999) *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4. Baskı. APS Pres. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA.
- Baş D. ve Boyacı İ.H. (2007), “Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology”, *J Food Eng*, 78, 836-845.
- Bergmeyer, H.U. (1974), *Methods of Enzymatic Analysis*, Second English Edition Vol.1, Verlag Chemie International, Deerfield Beach, Florida.
- Berka, R.M., Rey, M., Brown, K.M., Byun, T. ve Klozt, A.V. (1998), “Molecular Characaterization and Expression of a Phytase Gene from the Thermophilic Fungus *Thermomyces Lanuginosus*”. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4423-4427.
- Bhavsar, K., Kumar, V.R. ve Khire, J.M. (2010), “High level phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 in solid state culture: response surface optimization, up-scaling, and its partial characterization”, *J Ind Microbiol Biotechnol*, DOI 10.1007/s10295-010-0926-z.
- Billington, D.C. (1993), *The Inositol Phosphates. Chemical Synthesis and Biological Significance*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Bohn, L., Meyer, A.S. ve Rasmussen, S.K. (2008), “Phytate: impact on environment and human nutrition, A challenge for molecular breeding”, *Journal of Zhejiang Univ. Sci. B*, 9(3),165-191.
- Bommarius, A.S. ve Riebel, B.R., (2000), “Biocatalysis“, *Wiley-VCH Verlag Gmbh & Co. KGaA* . 611, 152-158.
- Boonlue, S., Aimi, T. ve Morinaga, T., (2002), “Molecular Characterization of a Xylanase-Producing Thermophilic Fungus Isolated from Japanese Soil”, *Current Microbiology*. 47,119-124.
- Boyce, A. ve Walsh, G. (2006), “Comparasion of Selected Physicochemical Characteristics of Commercial Phytases Relevant to their Application in Phosphate Pollution Abatement”, *Journal of Environmental Science and Health Part A*. 41, 789-798.

- Brand, D., Pandey, A., Roussos, S. ve Soccol, C.R. (2000), "Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system", *Enzyme Microb. Technol.* 27 (1-2), 127-133.
- Bruns, T.D., White, T.J. and Taylor, J.W. (1991), "Fungal Molecular Systematics", *Annual Review of Ecology and Systematic.* 22, 525-564.
- Cao, L., Wang, W., Yang, C., Yang, Y., Diana, J., Yakupitiyage, A., Luo, Z. ve Li, D. (2007), "Application of Microbial Phytase in Fish Feed", *Enzyme and Microbial Technology.* 40, 497-507.
- Castillo E.D. (2007), *Process Optimization, a Statistical Approach*, Springer Science + Business Media, LLC, New York, NY.
- Chadha, B.S., Harmeet G., Mandeep M., Saini, H.S. ve Singh, N. (2004), "Phytase Production by the Thermophilic Fungus *Rhizomucor Pusillus*", *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 20, 105-109.
- Chen C.C., Wu P.H. ve Huang C.T. (2004), "A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an Escherichia coli phytase", *Enzyme and Microbial Technology.* 35, 315-320.
- Chen, J.C. (1998), "Novel screening method for extracellular phytase-producing microorganisms", *Biotechnology Techniques*, 12, 759-761.
- Chen, J.C. (1998), "Novel Screening Method for Extracellular Phytase-Producing Microorganisms, *Biotechnology Techniques.* 12, 759-761.
- Choi, Y., Hyde, K.D. ve Ho, W.W.H. (1999), "Single Spor Isolation of Fungi", *Fungal Diversity.* 3, 29-38.
- Cooney D.C. ve Emerson, R. (1964), *Termophilic fungi: An Account of their Biology, Activities and Classification.* San Francisco. W.H. Freeman Publishers.
- Cowteson, A.J., Acamovic, T. ve Bedford, M.R. (2004), "The Effects of Phytase and Phytic Acid on the Loss of Endogenous Amino Acids from Broiler Chickens", *British Poultry Science*, 45, 101-108.
- Crisan E.V. (1973), "Current concepts of thermophilism and the thermophilic fungi", *Mycologia*, 65, 1171-98.

- Dalal, R.C. (1978), "Soil organic phosphorus". *Adv. Agronom.*, 29, 83-117.
- Day, P.R. (1996), "Genetic modification of plants: significant issues and hurdles to success", *Am. J. Clin. Nutr.*, 63, 651S-656S.
- De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M. R., Mcsweeney, P. L.H., Faccia, M., Giovine, M. ve Gobbetti, M. (2003), "Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1", *Int. J. Food Microbiol.*, 87, 259- 270.
- Demain, A.L. ve Solomon, N.A. (1981), *In Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*, Scientific American, Freeman &Comp., San Francisco.
- Dungelhoef, M., Rodehutschord, M., Spiekers, H. ve Pfeffer, E. (1994), "Effects of supplemental microbial phytase on availability of phosphorus contained in maize, wheat and triticale to pigs", *Animal Feed Science and Tecnology*. 49(1-2), 1-10.
- Durand, A., Renaud, R., Almanza, S., Maratray, J., Diez, M. ve Desgranges, C. (1993), "Solid-state fermentation reactors: from lab scale to pilot plant", *Biotechnol. Adv.* 11, 591-597.
- Ellis G.H. (1971), *Dematiaceus Hyphomycetes*. CAB. Kew. U.K.
- Feil, B. (2001), "Phytic Acid", *Journal of New Seeds.*, 3(3), 1-35.
- Gargova, S., Roshkova, Z. ve Vancheva, G. (1997), "Screening of Fungi for Phytase Production", *Biotechnology Techniques*. 11, 221-224.
- Gautam, P., Sabu, A., Pandey, A., Szakacs, G. ve Soccol, C.R. (2002), "Microbial production of extra-cellular phytase using polystyrene as inert solid support", *Bioresour Technol*, 83, 229-233.
- Geiser D.M. (2004), "Advances in Fungal Biotechnology for Industry: Agriculture and Medicine", *Practical Fungal Molecular Taxonomy*. Kluwer Academic, 1-12.
- Gözükara E. (1997), *Biyokimya 2*. Nobel Tıp Kitapevleri. Pp: 575-580.

- Greaves, M.P., Anderson, G. ve Webley, D.M. (1967), "The hydrolysis of inositol phosphates by *Aerobacter aerogenes*", *Biochim. Biophys. Acta* 132, 412-418.
- Greiner, R., Haller, E., Konietzny, U. ve Jany, K.D. (1997), "Purification and characterisation of a phytase from *Klebsiella terrigena*", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 341, 201–206.
- Grenier, R. ve Konietzny, U. (2006), "Phytase For Food Application", *Food Technol.Biotechnol.* 44 (2), 125-140.
- Griffiths, L.J., Aynim, M., Doffman, S.R., Wilks, M., Millar, M.R. ve Agrawal, S.G. (2006), "Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* Using Real-Time PCR", *Journal of Medical Microbiology*, 55, 1187-1191.
- Guerra, P., Torrado-Agrasar, A., López-Macias C. ve Pastrana P. (2003), "Main Characteristics and Applications of Solid Substrate", *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* 2 (3), 343-350.
- Gulati, H.K., Chadha, B.S. ve Saini, H.S. (2007a), "Production, Purification and Characterization of Thermostable Phytase From Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus* TL-7", *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 54 (2), 121-138
- Gulati, H.K., Chadha, B.S. ve Saini, H.S. (2007b), "Production of feed Enzymes (Phytase and Plant Cell Wall Hydrolyzing Enzymes) by *Mucor indicus* MTCC 6333: Purification and Characterization of Phytase", *Folia Microbiol.* 52(5), 491-497.
- Haliki, A. (1992). *İzmir iline bağlı Bergama yöresindeki bazı kültürasyon alanlarından izole edilen mezofilik, termofilik ve termotolerant funguslar üzerinde bir araştırma*. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Halil, E. ve Kalkanci, A. (2008) "Thermophilic Fungi", *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*. 22 (2), 117-122.

- Han, Y., Wilson, D.B. ve Lei, X.G. (1999), "Expression of an *Aspergillus niger* Phytase Gene (phyA) in *Saccharomyces cerevisiae*". *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1915-1918.
- Haros, M., Rosell, C. M. ve Benedito, C. (2001a), "Fungal Phytase as a Potential Breadmaking Additive", *Eur Food Technol.* 213,317-322.
- Haros, M., Rosell, C. M. ve Benedito, C. (2001b), "Use of fungal phytase to improve breadmaking performance of whole wheat bread", *J Agric Food Chem.*,49(11), 5450-4.
- Hasenekoğlu, İ. (1991), *Toprak Küfleri- 7 cilt.* Atatürk Üniv. Yayınları No:689. K. K. Eğ. Fak. Yayınları No:11 Erzurum.
- Hashimoto, H., Iwaasa, T. ve Yokotsuka, T. (1972), "Thermostable Acid Protease Produced by *Penicillium duponti* K 1014, a True Thermophilic Fungus Newly Isolated from the Compost", *Applied Microbiology*. 24, 986- 992.
- Hassouni., H., Alaoui, M.I., Perraud, I.G., Augur, C. ve Roussos, S. (2006), "Effect of Culture Media and Fermentation Parameters on Phytase Production by the Thermophilic Fungus *Myceliophthora Thermophila* in Solid State Fermentation", *Micoologia Applicada Internacional*. 18, 29-36.
- Hidvegi, M. ve Lasztity R. (2002), "Phytic Acid Content of Cereals and Legumes and Interaction With Proteins", *Periodica Polytechnica Ser. Chem. Eng.* 46, 59-64.
- Hirimuthugoda, N.Y., Chi, Z., Li, X., Wang, L. ve Wu, L. (2006), "Diversity of phytase-producing marine yeasts", *Ciencias Marinas*, 32, 673–682.
- Holker, U., Hofer, M. ve Lenz, J. (2004), "Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 175-186.
- Hong, S.B., Go, S.J., Shin, H.D., Frisvad, J.C. ve Samson, R.A. (2005), "Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species", *Mycologia*. 97(6), 1316-1329.
- Houbraeken, J., Varga, J., Rico-Munoz, E., Johnson, S. ve Samson, R.A. (2008), "Sexual Reproduction as the Cause of Heat Resistance in Food Spoilage

- Fungus *Byssosclamyces spectabilis* (Anamorph *Paecilomyces variotii*)”, *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5), 1613-1619.
- İfrij, İ.H. ve Ögel, Z.B. (2002), “Production of neutral and alkaline extracellular proteases by the thermophilic fungus, *Scytalidium thermophilum*, grown on microcrystalline cellulose”, *Biotechnology Letters*. 24, 1107-1110.
- İkiz, F., Püskülcü, H. ve Eren, Ş. (2000), *İstatistiğe Giriş*. Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, 6. baskı, İzmir, Türkiye.
- Janso, J.E. , Bernan, V.S., Greenstein, M., Bungi, T.S. ve Ireland, C.M. (2005), “*Penicillium dravuni*, A New Marine-Derived Species from an Alga in Fiji”, *Mycologia*. 97(2), 444-453.
- Javed, M.M., Ahmed, W., Zahoor, S. ve Ikram-ul-haq (2010), “Solid State Culturing of Thermophilic Fungi for Phytase Production”, *Pak. J. Bot.*, 42(5), 3605-3611.
- JOHN, F.K. (1987), *Enzyme Technology* (H.J. REHM., G. REED editör). *Biotechnology*, 7A: 37-62.
- Kaşık, G. (2010), *Mantar Bilimi*, S.Ü. yayınları, Konya.
- Kılıçoğlu, M.Ç. ve Özkoç, İ. (2008), “Fungal sistematikteki moleküler gelişmeler”, *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 23, 65-72.
- Kim, H.W., Kim, Y.O., Lee, J.H., Kim, K.K. ve Kim, Y.J. (2003), “Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*”, *Biotechnol. Lett.*, 25, 1231-1234.
- Klich, M.A. (2002), *Identification of Common Aspergillus Species*. Ponsen and Looijen. Wageningen. The Netherlands.
- Konietzny, U. ve Greiner, R. (2002), “Molecular and Catalytic Properties of Phytate Degrading Enzymes (Phytases)”, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 37, 791-812.
- Kornegay, E.T. (2001), *Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity*, *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. Eds., Bedford, M.R., Partridge, G.G., CAB International Publishing, UK. pp: 237-272.

- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S. ve Becker, K. (2010), “Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition”, *Food Chemistry* 120, 945–959.
- Kvist, S., Carlsson, T., Lawther, J.M. ve Decastro, F.B. (2005), *Process for the Fractionation of Cereal Brans*, Patent Application Publication. US 2005/0089602 A1.
- Lan, G.Q., Abdullah, N., Jalaludin, S. ve Ho, Y.W. (2002), “Culture conditions influencing phytase production of *Mitsuokella jalaludinii*, a new bacterial species from the rumen of cattle”, *J. Appl. Microbiol.*, 93, 668-674.
- Lassen, S.F., Breinholt, J., Ostergaard, P.R., Brugger, R., Bischoff, A., Wyss, M. ve Fuglsang, C.C. (2001), “Expression, Gene Cloning, and Characterization of Five Novel Phytase from Four Basidiomycete Fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4701-4707.
- Lazic, Z.R. (2004), *Design of Experiments in Chemical Engineering*, Wiley-VCH, Weinheim, ISBN: 3-527-31142-4, 157-162.
- Lei, X., Blake, J.P., Forsberg, C.W., Fox, D.G., Grabau, E., Mroz, Z., Sutton, A.L., Walker, W.R., Webb, K., Matthews, J.C., Shears, S.B., Veum, T. ve Bell, A.W., (2006), *Animal Agriculture's Future Through Biotechnology*, Part 4. CAST Council For Agricultural Science and Technology. Issue paper no: 33.
- Lei, X.G. ve J.M. Porres. (2003), “Phytase enzymology, applications, and biotechnology”, *Biotechnology Letters*, 25, 1787-1794.
- Lindman, H.R. (1974), *Analysis of variance in complex experimental designs*. San Francisco: W. H. Freeman & Co.
- Liu, B., Rafiq, A., Tzeng, Y. ve Rob A. (1998), “The Induction and characterization of phytase and beyond”, *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 415-424.
- Lorenzo M., Moldes, D., Rodriguez Couto, S. ve Sanroman, A. (2002), “Improvement in laccase production by employing different

- lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*”, *Bioresour. Technol.* 82, 109-113.
- Lyons G.A., McKay, G.J. ve Sharmal, H.S.S. (2000), “Molecular comparison of *Scytalidium thermophilum* isolates using RAPD and ITS nucleotide sequence analyses”, *Mycol. Res.* 104 (12), 1431-1438.
- Madigan, M.T. ve Martinko, J.M. (2010), *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi* (onbirinci baskıdan çeviri), Palme yayıncılık, Ankara.
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G. ve Bhat, M.K. (2000), “Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64 (3), 461-488.
- Manary, M.J., Krebs, N.F., Gibson, R.S., Broadhead, R.L. ve Hambridge, K.M. (2002), “Community-based dietary phytate reduction and its effect on iron status in Malawian children”, *Ann. Trop. Paediatr.* 22,133–136.
- Marlida, Y., Delfita, R., Gusmanizar, N. ve Ciptaan, G. (2010), “Identification Characterization and Production of Phytase from Endophytic Fungi”, *World Academy of Science, Engineering and Technology.* 41, 1043-1046.
- Martin, K.J. ve Rygiewicz, P.T. (2005), “Fungal specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of enviromental DNA extracts”, *BMC Microbiology.* 5(28), 1-11.
- Midilli, M., Muğlalı, H., Alp, M., Kocabağlı, N., Tanör, M.A. ve Toklu, G.S. (2003), “Yeme katılan fitaz enziminin broylerde besi performansı ve mineral dengesi üzerine etkisi”, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 27, 751-759.
- Mitchell, D.B., Vogel, K., Weimann, B., Pasamontes, L., P.G.M. A. ve Loon, V. (1997), “The Phytase Subfamily of Histidine Acid Phosphatases: İsolation of Genes for Two Novel Phytases From the Fungi *Aspergillus Terreus* and *Myceliophthora Thermophila*”, *Microbiology.* 143, 245-252.
- Mittal, A., Singh, G., Goyal, V., Yadav, A. ve Aggarwal, N.K. (2011), “Optimization of Medium Components for Phytase Production on Orange Peel Flour by *Klebsiella* sp. db3 Using Response Surface Methodology”, *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 9, 35-44.

- Montgomery, D.C. (2001), *Design and Analysis of Experiments*, Fifth Edition, John Wiley and Song Inc, 684p.
- Morgenstern, I., Powlowski, J., Ishmael, N., Darmond, C., Marqueteau, S., Moisan, M., Quenneville, G. ve Tsang, A. (2012), “A molecular phylogeny of thermophilic fungi”, *Fungal Biology*. 116, 489-502.
- Mouchacca J. (1997), “Thermophilic fungi: biodiversity and taxonomic status”, *Cryptogamie, Mycol.* 18(1), 19-69.
- Mouchacca J. (2000), “Thermotolerant fungi erroneously reported iapplied research work as possessing thermophilic attributes”, *World J Microbiol Biotechnol*, 16, 869–880.
- Mouchacca, J. (2007), “Heat tolerant fungi and applied research: Addition to the previously treated group of strictly thermotolerant species”, *World J Microbiol Biotechnol*, 23,1755-1770.
- Murado, M.A., Gonzalez, M.P., Torrado, A. ve Pastrana, L.M. (1996), “Amylase production by solid state culture of *Aspergillus oryzae* on polyurethane foams, Some mechanistic approaches from an empirical model”, *Proc. Biochem.* 32, 35-42.
- Myers R.H., Montgomery D.C., Vining G.G., Borror C.M. ve Kowalski S.M. (2004), “Response Surface Methodology: A Retrospective and Literature Survey”, *J Quality Tech*, 36, 53-77.
- Nahm., K.H. (2002), “Efficient Feed Nutrient Utilization to Reduce Pollutants in Poultry and Swine Manure”, *Critical Rewiews in Environmental Science and Technology*. 32 (1),1-16.
- Nayını, N.R. ve Markakis, P. (1984), “The phytase of yeast”, *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 17, 24–26.
- Neves M.L.C., Silva M.F., Souza-Motta C.M, Spier M.R, Soccol C.R, Porto T.S., Moreira K.A. ve Porto A.L.F. (2011), “*Lichtheimia blakesleeana* as a New Potencial Producer of Phytase and Xylanase”, *Molecules*. 16. 4807-4817.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M. ve Antranikian, G. (1999), “Extremophiles As a Source of Novel Enzymes For Indusrtial Application”, *Appl Microbiol Biotechnol*. 51, 711-729.

- Nigam, P. ve Singh, D. (1996), "Processing of agricultural wastes in solid-state fermentation for microbial protein production", *J. Sci. Ind. Res.* 55, 373-380.
- Ögel, Z.B., Yarangümeli, K., Dünder, H. ve Ifrij, İ. (2001), "Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on Complex Linnocellulosic Biomass for Endoglucanase Production", *Enzyme and Microbial Technology*. 28, 689- 695.
- Ögel, Z.B., Yüzügülü, Y., Mete, S., Bakır, U., Kaptan, Y., Sutay, D. ve Demir, A.S. (2006), "Producing, Properties and Application to Biocatalysis of a Novel Extracellular Alkaline Phenol Oxidase from the Thermophilic Fungus *Scytalidium thermophilum*". *Appl. Microbiol Biotechnol.* 71, 853-862.
- Ohata T., Nakamura Y., Katayama T. ve Nakamachi E. (2003), "Development of optimum process design system for sheet fabrication using response surface method", *Journal of Materials Processing Technology*. 143-144, 667-672.
- Özatay, Ş. (2001), *Fitaz enzimi üretimi ve optimizasyonu*, Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü. İzmir.
- Pan W.Z., Huang X.W., Wei K.B., Zhang C.M., Yang D.M., Ding J.M.ve Zhang K.Q. (2010), "Diversity of thermophilic fungi in Tengchong Rehai National Park revealed by ITS nucleotide sequence analyses", *The Journal of Microbiology*, 48, 146-152.
- Pandey, A. (19929, "Recent process developments in solid-state fermentation", *Process Biochemistry*, 27, 109-117.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R. ve Nigam, P. (1999), "Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes", *Curr. Sci.* 77 (1),149-162.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Leo, J.A.R. ve Nigam, P. (2001), *Solid-state Fermentation in Biotechnology*, Asiatech Publishers, Inc., New Delhi.

- Pandey, A., Soccol, C.R. ve Mitchell, D.A. (2000), "New developments in solid-state fermentation. I. Bioprocesses and products", *Process Biochem.* 35 (10), 1153-1169.
- Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A. ve Soccol, V.T. (2001), "Production, Purification and Properties of Microbial phytases", *Bioresource Technol.*, 7, 203-214.
- Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M. ve Loon, A.P.G.V. (1997), "Gene Cloning, Purification, and Characterization of a Heat-Stable Phytase from the Fungus *Aspergillus Fumigatus*", *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1696-1700.
- Pastrana, L.M., Gonzalez, M.P., Pintado, J. ve Murado, M.A. (1995), "Interactions affecting gibberellic acid production in solid-state culture: a factorial study", *Enzyme Microb. Technol.* 17, 784-790.
- Pekşen, E., ve Artık, C. (2005), "Antibesinsel maddeler ve yemeklik tane baklagillerin besleyici değerleri", *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20 (2), 110-120.
- Pitt J.I. (2000), *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species*, Food Science Australia.
- Polaina, J. ve Maccabe, A.P. (2007), *Industrial Enzymes Structure, Function and Applications*. Springer. 641, 505-529.
- Quan, C., Zhang, L., Wang, Y. ve Ohta, Y. (2001), "Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(2), 154-160.
- Quan, C.S., Tian, W.J., Fan, S.D. ve Kikuchi, Y. (2004), "Purification and Properties of a low-molecular weight phytase from *Cladosporium sp.* FP-1", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, 260-266.
- Rajasekaran, A. K. ve Maheshwari, R., (1993), "Thermophilic Fungi: An Assesment of their Potential for Growth in Soil", *J. Biosci.* 18, 345-354.
- Raper K.B. ve Fennell, D.I. (1965), *The Genus Aspergillus*, The Williams Wilkins Company. Baltimore. USA.

- Raper K.B. ve Thom, C. (1949), *A Manuel of Penicillia*. The Williams Wilkins Company. Baltimore. USA.
- Redman S., Litvintseva, A., Sheehan, K.B., Henson, J.M. ve Rodriguez, R.J. (1999), “Fungi from Geothermal Soils in Yellowstone National Park”, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (12), 5193-5197.
- Revy, P.S., Jondreville, C., Dourmad, J.Y. ve Nys, Y. (2006), “Assesment of Dietary Zinc Requirement of Weaned Piglets Fed Diets With or Without Microbial Phytase”, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 90, 50-59.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. ve Nigam, P. (2001), “Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative”, *Bioresour. Technol.* 77, 247-255.
- Rodriguez Couto S., Rivela, I. ve Sanroman, A. (2000), “Ektracelluler ligninolytic enzymen production by *Phanerochaete chrysosporium* in a new solid state bioreactor”, *Biotechnology letters* 22, 1443-1147.
- Rodriguez, E., Mullaney, E. ve Lei, X.G. (2000a), “Expression of the *Aspergillus fumigatus* gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme”, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 268, 373-378.
- Sambrook, J. ve Russel, D.W. (2001), *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Samson, R.A., Houbraeken,J., Thrane,U., Frisvad,J.C. ve Andersen, B. (2010), *Food and Indoor Fungi*, CBS KNAW Fungal Diversity Centre, Utrecht, The Nedherlands.
- Samson, R.A., Yilmaz, N., Houbraeken,J., Spierenburg, H., Seifert, K.A., Peterson, S.W., Varga, J. ve Frisvad, J.C. (2011), “Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*”, *Studies in mycology.* 70, 159-184.
- Sandberg, A., Hulthen, L.R. ve Türk, M. (1995), “Dietary *Aspergillus niger* Phytase Increases Iron Absorption in Humans”, *American Institute of Nutrition*, 96, 22-3166.

- Sariyska, M.V., Gargova, S.A., Koleva, A.L. ve Angelov, A.I. (2005), "Aspergillus Niger Phytase: Purification and Characterization", *Biotechnol.&Biotechnol.Eq.* 19, 98-105.
- Satiou, N. ve Nei, M. (1987), "The Neighbor-joining Method: A new Method for reconstructing phylogenetic trees", *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Scopes, R.K. (1994), *Protein Purification-Principles and Practice*, 3rd Edition, Springer-Verlag, New York.
- Segueilha, L., Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G., ve Galzy, P. (1992), "Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74, 7-11.
- Sharma, M., Chadha, B.S., Kaur, M., Ghatora S.K. ve Saini, H.S. (2008), "Molecular Characterization of Multiple Xylanase Producing Thermophilic/Thermotolerant Fungi Isolated from Composting Materials", *The Society for Applied Microbiology*, 46, 526-535.
- Shieh, T.R. ve Ware, J.H. (1968), "Survey of Microorganisms for the Production of Extracellular Phytase", *Applied Microbiology*. 16,1348-1351.
- Shuler, M.L. ve Kargi, F. (2002), *Bioprocess Engineering*. 2nd ed. Prentice Hall PTR. USA.
- Sime Ad A. (2002), "Mounting medium for use in Indoor Air Quality spore-trap analyses", *Mycologia*. 94, 1087-1088.
- Simell, M., Trunen, M., Piironen, J. ve Vara, T. (1989), *Feed and food applications of phytase*, Lecture at 3rd Meet. Industrial Applications of Enzymes, Barcelona, Spain.
- Simon, O. ve Igbasan, F. (2002), "In vitro Properties of Phytases from Various Microbial Origins", *International Journal of Food Science and Tecnology*. 37, 813-822.
- Singh, B. ve Satyanarayana, T. (2010), "Applications of Phytase of Thermophilic Mould, *Sporotrichum thermophile*: A Review", *Journal of Scientific and Industrial Research*. 69, 411-414.

- Singh, B. ve Satyanarayana, T. (2006), “A Marked Enhancement in Phytase Production by a Thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* using statistical designs in a cost-effective cane molasses medium”, *Journal of Applied Microbiology*, 101, 344-352.
- Singh, B. ve Satyanarayana, T. (2009), “Characterization of a HAP-phytase from a Thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*”, *Bioresource Tecnology*. 100, 2046-2051.
- Siren, M. (1986), *New myo-inositol triphosphoric acid isomer*. Pat. SW 052950.
- Siren, M. (1995), *Method of treating pain using inositol triphosphate*. U.S. Patent 5407924.
- Siren, M. (1998), *Use of an ester of inositoltriphosphate for the preparing of medicaments*. U.S. Patent 5846957.
- Straatsma, G., Samson, R.A., Olijnsma T.W., Camp, H.J.M.O.D., Gerrits, J.P.G. ve Griensven, L.J.L.D.V. (1994), “Ecology of Thermophilic Fungi in Mushroom Compost, with Emphasis on *Scytalidium thermophilum* and Growth Stimulation of *Agaricus bisporus* Mycelium”, *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 454-458.
- Subramaniam, R. ve Vimala, R. (2012), “Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study”, *I.J.S.N.*, 3(3), 480-486.
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Karabez, İ., Bursalıoğlu, M. ve Oğultekin, R. (1984), *Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu*, Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji AB.D. E.Ü. Teksirler serisi No: 55, Bornova.
- Tamura, K. ve Nei, M. (1993), “Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees”, *Molecular Biology and Evolution*. 10, 512-526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. ve Kumar, S. (2011), “MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods”, *Molecular Biology and Evolution*. 28, 2731-2739.

- Tansey, M.R. (1974), "Isolation of Thermophilic Fungi From Snuff", *Applied Microbiology*. 29, 128-129.
- Telefoncu, A. (1986), *İmmobilize Enzimler ve İmmobilizasyon Yöntemleri*, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu, İzmir.
- Temizkan, G. ve Arda, N. (2004), *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM), Yayın No:2, Nobel Tıp Kitabevleri.
- Tomschy, A., Tessier, M., Wyss, M., Brugger, R., Broger, C., Schnoebelen L, P.G.M.,A., Loon, V. ve Pasamontes, L. (2000), *Protein Science*, Cambridge University Pres.
- Tsumura, K., Saito, T. ve Kugimiya, W. (2004), "Influence of Phytase Treatment on the Gelation Property of Soymilk", *Food Science Technol.Res.*10 (4), 442-446.
- Turan, M.D. ve Altundoğan, H.S. (2011), "Hidrometalurjik Araştırmalarda Yanıt Yüzey Yöntemlerinin (YYY) Kullanımı", *Madencilik*, 50(3), 11-23.
- Turner, P., Mamo, G. ve Karlsson, E.N. (2007), "Potential and Utilization of Thermophiles and Thermostable enzymes in Biorefining", *Microbial Cell Factories*. 6 (9), 1-23.
- Van Burik J.A, Schreckhise R.W., White T.C., Bowden R.A. ve Myerson D. (1998), "Comparison of six extraction techniques for DNA from filamentous fungi", *Med Mycol*. 36(5), 299-303.
- Vats, P. ve Banerjee, U.C. (2004), "Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview", *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 3–14.
- Vats, P. ve Banarjee, U.C. (2006), "Catalytic characterization of phtase (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolase) from *Aspergillus niger* van Teigem: Glycosylation pattern, kinetics and molecular properties", *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 596-600.
- Vats, P., Bhushan, B. ve Banerjee, U.C. (2009), "Studies on the Dephosphorylation of Phytic Acid in Livestock Fed Using Phytase from *Aspegillus niger* van Teigem", *Bioresource Technology*. 100, 287-291.

- Vohra A. ve Satyanarayana T. (2002b), “Statistical optimization of the media components by response surface methodology to enhance phytase production by *Pichia anomala*”, *Process Biochemistry*. 37, 999-1004.
- Vohra, A. ve Satyanarayana, T. (2001), “Phytase production by the yeast *Pichia anomala*”, *Biotechnology Letter*, 238, 551–554.
- Vohra, A. ve Satyanarayana, T. (2002), “Purification and characterisation of a thermostable and acid-stable phytase from *Pichia anomala*”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 687–691.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. ve Taylor, J. (1990), *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, (Ed. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J.), Academic Press, USA.
- Wiseman, A. (1987), *Handbook of Enzymes Biotechnology*, Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry.
- Wodzinski, R.J. ve Ullah, A.H.J. (1996), “Phytase”, *Advances in Applied Microbiology*, 42, 263–303.
- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Remy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehmann, M. ve Loon, A.P.G.M.V. (1999), “Biochemical Characterization of Fungal Phytase (myo-inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases): Catalytic Properties”, *Applied and Environmental Microbiology*. 65(2), 367-373.
- Wyss, M., Pasamontes, L., Freidlein, A., Remy, R., Tessier, M., Kronenberger, A., Middendorf, A., Lehmann, M., Schonoebelen, L., Röthlisberger, U., Kuszniir, E., Wahl, G., Müller, F., Lahm, H., Vogel, K. ve Loon, A.P.G.M.V. (1998a), “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.
- Wyss, M., Pasamontes, L., Remy, R., Kohler, J., Kuszniir, E., Gadiant, M., Müller, F. ve Loon, A.P.G.M.V. (1998b), “Comparasion of the Thermostability Properties of Three Acid Phosphatates from Molds: *Aspergillus fumigatus*

Phytase, A.niger Phytase, and A.niger Ph 2.5 Acid Phosphatase”, *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 4446-4451.

Yanke, L.J., Bae, H.D., Selinger, L.B. ve Cheng, K.J. (1998), “Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria”, *Microbiol.*, 144, 1565-1573.

Yarita K., Sano, A., Murata, Y., Takayama, A., Takahashi, Y., Takahashi, Y., Ohori, Y., Kamei, K., Miyaji, M. ve Nishimura, K. (2007), “Pathogenicity of *Ochroconis gallopava* isolated from hot springs in Japan and a review of published reports”, *Mycopathologica*. 167, 135-147.

Yavuz, A.G. (2005), *Polivinil Ferrosen Modifiye Elektrodunu Temel Alan Glukoz Biyosensörünün Geliştirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Niğde.

Zeikus, J.G. (1979), “Enzyme”, *Microb. Technol.* 1, 243-254.

Zhao, D.M., Wang, M., Mu, X.J., Sun, M.L. ve PWang, X.Y. (2007), “Screening, Cloning and Overexpression of *Aspergillus niger* Phytase (phyA) in *Pichia pastoris* with Favourable”, *The Society for Applied Microbiology*. 45, 522-528.

www.genome.fungalgenomics.ca

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.indexfungorum.org/>

www.biolog.com