

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN  
*Bacillus megaterium* EBD 9-1  
SUŞUNDAN FİTAZ GENİNİN *E.coli*'de  
KLONLANMA ÇALIŞMALARI**

**Behice ZEREN**



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN *Bacillus megaterium* EBD 9-1 SUŞUNDAN FİTAZ GENİNİN  
*E.coli*'de KLONLANMA ÇALIŞMALARI**

**Behice ZEREN**

**Prof. Dr. Elif DEMİRKAN**

**( Danışman )**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BURSA - 2015**


## TEZ ONAYI

Behice ZEREN tarafından hazırlanan “ Toprakтан izole edilen *Bacillus megaterium* EBD 9-1 suşundan fitaz geninin *E.coli*'de klonlanma çalışmaları ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman :** Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

.....  


**Başkan :** Prof. Dr. Elif DEMİRKAN  
Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

.....  


**Üye :** Doç. Dr. Ferda ARI  
Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

.....  


**Üye :** Yar. Doç. Dr. Figen ERSOY  
Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

.....  


**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Ali Osman DEMİR**  
**Enstitü Müdürü**

... /... /.....

**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

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

07/01/2015

Behice ZEREN

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN *Bacillus megaterium* EBD 9-1 SUŞUNDAN FİTAZ GENİNİN *E. coli*'de KLONLANMA ÇALIŞMALARI

**Behice ZEREN**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Bu çalışmada Türkiye'nin 30 farklı ilinden temin edilen toprak örneklerinden 300 adet bakteri izole edilmiştir. Bakterilerin morfolojik ve fizyolojik özellikleri incelenmiş ve 236 bakteri *Bacillus* cinsi olarak tanımlanmıştır. Bütün suşların fitaz aktiviteleri fitaz tarama ortamı (PSM) kullanılarak tespit edilmiş ve açık zonların çapı mm olarak gösterilmiştir. Toplam 19 *Bacillus* sp. suşu, fitat parçalayıcı bir enzim olarak bilinen ekstraselüler fitaz üreticisi olarak bulunmuştur. Bu suşlar arasında, en geniş zona (11 mm) sahip 1 adet *Bacillus* sp. suşu seçilmiş ve *Bacillus* sp. EBD 9-1 olarak adlandırılmıştır. 16S rRNA dizi analizi sonucunda *Bacillus* sp. EBD 9-1 suşunun *Bacillus megaterium* ile %100 benzerlik gösterdiği tespit edilmiş ve yeni izolat *Bacillus megaterium* EBD 9-1 olarak adlandırılmıştır. *Bacillus megaterium* EBD 9-1 suşunun fitaz enzim geni *E. coli* DH5α suşunda klonlanmaya çalışılmıştır. *Bacillus megaterium* DSM319, *Bacillus megaterium* QM B1551 ve *Bacillus megaterium* WSH-002 suşlarının bütün genom sekansı NCBI veri bankasında mevcuttur. Ancak, bu sekansların içinde fitaza ait bir sekans bulunamamıştır. Bu sebeple, farklı *Bacillus* türlerinin fitaz sekansları hizalanmış ve bir çifti dejenere olmak üzere 2 primer çifti hazırlanmıştır. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) sonucunda, sadece dejenere primer çiftleri kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiş ve üç bant (~900 bp, ~500 bp) görülmüştür. Çoğaltılan bu DNA fragmanları pGEM®-T Easy vektörüne ligasyon ile aktarılmıştır. Rekombinant plazmitlerin *E. coli* DH5α suşuna transformasyonu sağlanmış ve rekombinant plazmidleri içeren saf *E. coli* DH5α suşunun plazmidleri izole edilmiştir. Klonlanmanın kontrolü için, rekombinant plazmid *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmiş ve beklenen boydaki bantlar agaroz jel profilinde gözlenmiştir. İzole edilen plazmidler T7 primeri ve ABI PRISM-310 Genetic Analyzer cihazı kullanılarak sekanslanmıştır. NCBI data bankası kullanılarak saptanan sekansın literatür analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 3 DNA fragmanının nükleotit dizisinin fitaz enzimi sekansı ile benzerlik göstermediği belirlenmiştir. Dolayısıyla dejenere primerler ile amplifikasyon sonucunda fitaz geni çoğaltılamamıştır. Ancak, bu yeni izolat literatür için önemlidir.

Yeni izole edilen bu *Bacillus megaterium* EBD 9-1 suşu endüstriyel ölçekte fitaz üretimi büyük bir potansiyele sahip olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus*, izolasyon, fitaz, klonlama

**2015, xiv + 113 sayfa.**

## ABSTRACT

MSc Thesis

### CLONING STUDIES IN *E. coli* OF PHYTASE GENE FROM *Bacillus megaterium* EBD 9-1 STRAIN ISOLATED FROM SOIL

**Behice ZEREN**

Uludağ University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

**Supervisor:** Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

In this study, 300 bacteria were isolated from soil samples that provided from 30 different cities of Turkey. Morphological and physiological features of bacteria were investigated, and 236 bacteria were defined as *Bacillus* genus. The phytase activities of all strains were assayed using phytase screening medium (PSM), and exhibited as diameter of clear zone in mm. Total 19 *Bacillus* sp. strains were found as extracellular phytase, known as phytate-degrading enzyme, producer. Among of these strains, one strain of *Bacillus* sp. that had the most largest zones (11 mm) was selected, and was named as *Bacillus* sp. EBD 9-1. 16S rRNA sequence analysis revealed that *Bacillus* sp. EBD 9-1 was found to be 100% similar with *Bacillus megaterium*, and new isolate was named as *Bacillus megaterium* EBD 9-1. Phytase gene of *Bacillus megaterium* EBD 9-1 strain was tried to be cloned into the *E. coli* DH5 $\alpha$  strain. The whole genome sequence of *Bacillus megaterium* DSM319, *Bacillus megaterium* QM B1551 and *Bacillus megaterium* WSH-002 strains are available at NCBI data bank. However, was not found any sequence of the phytase in these sequences. Therefore, phytase sequences of different *Bacillus* species were aligned, and two primer pair with one degenerate was prepared. In PCR (Polymerase Chain Reaction) result, it was realized amplification just using the degenerate primer pairs, and three bands (~900 bp, ~500 bp) were observed. The amplified DNA fragments were transferred into pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector by ligation. Recombinant plasmids were transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$  strain, and plasmids of pure *E. coli* DH5 $\alpha$  strains containing the recombinant plasmid was isolated. For control of cloning, the recombinant plasmid was cut with *EcoRI* restriction endonuclease enzyme, and bands of the expected size were observed in the agarose gel profile. The isolated plasmids were sequenced using T7 primer and the ABI PRISM-310 Genetic Analyzer apparatus. Literature analysis of the sequence determined using the NCBI data bank has been made. According to the results, the nucleotide sequence of all three DNA fragments was determined not show sequence similarity with phytase enzyme. So with, phytase gene as a result of amplification with degenerate primers was not amplified. However, these new isolate is important for literature.

This newly isolated *Bacillus megaterium* sp. EBD 9-1 strain may be great potential for phytase production at industrial scale.

**Key Words:** *Bacillus*, isolation, phytase, cloning

**2015, xiv + 113 pages.**

## TEŞEKKÜR

Beni yüksek lisans eğitimine teŐvik eden, yüksek lisans eğitimim suresince bana her konuda destek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Elif DEMİRKAN'a teşekkür ederim.

ÇalıŐmamın deney ve yazım aŐamasının tamamına büyük bir özveri ile katkılarını sunan, benden tercübe ve bilgi birikimini esirgemeyen Sayın Yar. Doç. Dr. Figen ERSOY'a teşekkür ederim.

ÇalıŐmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm Sayın Yar. Doç. Dr. Elif UZ'a ve tez çalıŐmamın yürütülmesinde HDP(F)–2013/29 numaralı proje ile araŐtırmamızı destekleyen Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Bir çok konuda olduğu gibi bu konuda da yardımlarını esirgemeyen Spyros GKİOLMAS'a teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Son olarak da hep yanımda olmalarını istediğim, bana her konuda koŐsulsuz destek olan kardeŐim Őiir'e, anneme, babama ve dayıma minnettar olduğumu belirtmek isterim.

Behice ZEREN  
07/01/2015

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	7
2.2. Fitaz Enzimi (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase).....	14
2.3. Fitaz enziminin özellikleri.....	16
2.4. Fitaz enziminin sınıflandırılması.....	19
2.4.1. Fitaz enziminin optimum pH'ya göre sınıflandırılması.....	19
2.4.2. Fitaz enziminin katalitik merkeze göre sınıflandırılması.....	19
2.4.2.1. Histidin asit fosfotaz (HAP).....	20
2.4.2.2. $\beta$ -Propeller fitazı ( $\beta$ - BPPhy).....	20
2.4.2.3. Sistidin fosfataz (CP).....	21
2.4.2.4. Mor asit fosfataz (Purple asit fosfataz, PAP).....	21
2.4.3. Fitaz enziminin stereospesifikliğine göre sınıflandırılması.....	21
2.5. Fitaz enzimi kaynakları.....	23
2.5.1. Mikrobiyal fitazlar.....	23
2.5.2. Bitkisel fitazlar.....	27
2.5.3. Hayvansal fitazlar.....	28
2.5.3.1. Sindirim kanalı mikroflorası tarafından sentezlenen fitazlar.....	28
2.5.3.2. İntestinal fitazlar .....	29
2.6. Fitazların kullanım alanları.....	29
2.6.1. Yem katkı maddesi olarak kullanım.....	29
2.6.2. Gıda Sanayi.....	31
2.6.3. Kağıt endüstrisi.....	32
2.6.4. Biyoteknolojik uygulamalar ve ilaç sanayi.....	32
2.7. <i>Bacillus</i> cinsi.....	33
2.8. Klonlama.....	36



3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	41
3.1. Materyal.....	41
3.2. Yöntem.....	41
3.2.1. Fitaz pozitif bakterilerin kalitatif tayini.....	41
3.2.2. <i>Bacillus</i> 'un taksonomik sınıflandırması için morfolojik ve fizyolojik özelliklerin belirlenmesi.....	43
3.2.2.1. Hareketlilik Testi.....	44
3.2.2.2. Katalaz testi.....	44
3.2.2.3. Gram boyama.....	44
3.2.2.4. Spor boyama.....	45
3.2.2.5. 16S rRNA Analizi.....	45
3.2.3. Bakteri kültürünün saklanması için kullanılan besiyerleri.....	45
3.2.4. Fitaz enzim geninin <i>Bacillus</i> sp. suşundan izolasyonu ve kontrolü.....	46
3.2.4.1. <i>Bacillus</i> sp. suşundan genomik DNA'nın izolasyonu.....	46
3.2.4.2. İzole edilen kromozomal DNA'nın konsantrasyonu ve saflık derecesinin spektrofotometrik ölçümler ile tespiti.....	47
3.2.4.3. Kromozomal DNA'nın agaroz jel elektroforezi ile kontrolü.....	48
3.2.5. Fitaz enzim geninin PZR ile çoğaltılması.....	49
3.2.5.1. Fitaz enzim geninin PZR ile çoğaltılması için kullanılan primerler.....	49
3.2.5.2. Fitaz geninin PZR reaksiyonu ile çoğaltılması için kullanılan programlar ve koşullar.....	50
3.2.5.3. PZR ürününün agaroz jel elektroforezi ile kontrolü.....	51
3.2.5.4. PZR ürününün agaroz jelden elde edilmesi.....	52
3.2.5.5. Agaroz jelden izole edilen PZR ürününün konsantrasyonu ve saflık derecesinin spektrofotometrik yöntemler ile tespiti.....	53
3.2.6. Fitaz enzim geninin <i>E. coli</i> 'de klonlanması.....	53
3.2.6.1. pGEM®-T Easy vektörüne PZR ürününün klonlanması.....	53
3.2.6.2. Konukçu <i>E. coli</i> 'nin alıcı hücre haline getirilmesi.....	54
3.2.6.3. Rekombinant plazmitin kompetan hücrelere transformasyonu.....	56
3.2.6.4. Transformasyonun gerçekleştiği hücrelerin belirlenmesi.....	57
3.2.6.5. Transformasyonun gerçekleştiği kolonilerin seçimi ve deney tüplerine ekim.....	58

3.2.6.6. Transformasyonu gerçekleşen hücrelerden plazmid izolasyonu.....	59
3.2.6.7. İzole edilen rekombinant plazmidlerin görüntülenmesi.....	60
3.2.7. Sekanslama.....	61
4. BULGULAR.....	62
4.1. Fitaz pozitif bakterilerin kalitatif tayini.....	62
4.2. <i>Bacillus</i> 'un taksonomik sınıflandırması için morfolojik ve fizyolojik özelliklerin belirlenmesi.....	63
4.2.1. Koloni ve hücre morfolojisi.....	64
4.2.2. Hareketlilik testi.....	65
4.2.3. Katalaz testi.....	65
4.2.4. Gram boyama.....	66
4.2.5. Spor boyama.....	66
4.3. 16S rRNA Analizi.....	67
4.4. Fitaz enzim genin izolasyonu ve kontrolü.....	69
4.4.1. <i>Bacillus megaterium</i> EBD 9-1 suşundan genomik DNA'nın izolasyonu.....	69
4.4.2. İzole edilen genomik DNA'nın konsantrasyonu ve saflık derecesinin spektrofotometrik ölçümler ile tespiti.....	69
4.4.3. Kromozomal DNA'nın agaroz jel elektroforezi ile kontrolü.....	70
4.5. Fitaz geninin PZR reaksiyonu ile çoğaltılması.....	70
4.5.1. PZR ürününün agaroz jelden elde edilmesi.....	73
4.5.2. Agaroz jelden izole edilen PZR ürünün konsantrasyonu ve saflık derecesinin spektrofotometrik yöntemler ile tespiti.....	74
4.6. Fitaz enzimi geninin <i>E. coli</i> 'de klonlanması.....	74
4.6.1. pGEM®-T Easy vektörüne PZR ürünün klonlanması.....	74
4.6.2. Konukçu <i>E. coli</i> 'nin alıcı hücre haline getirilmesi.....	75
4.6.3. Rekombinant plazmitin kompetant hücrelere transformasyonu.....	75
4.6.4. Transformasyonun gerçekleştiği hücrelerin belirlenmesi.....	75
4.6.5. Transformasyonun gerçekleştiği kolonilerin seçimi ve deney tüplerine ekim.....	76
4.6.6. Transformasyonu gerçekleşen hücrelerden plazmid izolasyonu.....	76
4.6.7. İzole edilen rekombinant plazmidlerin görüntülenmesi.....	78

4.7.Sekanslama.....	79
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	87
KAYNAKLAR.....	91
ÖZGEÇMİŞ.....	113

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde Orantı
>	Büyük
<	Küçük
~	Yaklaşık
>>>	Yönünde
°C	Santigrat Derece
Ca <sup>2+</sup>	Kalsiyum İyonu
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Kalsiyum Klorür Dihidrat
CH <sub>4</sub>	Metan
cm	Santimetre
Co <sup>2+</sup>	Kobalt İyonu
Cu <sup>2+</sup>	Bakır İyonu
Fe <sup>2+</sup> / Fe <sup>3+</sup>	Demir İyonu
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Demir Sülfat Heptahidrat
FTU	Fitaz Enzim Ünitesi (Phytase Unit)
FYT	Fitaz Enzim Ünitesi (Phytase Unit)
g	Gram
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidroklorik Asit
H <sub>2</sub> S	Hidrojen Sülfür
I	İyot
kb	Kilobaz
KCl	Potasyum Klorür
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
KI	Potasyum İyodür
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
Mg <sup>2+</sup>	Magnezyum İyonu
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum Klorür
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Magnezyum Sülfat
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
Mn <sup>2+</sup>	Mangan İyonu
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Mangan Sülfat Heptahidrat
N	Normal
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum Klorür
Na <sub>2</sub> EDTA	EDTA Disodyum Tuzu
NaOH	Sodyum Hidroksit
NH <sub>3</sub>	Amonyak

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Amonyum Nitrat
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Amonyum Sülfat
Ni <sup>+2</sup>	Nikel İyonu
nm	Nanometre
U	Enzim Unitesi
P	Fosfor
pH	Hidrojen İyonlarının (-) Logaritması
pKa	Asidik İyonlaşma Sabitesinin Negatif Logaritması
PU	Papain Unit
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
OH <sup>-</sup>	Hidroksit İyonu
Zn <sup>2+</sup>	Çinko İyonu
v/v	Hacim/Hacim (Volume/Volume )
α	Alfa
β	Beta
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol

### Kısaltmalar

### Açıklama

bp	Baz çifti (Base Pair)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BPP	β-Pervane Fosfataz (β-Propellar Fosfataz)
BPPHy	β-Pervane Fitaz (β-Propellar Fitaz)
cDNA	Complementary Deoksiribonükleik Asit
CP	Sistidin Fosfataz
DMF	Dimethylformamide
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dH <sub>2</sub> O	Distile Su
dNTP	Deoksi Nükleozid Trifosfat
EC	Enzim Komisyonu
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
HAP	Histidin Asit Fosfataz
HAPHy	Histidin Asit Fitaz
HIV	Human Immunodeficiency Virus
Ins	İnositol
IP	İnositol Fosfat
IPTG	İsopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranoside
IUBMB	Uluslar Arası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
IUPAC	Uluslar Arası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
LB	Luria Broth
NCBI	National Center of Biotechnology Information
OD	Optik Yoğunluk (Optik Dansite )
<sup>31</sup> P-NMR	Fosfor-31 Nükleer Manyetik Rezonans
PAP	Mor Asit Fosfataz (Purple Asit Fosfataz)
PSM	Fitaz Tarama Ortamı
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

rpm	Revolutions Per Minute (Dakikadaki Döngü Sayısı)
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
sp.	Tür
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA
T <sub>m</sub>	Annealing Temperature
Tris	2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-Diol
Tris-HCl	Trishidroklorid (Tris Aminomethane Hydrochloride)
UV	Ultraviyole
Xgal	5-Bromo-4-Chloro-3-İndolyl-Beta-D-Galactopyranoside
X-ray analizi	X-ray Kristalografi Analizi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 1.1. Küresel endüstriyel enzim pazarı 2009-2016 (Anonim 2012).....	4
Şekil 2.1. Fitik asitin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.2. Fitik asitin protein ve nişasta ile oluşturduğu bileşiğin yapısı (Kornegay 2001).....	10
Şekil 2.3. Fitatın fitaz enzimi ile hidrolizi (Liu ve ark. 1998).....	15
Şekil 2.4. Fitazın fitata bağlı fosfat gruplarının hidrolizi ile mineral, protein ve nişastayı serbest bırakması.....	15
Şekil 2.5. Fitik asitin defosforilasyonun başladığı konuma göre fitaz çeşitleri (Bohn ve ark. 2008 ve Dvorakova 1998'dan değiştirilerek alınmıştır.).....	21
Şekil 3.1. Kullanılan toprak örneklerinin alındığı iller.....	41
Şekil 3.2. pGEM®-T Easy (Promega) vektörü ve sekans referans noktaları.....	54
Şekil 4.1. Fitaz üreten <i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1'in PSM ortamındaki görüntüsü.....	63
Şekil 4.2. <i>Bacillus</i> sp. izolatlarının taksonomik özellikleri (Buchanan ve Gibbons 1974).....	63
Şekil 4.3. Bakteri koloni ve hücre morfolojisi.....	64
Şekil 4.4. <i>Bacillus</i> dalgalı koloni tipi ve basil (çubuk) hücre tipi.....	64
Şekil 4.5. Petrideki yumuşak agarlı besiyerinde hareketlilik kontrolü.....	65
Şekil 4.6. Katalaz pozitif testinin petrideki görüntüsü.....	65
Şekil 4.7. Işık mikroskopunda bakterilerinin görünümü (100X).....	66
Şekil 4.8. Bakterilerin spor boyama sonrası görünümü (100X).....	66
Şekil 4.9. <i>Bacillus megaterium</i> EBD 9-1 suşunun 16S rRNA bölgelerinin filogenetik ağacı.....	67
Şekil 4.10. <i>Bacillus megaterium</i> EBD 9-1 suşunun 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisinin bir bölümünün kromotogramı.....	69
Şekil 4.11. Kromozomal DNA'nın %0,8'lik agaroz jel profili.....	70
Şekil 4.12. İleri (forward) primer-a ve geri (reverse) primer-a primer çifti kullanılarak yapılan PZR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel profili.....	71
Şekil 4.13. İleri (forward) primer-dejenere ve geri (reverse) primer-dejenere primer çifti kullanılarak yapılan PZR ürünlerinin % 1,5'luk agaroz jel profili.....	72
Şekil 4.14. PZR sonucunda elde edilen 3 bandın agaroz jelden izole edilmesi.....	73
Şekil 4.15. Çoğaltılan DNA fragmanını taşıyan rekombinant plazmidlerin kompetan hücrelere transformasyonu sonrası ampisilin içeren katı LB ortamındaki görüntüsü.....	76

<b>Şekil 4.16.</b> pGEM <sup>®</sup> -T Easy rekombinant plazmitlerinin <i>EcoRI</i> restiriksiyon enzimiyle kesimi sonrasında %1,5'lük agaroz jel profili.....	78
<b>Şekil 4.17.</b> P1-4 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551 tüm genom.....	80
<b>Şekil 4.18.</b> P1-4 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. <i>Bacillus megaterium</i> DSM319 tüm genom.....	80
<b>Şekil 4.19.</b> P1-4 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. <i>Bacillus megaterium</i> WSH-002 tüm genom.....	81
<b>Şekil 4.20.</b> P2-2 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. <i>Bacillus megaterium</i> AraC (araC) gene <sup>1</sup> .....	82
<b>Şekil 4.21.</b> P2-2 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551 tüm genom.....	82
<b>Şekil 4.22.</b> P2-2 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. <i>Bacillus megaterium</i> DSM319 tüm genom.....	83
<b>Şekil 4.23.</b> P2-2 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. <i>Bacillus megaterium</i> WSH-002 tüm genom.....	83
<b>Şekil 4.24.</b> P3-1 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. <i>Bacillus megaterium</i> AraC (araC) gene <sup>2</sup> .....	84
<b>Şekil 4.25.</b> P3-1 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. <i>Bacillus megaterium</i> WSH-002 tüm genom.....	85
<b>Şekil 4.26.</b> P3-1 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. <i>Bacillus megaterium</i> QM B1551 tüm genom.....	85
<b>Şekil 4.27.</b> P3-1 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. <i>Bacillus megaterium</i> DSM319 tüm genom.....	86



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. İzole edilen bazı fitazların özellikleri.....	18
Çizelge 2.2. Mikrobiyal fitazların bazı özellikleri (Greiner ve konietzny 2006, Kerovuo 2000).....	25
Çizelge 2.3. Bacillus cinsinin taksonomik sınıflandırılması.....	33
Çizelge 2.4. Bacillus cinsi mikroorganizmaların genel özellikleri (Claus ve Berkeley 1986).....	34
Çizelge 2.5. Fitaz enziminin izole edildiği organizmalar ve klonladığı konaklar (Tye 2002).....	40
Çizelge 3.1. Fitaz pozitif bakterilerin seçiminde kullanılan katı besiyeri.....	42
Çizelge 3.2. Fitaz pozitif bakterilerin saklanmasında kullanılan LB agarlı besiyeri.....	43
Çizelge 3.3. Taksonomik sınıflandırma amacıyla yapılan deneylerde kullanılan besiyerleri (Çotuk 2003).....	43
Çizelge 3.4. Bakteri kültürünün saklanmasında kullanılan besiyerleri (Sarıkaya 1995 ).....	46
Çizelge 3.5. Kromozomal DNA'nın kontrolünde kullanılan %0,8'lik agaroz jel içeriği.....	48
Çizelge 3.6. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan 1X TBE tamponu içeriği.....	48
Çizelge 3.7. Bacillus sp.'ye ait fitaz sekanslarından faydalanarak hazırlanan primerler.....	49
Çizelge 3.8. PZR koşulları.....	50
Çizelge 3.9. İleri (forward) primer-a ve geri (reverse) primer-a'nın kullanıldığı PZR döngü programı.....	51
Çizelge 3.10. İleri (forward) primer-dejenere ve geri (reverse) primer-dejenere'nin kullanıldığı PZR döngü programı.....	51
Çizelge 3.11. PZR ürünün görüntülenmesinde kullanılan % 1,5'luk agaroz jel içeriği.....	52
Çizelge 3.12. Ligasyon reaksiyonu koşulları.....	54
Çizelge 3.13. Kompetan DH5α hücreleri hazırlanmasında kullanılan katı besiyeri.....	55
Çizelge 3.14. Kompetan DH5α hücreleri hazırlanmasında kullanılan sıvı besiyeri.....	55
Çizelge 3.15. CaCl <sub>2</sub> ve gliserol içeren çözeltilerin hazırlanışı.....	56
Çizelge 3.16. Transformasyonun gerçekleştiğinin belirlenmesi amacı ile hazırlanan besiyeri.....	57
Çizelge 3.16. Transformasyonun gerçekleştiğinin belirlenmesi amacı ile hazırlanan besiyeri(devam).....	58
Çizelge 3.17. Transformasyonu gerçekleşen kolonilerin stoklarının oluşturulmasında kullanılan besiyeri.....	58
Çizelge 3.18. PZR tüplerindeki plazmit DNA'sı, PZR suyu ve PZR karışımı miktarları.....	60
Çizelge 3.18. PZR tüplerindeki plazmit DNA'sı, PZR suyu ve PZR karışımı miktarları(devam).....	61
Çizelge 4.1. Fitaz pozitif Bacillus sp.'lerin fitaz zonu çapları.....	62
Çizelge 4.2. Bacillus cinsinin belirlenmesinde kullanılan morfolojik testler ve test sonuçları.....	67
Çizelge 4.3. Bacillus sp. 9-1 suşunun 27F primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi.....	68
Çizelge 4.4. Bacillus sp. 9-1 suşunun 1492R primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi.....	68
Çizelge 4.5. İzole edilen genomik DNA'ların konsantrasyonları.....	70
Çizelge 4.6. Agaroz jelden izole edilen PZR ürünü bantların konsantrasyonu.....	74
Çizelge 4.7. Kullanılan PZR ürününe göre ligasyon ürününün adlandırılması.....	75
Çizelge 4.8. PZR ürünlerinden plazmit izolasyonuna kadar olan olayların gelişimi.....	77

<b>Çizelge 4.9.</b> İzolasyonu yapılan plazmitlerin konsantrasyonları.....	77
<b>Çizelge 4.10.</b> P1-4 plazmitinin taşıdığı 758 nükleotitten oluşan DNA fragmanının sekansı.....	79
<b>Çizelge 4.11.</b> P2-2 plazmitinin taşıdığı 473 nükleotitten oluşan DNA fragmanının sekansı.....	81
<b>Çizelge 4.12.</b> P3-1 plazmitinin taşıdığı 473 nükleotitten oluşan DNA fragmanının sekansı.....	84

## 1. GİRİŞ

Enzimler doğal olarak canlılar tarafından sentezlenen protein yapısında ya da bir kısmı protein olan spesifik biyokatalizörlerdir. Canlı sistemde metabolizmayı oluşturan tüm biyokimyasal reaksiyonların neredeyse tamamında görev yapan bu kompleks organik moleküller ilgili reaksiyonların hızını ve özgülüğünü düzenler. Bununla birlikte enzimler sadece canlı hücrelerde aktivite göstermezler. Bunlardan bazıları hücreden ayrılabilir ve fonksiyonlarına *in vitro* devam edebilir.

Enzimler, hücrelerde çeşitli biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştiren protein yapısındaki moleküllerdir. Binlerce yıl öncesinde enzimlerin ve enzim üreten organizmaların kullanılmasına karşılık, enzimler hakkında bilimsel denebilecek araştırma ve bulgular ancak geçtiğimiz yüzyılda gözlenmeye başlanmıştır. Berzelius 1838 yılında ferment olarak adlandırılan enzimler için, katalizör (biyokatalizör) terimini kullanmıştır. Enzimlerin keşfinin başladığı ilk yıllarda pek çok araştırmacı, fermentasyon olaylarında mayalar ve mayaların etkilerini göz önüne aldıkları için, enzimleri tanımlamaya yönelik olarak ferment terimini kullanmışlardır. Frederick W. Kühne 1878'de bu moleküllere (fermentlere) "enzim" adını vermiştir (Nelson ve Cox 2004, Whitehurst ve Van Oort 2010).

Enzimler katalizör olarak, kimyasal reaksiyonları hızlandırmada ve bir molekülü diğer bir moleküle dönüştürmede kullanılır. Bu işlevi enzim kendisi değişikliğe uğramadan yerine getirir (Karademir ve ark. 2002, Nelson ve Cox 2004). Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en büyük farkı özgül (spesifik) olmalarıdır. Enzimlerin reaksiyon ve substrat spesifikliğı olmak üzere iki önemli özgülükleri bulunmaktadır. Enzim reaksiyon spesifikliğınden anlaşılan, substratın birçok değışim reaksiyonu mümkün iken, enzimin substratı bu yollardan sadece birine göre katalize etmesidir. Enzimlerin substrat spesifikliğınden anlaşılan ise, bir ortamda bulunan ve yapıları birbirine çok benzeyen çeşitli substratlardan yalnız biriyle reaksiyon vermelidir. Fakat çok az miktardaki enzim çok fazla miktardaki substratla reaksiyona girebilir (Smith 2004). Substrat açısından enzim spesifikliğınin protein kısmı tarafından gerçekleştirildiğı kabul edilmektedir (Karapınar 2002).

Enzimler, binlerce yıldır içecek, ekmek ve peynir yapımı gibi işlemlerde farkında olunmadan kullanılmıştır. Bu nedenle alkol fermentasyonu, bira ve ekmek yapımı gibi işlemler ilk biyoteknolojik işlemler olarak tanımlanabilirler. Örneğin; şarap üretiminde mayaların kullanımı ilk olarak M.. 2100 civarında Hammurabi Yasalarında bahsedilen bir tekniktir. Fakat ham enzim preperatlarının kullanımı canlı organizmanın kullanımından daha eskidir. M.. 600 civarında Homerus'un İlyada (Truva) destanında peynir üretiminde sütün kesilmesi için "ficin" denilen incir ağacından elde edilen sıvının kullanımından bahsedilmiştir (Buxbaum 2007). 1896'da batıda gerçek modern mikrobiyal enzim teknolojisi "takadiastase" denilen nişaştanın sindirimini sağlayan enzimin ticareti ile başlamıştır. Bu doğudan batı toplumuna önemli bir teknolojik transferdir (Uhlig 1998, Aygan 2008).

Organik kimyada kullanılan metotlar ile gerçekleştirilmesi çok güç olan ya da gerçekleştirilmesi mümkün olmayan birçok reaksiyonun uygun enzimlerle kolaylıkla gerçekleşmesi, enzimlerin canlı hücrelerden izole edilerek çeşitli amaçlar için kullanılması fikrini doğurmuştur. Enzimlerin bu özellikleri, gıda üretimi, biyoremediasyon ve ilaç gibi birçok farklı endüstriyel alanda kullanımlarının giderek yaygınlaşmasına neden olmuştur. Bu uygulamalar genel olarak enzim teknolojisi şeklinde adlandırılmaktadır (Smith 2004).

Enzimler başta gıda sanayisi olmak üzere deterjan endüstrisinde, kağıt üretiminde, deri işlenmesinde, tekstil endüstri gibi diğer endüstriyel alanlarda da kullanıldığı gibi tıpta teşhis ve tedavide de geniş bir kullanım alanına sahiptir (Daniels 1992, Kirk ve ark. 2002). Endüstriyel enzimlerin en büyük piyasasını deterjan endüstrisi oluşturmaktadır (Saeki ve ark. 2007). Deterjan katkı maddesi olarak enzimlerin kullanımı hem değer hem de hacim olarak endüstriyel enzimlerin hala en geniş uygulaması görünümündedir (Kirk ve ark. 2002). Fakat, firincılık ve hayvan yemi endüstrilerinde enzim kullanımında son yıllarda hızlı bir artış görülmüştür. Enzimler gıda endüstrisinde genel olarak değişik bir ürün elde etmek veya ürüne istenilen özellikler kazandırmak amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca gıda ham maddelerindeki toksik veya beslenme değerini düşürücü bileşiklerin uzaklaştırılmasında enzimatik yollara başvurulmuştur (MEGEP 2007).

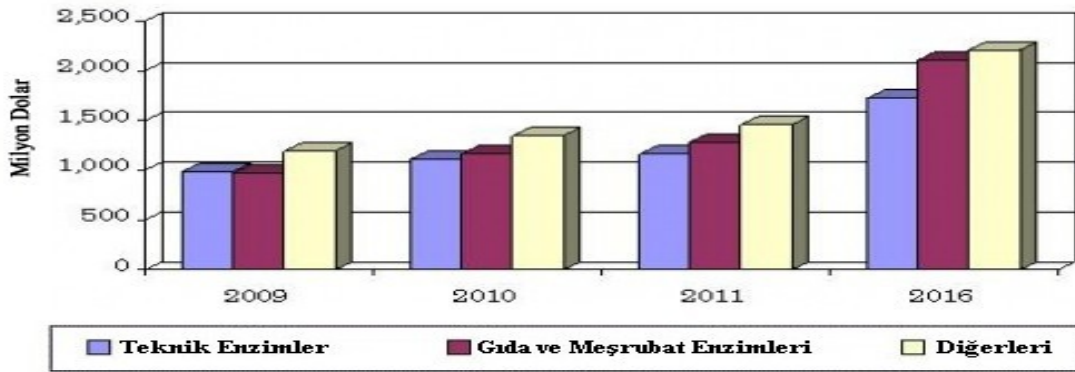
Günümüzde, ticari amaçlı gıdalar en az bir tane enzim tarafından üretilen madde içermektedir. Bu gıdaların çeşitliliği bize enzimlerin kullanım alanlarının farklılığını göstermektedir. Bu gıdasal kullanım alanlarına tatlandırıcılar, çikolata şurupları, fırın ürünleri, alkollü içkiler, önceden pişirilmiş tahıllar, bebek gıdaları, balık yemleri, peynir ve süt ürünleri, yumurta ürünleri, meyve suyu, alkolsüz içecekler, bitkisel yağ ve sebze çorbası, şekerleme, baharat ve çeşni özütleri ve likit kahve ürünleri örnek olarak verilebilir. Bununla beraber hamur olgunlaştırmada, biranın soğuğa dayanıklılığı ve etin yumuşatılması gibi uygulamalarda da enzimlerin kullanımı söz konusudur (Enzyme Technical Association 2001). İlk enzim uygulamalarında kaynak olarak bitkiler ve hayvanlar tercih edilmiş olsa da günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık % 90'ı mikroorganizmalardan üretilmektedir (Wolfgang 2004). Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin tercih edilmesinin sebebi, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Zeman ve McCrea 1985, Wiseman 1987). Ayrıca mikrobiyal enzimler yenilenebilir kaynaklardan üretilmesi ve biyolojik olarak bozulabilmesi de bu nedenlerin arasındadır. Bununla birlikte enzimlerin üretiminden elde edilen atıkların toprak verimini arttırmada gübre olarak tarımsal arazilerde kullanılabilirliği de mikrobiyal enzim kullanımını arttırmaktadır. Mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir (Demain ve Solomon 1981). Bu güne kadar 2 000'den fazla enzim tanımlanmış olup, bunlar arasında yaklaşık 100 tanesi ticari kullanıma uygun bulunmasına rağmen günümüzde sadece 18 tanesi endüstriyel amaçla kullanılmaktadır (Zeman ve McCrea 1985).

Endüstriyel alanda kullanılan enzimler çok çeşitli biyolojik kaynaklardan üretilmektedirler. Bunların yaklaşık %60'ı filamentöz fungi, %24'ü bakteriler, %6'sı hayvanlar, %4'ü mayalar ve %2'si *Streptomyces* tarafından üretilmektedir (Lowe 2001).

Biyoteknoloji sayesinde, yeni tür enzimlerin büyük ölçeklerde ve ekonomik olarak üretilmesi mümkün olmuştur. Buna göre endüstride faydalı olan ve ticari olarak kullanılan enzimler, bir ürünün üretilmesinde bazı avantajlara sahip olmalıdırlar. Buna

göre, bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilmesi için, maliyet bakımından ucuz olması, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğine sahip olması ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmaması ve güvenilir olması gerekmektedir (Wiseman 1987, Sarıkaya 1995).

2012 yılında endüstriyel enzimlerin dünya piyasasındaki payı 4,5 milyar ve 2013 yılında 4,8 milyar Dolar civarında olacağı tahmin edilmektedir. Bu pazarın 2013-2018 yılları arasında yaklaşık olarak %8,2'lik büyüme oranı ile 7,1 milyar Dolara ulaşması beklenmektedir (Anonim 2014). Dünya piyasasında kullanılan endüstriyel enzimlerin yaklaşık %60'ı Avrupa'da, %40'ı da ABD ve Japonya'da üretilmiştir. Çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılan enzimlerin dağılımlarına bakıldığında gıda endüstrisinde %41, deterjan endüstrisinde %34, tekstilde %11, deri endüstrisinde %3, kağıt endüstrisinde %1 ve diğer uygulamalarda %6 oranında enzim kullanılmaktadır (Smith 2004). Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %75'i hidrolitik enzimlerden oluşmaktadır. Kullanım sırasına bakılacak olursa proteaz grubundaki enzimler ilk sıradayken, karbonhidratları parçalayan enzimler ikinci sırada yer almaktadır (Harwood 1992, Bhat 2000). Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım değerleri, %25 alkaline proteaz, %21 diğer proteazlar, %18 amilaz, %10 renin, %3 tripsin, %3 lipaz, %10 karbonhidratları parçalayan diğer enzimler (selülaz ve ksilanaz gibi), %10 farmasötik enzimler olacak şekilde bir dağılım göstermektedir (Rao ve ark. 1998). Diğer enzimler ise 2011 yılında 1,5 milyon dolarlık pazar payına sahipken 2016 yılında bu payın %8,7 büyüyerek 2,2 milyon dolara yükselmesi beklenmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Küresel endüstriyel enzim pazarı 2009-2016 (Anonim 2012)

Endüstriyel enzimler içinde hayvan beslenmesinde kullanılan yem enzimlerinin pazarının 2014 yılı itibari ile 725 milyon Dolar civarında olduğu ve bu rakamın 2017 yılında 1 milyar Dolara geçeceği tahmin edilmektedir. Hayvan beslenmesinde kullanılan enzimler içerisinde fitaz %60 ile önemli bir yer tutmaktadır (<http://www.feedinfo.com/console/PageViewer.aspx?page=3803488>).

Hayvanların beslenmesinde kullanılan yemlerin büyük bir kısmını tahıl, baklagil ve yağlı tohumlar ve onların yan ürünleri oluşturmaktadır. Bu ürünler önemli miktarda fitik asit içermektedir. Bununla birlikte fitik asit, bu ürünlerdeki fosfor, kalsiyum, çinko, magnezyum, mangan, bakır, demir gibi elementler ve protein, aminoasit ve nişasta gibi moleküller ile suda çözünmez kompleksler oluşturmaktadır. Fitik asitin bir veya iki değerli katyonlarla oluşturduğu karışık tuzları olarak adlandırılan fitat fosfatın en büyük depo formu olup, tahıl ve baklagillerdeki toplam fosforun %80'den fazlasını oluşturur. Fosfor ise, hayvan vücudunda en çok bulunan önemli mineraldir ve yaklaşık %80'i kemik ve dişlerde bulunur. Bununla birlikte fosfor kemik ve iskelet gelişimi ile birlikte, başta enerji metabolizması olmak üzere birçok enzim sisteminin de yapısına katılır. Yemlerdeki materyallerindeki fosforun önemli bir kısmı (%50-90) fitik asit şeklinde bulunduğu için rasyonlara genellikle inorganik fosfor ek yem şeklinde katılır. Bu durum ise çevreyi özellikle yeraltı ve üstü su kaynaklarını fosfor yönünden tehlikeli bir duruma getirerek çevresel fosfat kirlenmesine yol açmaktadır. Bu sebeple fitatın hidrolizi mutlak surete gereklidir. Fitatı hidrolizini sağlamak amaçlı kimyasal ve fiziksel metodlar kullanılmasına rağmen, bu yöntemlerin pahalı olması ve gıdanın besin değerini düşürmesi bunlara alternatif olarak kullanılan fitazların endüstriyel açıdan önemini arttırmaktadır. Endüstriyel açıdan önemli enzimlerden olan fitazlar, tahıllar, baklagil ve yağlı tohumların önemli bir içeriği olan fitatı hidrolize eden enzim olup, fitatı inorganik monofosfat, myo-inositol fosfat ve serbest myo-inositol'e hidrolize etmektedir (Kerovuo ve Tynkkynen 2000).

Fitaz enzimi bakteri, fungus ve maya gibi mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedir. Günümüzde ticari olarak üretimde toprak fungusu olan *Aspergillus* kullanılsa da, substrat spesifikliği, proteolizise karşı direnç göstermesi ve katalitik

aktivitesi gibi özelliklerinden dolayı bakteriyel fitazlar, fungal enzimlere alternatif oluşturabilmektedir (Konietzny ve Greiner 2004). *Aerobacter aerogenes* (Greaves ve ark. 1967), *Pseudomonas* sp. (Irving ve Cosgrove 1971), *B. subtilis* (Powar ve Jagannathan 1982), *Klebsiella* sp. (Shah ve Parekh 1990), *B. subtilis* (natto) (Shimizu 1992), *E. coli* (Greiner ve ark. 1993), *Enterobacter* sp. 4 (Yoon ve ark. 1996) ve *Bacillus* sp. DS11 (Kim ve ark. 1998a) gibi bakteriler iyi birer fitaz üreticisi olarak rapor edilmiştir. Özellikle *Bacillus* suşları patojen olmamaları ve sentezledikleri fitazı hücre dışına salgılama yeteneğinde olduklarından endüstride önemli bir yere sahiptir.

Endüstriyel enzim üretiminde genellikle mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Mikrobiyal yolla enzim üretiminin ilk aşaması uygun mikroorganizmanın seçimidir. Bununla birlikte kültür ortamı ve fermantasyon koşulları da enzim üretimini etkilemektedir. Üretimi arttırmak için kültür ortamı ve fermantasyon koşullarının optimize edilmesinin yanında modifiye edilmiş mikroorganizmalar da kullanılması yoluna gidilmiştir. Bu amaçla rekombinant suşlar geliştirilmiştir ve enzim üretiminde kullanılmaya başlanmıştır. Bu şekilde fitaz enzimini üreten mikroorganizmalardan da fitaz geni klonlanarak ifade edilmiş ve üretim koşulları optimize edilmiştir. *Bacillus* sp. fitazı *E.coli*'de (Kim ve ark. 1998b), *B. amyloliquefaciens* fitazı *B. subtilis*'de (Kim ve ark. 1999), *Schwanniomyces occidentalis* fitazı *Candida boidinii*'de (Nakamura ve ark. 1999), *A. ficuum* fitazı *Nicotiana tabacum*'da (Ullah ve ark. 1999), *A.niger* fitazı *E.coli*'de (Phillippy ve Mullaney 1997) klonlanmış ve ifade edilmiştir.

Dünyada olduğu gibi Türkiye'de de enzim kullanımı her geçen gün artmaktadır. Bu tez kapsamında araştırılacak olan fitaz enzimi, yem endüstrisi tarafından kullanılan ve her geçen gün kullanım oranı artan bir enzimdir. Bu amaçla, Türkiye'deki 30 farklı ilden alınmış olan toprak örneklerinden izole edilecek olan yeni *Bacillus* sp. suşlarından maksimum fitaz enzim aktivitesi gösteren bir adet *Bacillus* sp. suşu izole edilecektir. Bu suşun fitaz enzimi geni uygun bir vektör aracılığı ile ara konakçı olan *E.coli*'de klonlanacaktır. Ayrıca fitaz enziminin sekans analizi yapılarak, literatürdeki fitaz sekansları ile karşılaştırılacaktır.

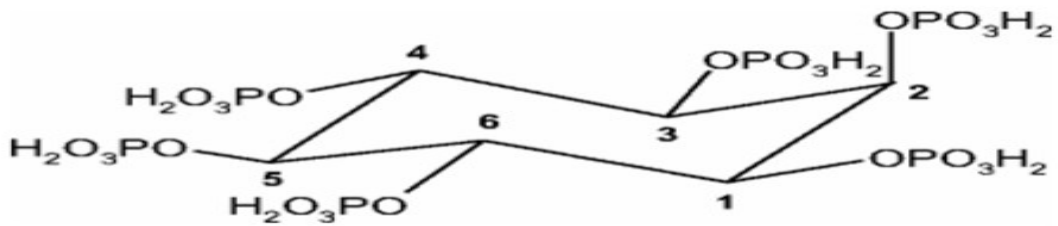


## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Fitik asit tarihçesi, yapısı ve özellikleri

Fitik asitin (myo-inositol 1,2,3,4,5,6 hekzakis dihidrojen fosfat) kimyasal yapısı hakkındaki çalışmalar ilk olarak 1855 yılında başlamıştır. Fitik asitin tanınması ise, 1856 yılında Harting adlı araştırmacının çeşitli bitkisel tohumlardan, bitkinin büyümesinde depo işlevi gördüğü düşünülen küçük vezikülleri izole etmesi ile saptanmıştır. Harting, bu veziküllerin nişasta içermediğini, ancak tohumun gelişmesinde önemli rolü olduğunu bildirmiştir. 1872 yılında Pfeffer, fitatı ilk kez bitki tohumlarından izole etmiş ve kalsiyum, magnezyum ve fosfor içeren, ancak azot içermeyen organik bir kompleks olduğunu belirtmiştir (Reddy ve ark. 1982). Pek çok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda, bu bileşik için çeşitli kimyasal yapılar gösterilmiştir. Fitik asidin konformasyonel yapısı X-ray analizi ve  $^{31}\text{P}$  –NMR içeren modern kimyasal analizlerle artık bilinmektedir.

Fitik asitin kimyasal yapısı ile ilgili olarak çok fazla çalışma yapılmış ve pek çok model önerilmiştir. Anderson simetrik hekzaortofosfat yapısı ve Neuberg asimetrik hidrate trifosfat yapısını önermiştir. En çok bu iki model tartışılmış ve Anderson'un modeli olan myo-inositol hekzaortofosfat modeli kabul görmüştür. Bu modele göre basit bir şeker olan myo-inositol, altı tane fosforik asitle kombine olmuştur (Şekil 2.1) (Lasztity ve Lasztity 1990). Fitik asit; myo-inositol halkası ve buna bağlı altı inorganik fosfattan oluşan bir ester asitidi olup, sistematik adı myo-inositol 1,2,3,4,5,6 hekzakis dihidrojen fosfat veya myo-inositol hekzakisfosfat'dır (Graf 1986, Sathe ve Reddy 2002, Selle ve Ravindran 2007). Moleküler formülü,  $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$  olup moleküler ağırlığı 660,04 g/mol'dür (Kumar ve ark. 2010).



Şekil 2.1. Fitik asitin kimyasal yapısı

Fitik asit bitkilerin, tohum, tane, kök, yumru, polen ve sporlarında; kuş ve kaplumbağaların eritrositlerinde; organik topraklarda bulunur (Erdman ve Forbes 1977, Adeyeye ve ark. 2000, Feil 2001). Fitik asit en yüksek oranda; hububat, baklagil ve sert kabuklu yemişlerde, orta düzeyde; enginar, patates, çilek ve incirde, az miktarda; elma, brokoli, havuç ve yeşil fasülyede bulunur. Turunçgil, muz, kereviz, mantar ve kuru erikte fitik asit bulunmaz (Harland ve Harland 1980). Tahıllardaki fitik asit miktarı iklim koşulları, lokasyon, sulama ve toprak çeşidi gibi pek çok faktörden etkilenir.

Fitik asit baklagiller, tahıl, yağlı tohum, polen ve sert kabuklu meyvelerde %1-5 oranında bulunan bir bileşendir. Tahıllardaki fitik asit miktarı %0,5-2 arasında değişmektedir. Örneğin; buğdayda %0,6-1,35, arpada %0,97-1,13, mısırdaki %0,53-0,89, yulafta %0,77-1,01, tritikalede %0,5-1,89 arasındadır (Bassiri ve Nahapetian 1977, Lasztity ve Lasztity 1990). Tahıl ve baklagillerde bulunan fitik asitin önemli bir miktarı tohum olgunlaşması sırasında birikir (Honke ve ark. 1988). Tahıldaki fitik asit genellikle alöron tabakasında daha yoğun olarak bulunur ve bu yoğunluk embriyoya doğru azalır. Fakat mısırdaki diğer tahıllardan olarak fitik asitin neredeyse tamamı embriyoda bulunur.

Fitik asitin tuzları fitat olarak adlandırılır. Fitatlar, fitik asitin anyon formudur. Fitin ise daha çok fitik asitin kalsiyum, magnezyum ya da potasyum tuzlarını ifade eder (Forbes ve ark. 1983, Onyango ve ark. 2005, Karimi 2006).

Fitin daha çok bitki tohumlarında bulunmaktadır. Fakat farklı bitki tohumlarında fitinin bulunduğu yerler farklılıklar göstermektedir. Mısır tanesinde bulunan fitinin %90'ı germ içerisinde, buğday ve pirinçte ise fitinin büyük kısmı aleuron tabakasında ve dış kısımda bulunan kepekte yer almaktadır (Rao ve Reddy 2007). Birçok yağlı tohumda ve baklagil tanelerinde ise fitin, proteine bağlı olarak globoid adı verilen subselüler inklüzyonların içerisinde yoğunlaşmış halde tüm tohuma dağılmış şekilde bulunur (Ravindran ve ark. 1995).

Fitat başlıca bitki tohumlarında bulunmaktadır (Ravindran ve ark. 1995). Fitat düzeyi buğdaygil tanelerinde %0,06–2,22, buğdaygil yan ürünlerinde ve protein kaynağı yemlerde %0,08–6 arasında bulunmaktadır (Reddy 2002). Buğdaygil taneleri (mısır,

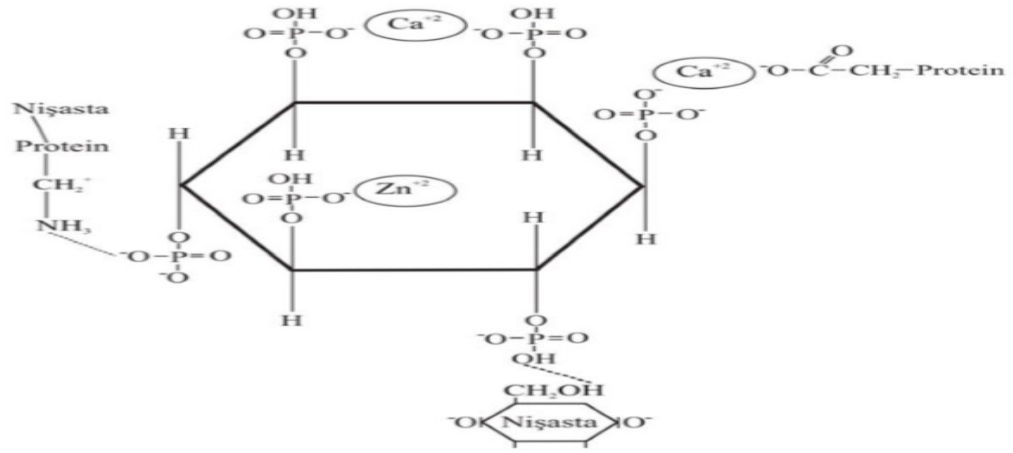
arpa, buğday, yulaf) ve baklagil taneleri gibi rasyonlarda sık kullanılan yem maddelerinde fitat düzeyi oldukça benzerlik göstermektedir ve bu düzey yaklaşık olarak yem kuru maddesinin %0,25'i kadardır. Genellikle yağlı tohum küspelerinde fitat düzeyi daha yüksektir. Örneğin; soya fasulyesi küspesinde %0,39, kolza küspesinde %0,70, pamuk tohumu küspesinde %0,84 ve ayçiçeği küspesinde %0,89'dur. Son araştırmalarda, parlatılmış pirincin tüm tahıllar içerisinde en az düzeyde (< %0,25) fitat içerdiğini bildirmiştir (Reddy 2002). Bununla birlikte fitat pirinçte en fazla embriyo ve perikarpta bulunur (Maenz 2001).

Fitik asitin tuz formu olan fitat, tahıl ve baklagillerde fosforun depo formudur ve toplam fosforun %80'den fazlasını oluşturur. Örneğin; mısır tohumları, %0,89 fitik asit içermektedir ki bu oran total fosforun %88'ini oluşturur. Bu nedenle fitat genellikle fosfor ve myo-inositol depo şekli gibi kabul edilir. Her iki madde de tohumun çimlenmesi için gereklidir (Laboure ve ark. 1993). Tohumların yanı sıra yan ürünlerinde de %1-2 oranında fitik asit bulunmaktadır ve bu oran tohumlardaki toplam fosforun %60'dan fazlasını oluşturmaktadır (Reddy ve ark. 1982). Örneğin; kahverengi pirinçte bulunan fosforun en az %80'i ve işlenmiş pirinçte bulunan fosforun en az %40'ı fitata bağlıdır. Pirinç kepeği tüm tahıl kepekleri içerisinde en yüksek fosfor düzeyine sahiptir ve bunun %90'ı fitat formundadır (Puminn 2003).

Fitik asitin hem besin maddesi hem de anti-besinsel faktör olduğu bildirilmektedir (Pallauf ve Rimbach 1997a). Besin maddesi olarak düşünüldüğünde; fitik asitler fosfor içeriklerinden dolayı hayvan yemlerinde temel fosfor kaynağıdır (Reddy ve ark. 1982). Bitkisel kökenli yem maddelerinde bulunan toplam fosforun yaklaşık %50-80'i fitat fosforu şeklinde olup, fitik asidin fosfor içeriği %28,2'dir (Ravidran ve ark. 1995). Ruminantlar gibi fitat molekülündeki fosforunun serbest bırakılmasını sağlayabilen hayvanlar, fosfor gereksinimlerini bitkisel yem materyalindeki fosfor ile karşılayabilmektedirler (Ketola ve Harland 1993). Yem materyali üzerinde bir takım değişiklikler uygulanmazsa genellikle fitat fosforunun büyük bir kısmı değerlendirilememekte ve inorganik fosfor kaynaklarının yem materyaline eklenmemesi durumunda hayvanın gereksinim duyduğu fosfat düzeyi karşılanamamaktadır. Bu nedenle fitik asit çoğunlukla antinutrisyonel faktör olarak değerlendirilmektedir. Yani

kanatlılar ve domuzlar gibi tek mideli hayvanlar fitat fosforunun bir kısmını veya tamamını değerlendirilememektedir (Pallauf ve Rimbach 1997b).

Fitik asit kimyasal yapısı gereği 6 fosfat grubu içerir ve anyon olduğu için fizyolojik pH'da sadece fosforu değil diğer kation, protein, aminoasit ve nişasta gibi moleküllere bağlanır veya şelat bileşikleri oluşturur (McKnight 1997). Fitik asitin protein, mineral ve nişasta ile oluşturduğu kompleks yapı Şekil 2.2'de gösterilmiştir (Kornegay 2001).



**Şekil 2.2.** Fitik asitin protein ve nişasta ile oluşturduğu bileşiğin yapısı (Kornegay 2001)

Fitik asit moleküller yapısı gereği pH'ın bazik veya nötr olduğu ortamlarda ve sindirim kanalında güçlü bir şekilde negatif yük ile yüklüdür. Çünkü Costello ve ark. (1976)'na göre fitat molekülü üzerinde 12 adet proton ayrılma bölgesi/reaktif alan bulunmaktadır. Bu reaktif alanların altısı güçlü asidik yapıdadır ve pKa değerleri yaklaşık olarak 1.5'tir. Üç tanesi zayıf asidik yapıdadır ve pKa değerleri 5.7, 6.8 ve 7.6'dır. Diğer üçü ise oldukça zayıf asidik yapıdadır ve pKa değerleri 10'un üzerindedir. Bu nedenle nötr pH'da  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  ve  $Ca^{2+}$  gibi divalent ve trivalent kationlara, kararlı bileşikler olan erimeyen tuzları oluşturacak şekilde bağlama yeteneğine sahiptir. Mineral iyonları bir ya da birden fazla fosfat grubuyla bağlanıp kompleks oluşturabilir. Proteinler izoelektrik noktalarının altındaki pH değerlerinde pozitif yüklü olduklarından elektrostatik çekimle fitik asite bağlanırlar. Sonuçta, fitat fosfora benzer şekilde bileşik oluşturduğu maddelerin yararlanılabilirliğini azaltmaktadır (Rao ve Reddy 2007, Rickard ve Thompson 1997).

Çoğu fitik asit mineral kompleksinin fizyolojik pH 4.0-6.0'da çözünürlüğü çok düşüktür hatta bazı fitatlar bu pH'da hiç çözünmez. Bu durumda fitik asit ile divalent katyonların oluşturduğu kompleks, normal gastrointestinal pH da, yani pH 4.0-8.0 arasında en az çözünürlüktedir. Bu yüzden fitat-mineral bileşikleri sıvıda çözülmüş şelatlar halinde veya sıvılarda çökelti oluşturan bileşikler halinde bulunmaktadır (Maenz 2001). Oluşan şelatların bağırsak ortamında çökmesiyle söz konusu minerallerin emilimi de olumsuz yönde etkilenir (Oberleas 1973). Fitat fosfor hidrolizini engelleyen katyonların nötr pH koşullarında bu etkileri bakımından,  $Zn^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{3+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$  şeklinde bir derecelendirme yapılmaktadır (Maenz ve ark. 1999). Yani  $Zn^{2+}$ , fitat ile en kararlı bileşiği oluşturur. pH'nın düşmesi minerallerin fitat hidrolizini baskılama düzeylerini azaltmaktadır. pH'nın düşmesiyle fitat üzerinde bulunan zayıf asit fosfat gruplarındaki mineraller serbest kalmakta ve fitaza dirençli mineral-fitat bileşikleri fitaza karşı duyarlı hale dönüşmektedir (Maenz 2001).

Fitik asitler sindirim sistemi ortamında pepsin-tripsin gibi proteolitik enzimler (Singh ve Krikorian 1982) ile protein ve aminoasitler üzerinde de negatif bir etki yaratmaktadır (O'Dell ve Borland 1976, Knuckles ve ark. 1985). Çünkü fitik asitler; fitat-protein veya fitat-mineral-protein kompleksini oluşturarak protein değerlendirilebilirliğini azalttığı gibi nişasta ile kompleks oluşturarak nişasta sindirimini de engellemektedir (Thompson ve ark. 1987). Ayrıca fitat aminoasitlerle de bileşikler oluşturarak aminoasitler üzerine olan enzim etkinliklerinin engellenmesine ve dolayısıyla sindirilebilirliklerinin düşmesine de neden olmaktadır. Yani serbest fitik asit bileşikleri  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  gibi mineral maddeler ve proteinler ile erimeyen kompleks bileşikler oluşturarak, sindirim ve emilimlerini engellemekte ve var olan besin maddelerinin kullanımını sınırlamaktadır (Sarifikioğulları ve Öno1 1998, Şenköylü 2002, Raboy 2001).

Monogastrik hayvanlarda (kanatlı hayvanlar, domuz, balık vb.) fitat fosforunun kullanılabilirliğinin düşük olması, çevresel kirlilik bakımından da büyük önem taşımaktadır. Monogastrik hayvanlar sindirim sistemlerindeki düşük fitaz seviyesinden dolayı, fitik asidi metabolize edemezler, inorganik fosforu dışkı ile atarlar (Han ve ark. 1999). Ayrıca monogastrik hayvanların (domuz, balık ve kanatlı hayvanlar)

değerlendiremedikleri fitat fosforu yerine karmalara inorganik fosfor kaynakları ilave edilmekte bu da üretim maliyetlerini arttırmaktadır (Kerovuo 2000, Erkek ve Ünlü 2003). Değerlendirilemeyerek gübre ile atılan fosfor, bir taraftan rasyon maliyetini artırırken, diğer taraftan da toprak ve su kirliliğine neden olmaktadır (Sharpley 1999, Şenköylü 2002).

Kanatlı karma yemlerinin hazırlanmasında kullanılan bitkisel yem kaynaklarının tümünde, fosforun büyük bir kısmı ( yaklaşık 2/3'ü ) fitata bağlı formda bulunur. Ayrıca bu ham maddelerdeki endojen fitaz aktivitesinin yetersizliği ve kanatlılardaki sindirim aktivitesinin yoksunluğu sebebiyle fosfordan yararlanım son derece düşüktür. Bu sebeple, yapısal ve metabolik gelişim için esansiyel bir mineral olan fosfat ihtiyacının karşılanması amacıyla kanatlı rasyonlarında inorganik fosfat kaynaklarının kullanımı kaçınılmaz olmuştur (Anonim 1994). Rasyona ilave edilecek inorganik fosfor kaynağı enerji ve proteinden sonra 3. derecede pahalı ham maddedir. Bu da üretim maliyetini doğrudan arttırmaktadır. Ancak, inorganik fosforun da büyük kısmı tıpkı fitata bağlı fosfor gibi dışkı ile atılmaktadır. Rasyonda inorganik fosfor kullanımı, hem ekonomik hem çevresel etkiler yaratmaktadır (Boling 1999). Bu olumsuz etkilerin ortadan kaldırılması veya azaltılması amacıyla son yıllarda kanatlı hayvanlarının yemlerine fitaz enziminin kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Fitazın, gübreyle atılan fosfor miktarında meydana getirmiş olduğu azalma, net olarak %20 ile 50 arasında değişmektedir (Kornegay 2001). Örneğin; Paik (2003) yaptığı araştırmada yararlanabilir fosfor gereksiniminin 1 g/kg altında beslenen etlik piliçlerde rasyona 500 FTU/kg düzeyinde fitaz enzimi katılmasının dışkı yoluyla fitat fosforu atılımını %29,6 oranında azalttığını belirtmiştir.

Balıklar, yem maddeleri içerisindeki fitat fosforundan yararlanacak sindirim enzimine sahip olmadığından suda fosfor birikimi meydana gelmektedir. Bu nedenle fitaz su ürünleri üretiminde, hem düşük fiyatlı bitkisel kökenli maddelerin kullanımını artırmak hem de suda fosforu kabul edilebilir seviyede tutabilmek için kullanılmaktadır. Balık beslemesinde, yüksek seviyelerde bitkisel kökenli maddeler içeren yemlerde fitaz enziminin kullanılması ile ilgili birçok çalışma yürütülmektedir (Robinson ve ark. 1996, Mwachireya ve ark. 1999).

Tatlı sularda yaşayan su yosunu ve benzeri bitkiler için fosfor sınırlayıcı bir besin maddesidir. Gübre ile atılmış serbest fosforun akarsu ve göllere karışmasıyla bu suların fosfor düzeyini yükselir. Besin maddesine dönüştürülebilen organik maddelerin artması tatlı sulardaki su yosunu (alg) ve sucul bitki miktarının artmasına yol açar. Alg ve sucul bitkilerin hızlı gelişimi suda besin elementlerinin azalmasına ve bulanıklığın artmasına neden olduğu için üretkenlik belirli bir süre sonra azalır. Ayrıca su yüzeyinde oluşan alg tabakası güneş ışığının sucul bitkilere ulaşmasını engelleyerek sucul bitkilerin ölmesine yol açar. Artan alg üremesi ile ölmüş bitki materyali dibe çöker. Ortamdaki aerobik bakteriler oksijeni kullanarak ölmüş alg ve sucul bitkileri parçalayarak hızla çoğalırlar. Bunun sonucu olarak ortamın oksijen içeriği azalır. Sudaki oksijen tükendiğinde ortamda anaerobik bakteriler faaliyet göstermeye başlar ve anaerobik metabolizmanın ürünü olan NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, CH<sub>4</sub> gibi gazlar açığa çıkar. Sonuç olarak tatlı sularda canlı ölümleri artar, ekolojik denge bozulur ve çevre kirliliği sorunları ortaya çıkar (Sharpley ve ark. 1994, Sharpley 1999). Özellikle aşırı derecede büyüyen mavi-yeşil algler toksin ürettiklerinden insan ve hayvan sağlığı için önemli tehlike unsurlarıdır (Kotak ve ark. 1993). Tarımsal uygulamalarda gübre olarak kullanılan hayvan dışkıları fosfor kirliliği oluşmasında birincil kaynaklardır. Yaklaşık olarak nehirlerin %60'ı ve göllerin %50'sinin tarımsal uygulamalar tarafından olumsuz yönde etkilendiği bildirilmiştir (Daniel ve ark. 1998).

Kanatlılar rasyon proteininin ancak yaklaşık %40'undan yararlanabilmektedir (Lopez ve Leeson 1995). Bitkisel yem maddelerindeki fitat fosforunun yarıyışlığı yeme ilave edilen mikrobiyal fitaz ile artırılarak fosfor ve kalsiyum sindirilebilirliği artırıldığı gibi, yemin sindirilebilir enerji ve sindirilebilir protein oranlarında artış meydana geldiğinden yemden yararlanmada gelişme sağlanır ve dışkıyla atılan fosfor ve nitrojen oranlarında azalma meydana geldiğinden tavukçuluk yapılan yerlerde toprak ve su, dolayısıyla çevre kirliliği azalır. Bu bakımdan son yıllarda kanatlılar için rasyon formüle ederken yeme fitaz enzimi de katılarak yemden yararlanmada artış ve büyümede gelişme sağlanır. Ötrofikasyona etki yapan besin maddelerinden biri de nitrojendir. Bu sebeple yapılabilecek değişikliklerden ilk akla gelen, rasyon protein seviyesinin azaltılmasıdır. Rasyon protein içeriği azaltıldığında kanatlı dışkıları ile çevreye atılan nitrojen miktarının azaldığı bildirilmektedir (Szcurek ve Pisulewski 1996).

Fitik asitin olumsuz etkilerinin yanısıra, bazı olumlu etkilerinde olduğu bildirilmektedir. Fitik asidin tohum ve tanelerde fosfor deposu olma, enerji kaynağı olma, kation kaynağı olma, myo-inositol kaynağı olma, dormansinin başlatılması gibi fonksiyonları vardır (Reddy ve ark. 1989). Graf ve arkadaşları (1987) tarafından fitik asitin tohumlarda dormansi sırasında doğal bir antioksidan rolü üstlendiği görülmüştür. Ayrıca fitik asitin serbest demiri şelatlaması nedeniyle, güçlü bir doğal antioksidan olduğu belirlenmiştir (Laboure ve ark. 1993). Antioksidan özelliği nedeniyle fitat içeren besinlerin tüketimi, çeşitli kanserlere (kolon kanseri, göğüs kanseri, prostat kanseri, karaciğer kanseri, rabdomiyosarkom, pankreas kanseri, kan ve kemik iliği kanseri) karşı koruma sağlar ve antimitojenik, hipolipidemik, hipokolesterolemik özelliktedir. Ayrıca pıhtılaşmayı, diş çürümesini, böbrek taşı oluşumunu, HIV (HIV-1), obezite, diyabet, kronik kalp rahatsızlıkları ve damar sertleşmesinin bir türü olan ateroskerozu önleyici etkiye sahiptir. Parkinson ve Alzheimer hastalığının tedavisinde, hücrelerin doğal bağışıklık aktivitesinin artırılmasını ve ağır metal toksisitesini azaltılmasını sağlar. Bu sebeple besinlerdeki yüksek fitik asit içeriğinin göz önünde tutulması gereği ön plana çıkmaktadır (Vats ve Banerjee 2004, Tolay ve ark. 2005, Kumar ve ark. 2010). Son veriler, fitatın antikanser etkilerinin sinyal iletim yollarında, hücre döngüsü düzenleyici genlerinde, farklılaşmış genlerde, onkogenler ve tumor baskılayıcı genlerde önemli rol oynadığını düşündürmektedir (Shamsuddin 1999, Selle ve ark. 2000, Greiner ve ark. 1997).

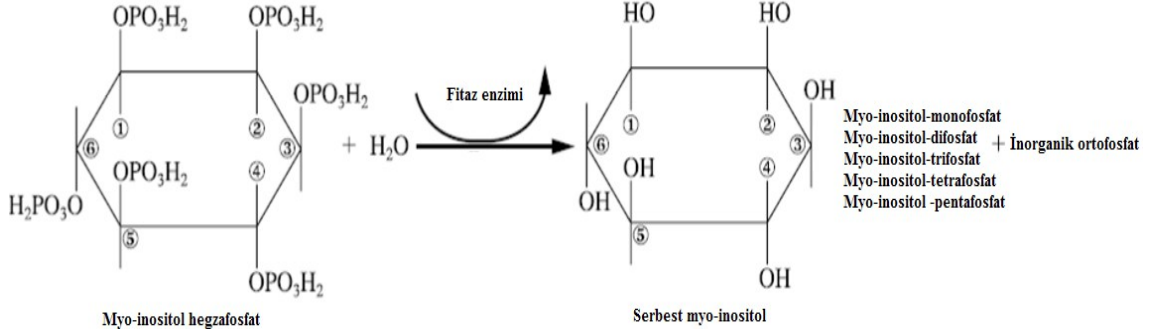
Myo-inositol fosfatlar hayvan hücrelerinde de bulunmuştur. Ancak hayvan hücrelerindeki bu bileşikler fosfor deposu ya da myo-inositol deposu olarak rol almazlar. Bunların temel rolü, hücre zarı yapısının sağlamlığı ve bütünlüğünü sağlamaktır. Bununla birlikte inositol fosfat türevleri biyoteknoloji ve ilaç sanayisinde bazı yararlı uygulamalarda kullanılmaktadırlar.

## **2.2.Fitaz Enzimi (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase)**

1907 yılında literatüre geçmiş olan fitaz enzimi kimyasal olarak myo-inositol-hegzafosfat fosfohidrolaz adıyla bilinmektedir. Fitazlar, fitatın inositol çekirdeğine bağlı olan bir veya daha fazla fosfat (ortofosfat) grubunu hidrolize ederek inorganik fosfat ve daha düşük fosforik esterler (indirgenmiş inositol fosfat esterler) açığa çıkarır (Harland

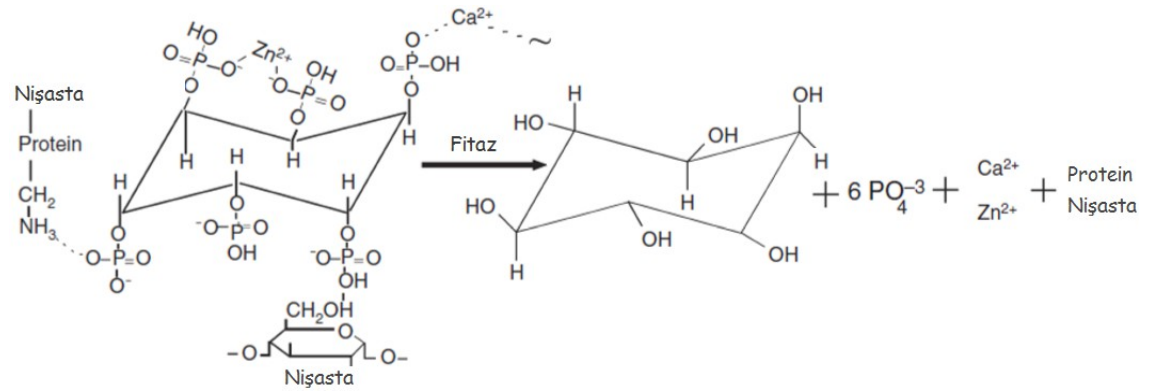


ve Morris 1995, Ahmad ve ark. 2000, Onyango ve ark. 2005) (Şekil 2.3). Fitazlar, fitik asidin fosfat gruplarının bir veya daha fazlasının hidroliz ederek inorganik fosfor ve inositol pentafosfattan inositol monofosfata doğru daha düşük yapıdaki fosforik esterlerin ortaya çıkmasını sağlarlar. Bu reaksiyon serbest myo-inositolün de açığa çıkmasını sağlar (Harland ve Morris 1995).



**Şekil 2.3.** Fitatın fitaz enzimi ile hidrolizi (Liu ve ark. 1998)

Fitat kalsiyum, demir, çinko gibi mineraller ile çözünmeyen kompleks oluşturma kapasitesine sahip olup, bu minerallerin biyolojik kullanımını azaltır. Fitatın fitazla hidrolizi, minerallerin serbest kalmasını sağlayarak canlıların mineralleri kullanma kapasitesini artırır (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** Fitatın fitata bağlı fosfat gruplarının hidrolizi ile mineral, protein ve nişastayı serbest bırakması

Bununla birlikte fitatların hem yüksek hemde düşük pH değerlerinde proteinlerin bazik amino grupları ile çözünmez kompleks oluşturduğu bildirilmiştir. Fitatın, pH değerine

bağlı olarak proteinler ile iki farklı kompleks oluşturduğu kabul edilmektedir (Cosgrove 1966, Anderson 1985). Asidik pH değerlerinde ikili protein-fitat kompleksleri ve nötrale yakın pH değerlerinde üçlü protein-mineral-fitat kompleksleri oluşturur. Bu durum, proteinlerin aktivitesini ve proteazların sindirimdeki fonksiyonlarını olumsuz etkiler (Kumar ve ark. 2010). Bu sebeple fitazın protein-fitat komplekslerinden proteinin serbest kalması, ikili ve üçlü protein fitat komplekslerinin oluşumunun engellenmesi, sindirim enzimleri üzerinde fitatın olumsuz etkisinin azaltılması, endojen aminoasit kayıpların azalmasına önemli katkılarının olduğu belirlenmiştir (Selle ve ark. 2000). Fitatların ayrıca karbohidrat ve lipitlerin biyolojik kullanılabilirliği üzerinde olumsuz etkiye sahiptir. Fitat, lipit ve lipit türevleri ile kompleks oluşturarak, lipofitin formunu oluşturarak lipidin enerji olarak kullanımına kısıtlama getirir (Laboure 1993, Vohra ve Satanarayana 2003).

Fitaz aktivitesini tanımlamak amacıyla FTU, FYT, PU ve U olmak üzere kullanılan dört kısaltma bulunmaktadır. Bir fitaz birimi (Fytase unit, FTU) ya da bir ünite fitaz aktivitesi 37°C'de pH 5.5'de 5,1 mmol Na-fitat solüsyonundan 1 dakikada 1 µmol inorganik fosfat (inorganik ortofosfat) açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanır (Kornegay 2001, Rao ve Reddy 2007, Selle ve ark. 2007a). FTU dışında fitaz aktivite birimi olarak PU ve U birimleri de kullanılmaktadır (Selle ve ark. 2007a).

### **2.3. Fitaz enziminin özellikleri**

Glikoprotein yapısında olan fitaz enzimlerinin molekül ağırlıkları 40-100 kDa arasında değişmektedir. Fitazlar genelde histidin asit fosfataz ailesine ait olup, fosforil transfer reaksiyonunda, fosfohistidin ara ürünlerini kullanan fosfotazların alt sınıfıdır (Van Etten 1982, Pasamontes ve ark. 1997a, Lei ve ark. 2007). Fitazlar fosfat ester bağlarını hidrolize eden fosfataz enzimlerdir (Angel ve ark. 2002). Fosfatazlar çeşitli fosfatlı organik moleküllerde monofosfoester bağlarının hidrolizini katalizleyen geniş bir enzim sınıfıdır. Ancak, bu enzimler fitik asitteki monofosfoester bağlarını hidrolizleyemez. Fitatı hidrolizleyen enzimlerin varlığının saptanmasıyla, fitik asidin monofosfoester bağlarını hidrolizleyen enzimlerin fitaz olarak adlandırılan özel bir sınıfa ait olduğu bildirilmiştir (Kerovuo 2000).

Fitaz enziminin optimum sıcaklığı genellikle 45-60°C 'dir (Çizelge 2.1). Yüksek optimal sıcaklıklar, domuz ve kanatlıların (37-40°C) mide sıcaklıklarında, fitazların tüm aktivitesini engellemekte; balıklarda ise fitazların performansını düşürmektedir (Lei ve Porres 2003). Fitaz enzimi saf formda 10 dakika müddetle 68°C sıcaklığa maruz bırakıldığında aktivitesinin %60'ını kaybetmektedir. Ayrıca bazı ticari preperatların termostabilitesi daha yüksek olup 30 dakika müddetle 90°C sıcaklığa maruz bırakıldığında enzim aktivitesinin sadece %15,8'ini kaybetmektedir (Newman 1991).

Fitaz enzimin optimum pH'sı 2.2-8.0 arasında değişir (Çizelge 2.1). Çoğu fitaz enziminin optimum pH aralığı 4.5-6.0'dır. Fakat *Bacillus* sp.'den elde edilen fitazlar nötr veya alkali optimum pH'ya sahiptir (Choi ve ark. 2001, Kim ve ark. 1998a). Mikrobiyal fitazların çoğu özellikle fungal kökenli fitazlar 4.5-5.6 arasında optimum pH'ya sahiptir. Bazı bakteri fitazları, özellikle *Bacillus* suşlarından elde edilen fitazlar 6.5-7.5 arasında optimum pH'ya sahiptir. Bitki tohumlarından elde edilen fitaz enzimlerinin optimum pH'sı 4.0-7.5 aralığında iken, genelde optimum pH'ları 4.0-5.6 arasındadır (Dvorakova 1998).

Fitat-mineral bileşiklerinin çözünürlüğü yüksek pH'da azalmakta ve böylece fitaz etkinliğinin düşmesine yol açmaktadır (Maenz ve ark. 1999). Mide ile bağırsakların pH düzeyleri karşılaştırıldığında, midedeki ortamın asidik yapıda olması nedeniyle bitkisel veya mikrobiyel fitazların etkinliğinin midede gerçekleştiği düşünülmektedir (Selle ve Ravindran 2007).

Enzimatik tepkimenin oranı sindirim kanalındaki içeriğin fiziksel durumundan etkilenmektedir. Fitat-mineral bileşiklerinde enzim etkinliğinin gerçekleşebilmesi için içeriğin yüksek düzeyde su ile uzun süre bulamaç halinde karışması gerekmektedir. Özellikle ince ve kalın bağırsaktaki içeriğin fiziksel durumu sindirim kanalındaki fitaz etkinliğini sınırlayıcı özelliğe sahiptir (Maenz 2001). Örneğin kanatlılarda sindirim kanalı boyunca içeriğin pH'sının artması sonucu fitat molekülü iyonize olmakta ve  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$  gibi divalent metal kanyonlarla bileşik oluşturmaya hazır hale gelmektedir. Yüksek pH sonuç olarak fitat-mineral bileşiklerinin çözünürlüğünü azaltmakta ve fitaz etkinliğinin düşmesine yol açmaktadır (Maenz ve ark. 1999).

**Çizelge 2.1.** İzole edilen bazı fitazların özellikleri

Organizma	Optimum pH	Optimum T°C	Aktivite (U/mg)	Moleküler ağırlık (kDa)	Kaynaklar
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6.5	40	26,5	72	Wyss ve ark. 1999a,b
<i>Aspergillus niger</i> (Natuphos)	5.5	-	102	66,4	Wyss ve ark. 1999a,b
<i>Aspergillus terreus</i> (CBS)	5.5	-	196	82	Wyss ve ark. 1999a,b
<i>Bacillus subtilis</i> (natto)	6.5	60	8,5	36-38	Shimizu 1992
<i>Bacillus subtilis</i> 168	6	55	-	44,6	-
<i>Bacillus subtilis</i> VTTE-68013	7	55	-	43	Kerovuo ve ark. 1998
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	7.0-8.0	70	20	-	Greiner ve Konietzny 2006, Kerovuo 2000
<i>Bacillus amyloliqueficiens</i> DS11	-	70	-	44	Kim ve ark. 1998a
<i>Bacillus</i> sp. KHU-10	6.0-9.5	60	-	44	Choi ve ark. 2001
<i>Bacillus licheniformis</i>	6	65	-	47	-
<i>Emericella nidulans</i>	6.5	-	28,6	66	Wyss ve ark. 1999a,b
<i>Escherichia coli</i>	4.5	55	8000	42	Greiner ve ark. 1993
<i>Escherichia coli</i> (mutant)	4.5	-	811	47	Wyss ve ark. 1999a,b
<i>Pseudomonas syringae</i>	5.5	40	769	-	Greiner ve Konietzny 2006, Kerovuo 2000
<i>Klebsiella aerogenes</i>	5.2	-	-	10-13	Tarnbe ve ark. 1994
<i>Klebsiella terrigena</i>	5	58	205	40	Greiner ve ark. 1997
<i>Schwanniomyces castellii</i>	4.4	77	552	125+70x3	Segueilha ve ark. 1992
<i>Talaromyces thermophilus</i>	-	-	41,8	128	Wyss ve ark. 1999a,b
<i>Rhizopus oligosporus</i>	4.5	55	9,47	-	Sutardi ve Buckle 1988
<i>Penicillium simplicissimum</i>	4.0	55	3	-	Greiner ve Konietzny 2006, Kerovuo 2000
<i>Cladosporium</i>	3.5	40	909	-	Greiner ve Konietzny 2006, Kerovuo 2000
<i>Paramecium tetraurelia</i>	7	37	10	6x40	Freund ve ark. 1992
İnsan (intestinal)	7.4	-	0,2	-	Bitar ve Reinhold 1972
Fare (intestinal)	7.5	60	5,7	70+90	Yang ve ark. 1991a,b
<i>Typha latifolia</i> (polen)	8	-	0,11	-	Hara ve ark. 1985
<i>Zea mays</i>	4.8	55	2,3	2x38	Laboure ve ark. 1993

Fitaz enzimi toz, granül (ısıya dayanıklı kaplama) veya sıvı formda üretilmektedir. Enzimin formu ve enzimin verilmiş şekli enzim aktivitesini ve bu aktivitenin ısıl işlemler sonucunda korunma yeteneğini büyük ölçüde etkilemektedir (Haefner ve ark. 2005).

#### **2.4. Fitaz enziminin sınıflandırılması**

Fitazların 3 farklı şekilde sınıflandırılırlar.

##### **2.4.1. Fitaz enziminin optimum pH'ya göre sınıflandırılması**

Fitazlar optimum pH değerlerine göre 2 ana gruba ayrılmaktadır. Histidin asit fosfotazlar; pH 5.0 değeri civarında optimum aktivite gösterirken, alkalın fitazlar; pH 8.0'e yakın değerlerde optimum aktivite göstermektedir (Baruah ve ark. 2007). *Bacillus* cinsi haricindeki birçok bakteri, fungus ve bitki fitazları histidin asit fosfataz sınıfına aittir. Histidin asit fosfataz sınıfı, gıda endüstrisinde alkali fitazdan daha çok araştırılmıştır (Kumar ve ark. 2010). Çünkü histidin asit fosfataz sınıfındaki enzimler, alkalın fosfataz sınıfındaki enzimlerden daha geniş substrat spesifikliğine sahiptir (Selle ve ark. 2007b, Van Etten ve ark. 1991). Histidin asit fosfataz sınıfı fitazlar, metal içermeyen fitatın hidrolizini gerçekleştirir ve son ürün olarak myo-inositol monofosfatı oluşturur. *Escherichia coli* (Greiner ve ark. 1993), *Klebsiella terrigena* (Greiner ve ark. 1997), *Aspergillus niger* (Skowronski 1978), *Aspergillus fumigatus* (Ullah ve ark. 2000), konola tohumları (Houde ve ark. 1990) ve buğdaydan (Konietzny ve ark. 1995) elde edilen histidin asit fosfatazların optimum pH'sı 4.5-5.5 aralığında olduğu görülmüştür. Alkalın fosfataz enzimleri, kalsiyum fitata karşı oldukça spesifiktir ve hidroliz sonucu son ürün olarak myo-inositol trifosfatları oluşturduğu bildirilmiştir (Oh ve ark. 2004). *Bacillus* (Powar ve Jagannathan 1982, Shimizu 1992, Kerovuo ve ark. 1998, Kim ve ark. 1998a, Choi ve ark. 2001, Idriss ve ark. 2002) ve bazı bitki tohumları, *Typha latifolia* L. poleni (Hara ve ark. 1985) ve *Lilium longiflorum* poleninden (Scott ve Loewus 1986) elde edilen alkalın fitaz enzimleri 6.5-8.0 aralığında optimum pH'ya sahip olduğu görülmüştür.

##### **2.4.2. Fitaz enziminin katalitik merkeze göre sınıflandırılması**

Evrimsel süreçte fitaz enzimi çeşitli substratları katalizlemek için yapısal olarak değişime uğramıştır. Dolayısıyla enzimlerde reaksiyonun gerçekleştirildiği bölge olan

katalitik merkezde farklılaşmıştır. Fitaz enzimleri katalitik merkezlerine göre 4 ayrı sınıfa ayrılır. Bunlar; histidin asit fosfataz (HAP),  $\beta$ -pervane fitaz ( $\beta$ -propellar fitaz, BPPHy), sistidin fosfataz (CP) ve mor asit fosfataz (purple asit fosfataz, PAP)'dır. Bunların herbiri, kendine özgü yapısal özellikler ve farklı katalitik mekanizmalara sahip olup, çeşitli ortamlarda fitik asidi substrat olarak kullanılmaktadırlar (Lei ve ark. 2007).

#### **2.4.2.1. Histidin asit fosfotaz (HAP)**

Hem ökaryotik hem de prokaryotiklerde histidin asit fitazlar HAPHy'ler olarak bilinir. Çünkü asit fosfotazların geniş bir grubu olan HAP'lar, türüne göre bir dizi farklı substratı hidrolizleyebilirken, bütün HAP'ların etkin bir şekilde fitatı hidrolize etmediklerinin belirlenmiştir. Bu sebeple Oh ve ark. (2004) fitatı etkin bir şekilde hidrolizleyebilen HAP'ları belirtmek için, histidin asit fitaz (HAPHy) terimini önermişlerdir. En iyi karakterize edilen prokaryotik HAPHy *E. coli* fitazıdır (Greiner ve ark. 1993). Bu enzimin yapısının 3 boyutlu moleküler modeli mevcuttur (Lim ve ark. 2000). HAPHy'ler ökaryotlarda birçok fungus izolatlarından ve mısırdan klonlanmıştır (Mullaney ve ark. 2000). Prokaryot ve ökaryotlardaki HAPHy'lerin aktif bölgesi substratın bağlanmasını kolaylaştırmak için, asidik pH'larda genellikle pozitif yüklüdür. Çünkü oldukça negatif yüklü olan fitatın katalizini sağlayacak fitaz enziminin aktif bölgesinin katalitik mekanizma için substratın bu özelliğine uyum sağlayabilmesi gereklidir.

#### **2.4.2.2. $\beta$ -Propeller fitazı ( $\beta$ - BPPHy)**

$\beta$ -pervane fitazı bilinen diğer fosfatazlar ile benzerlik sergilemediği için yeni bir sınıfı temsil etmektedir (Kim ve ark. 1998a, Kerovuo ve ark. 1998, Ha ve ark. 2000). Moleküler yapısının belirlenip aydınlatılmasından sonra, yapısında bulunan  $\beta$ -tabakalar ve altı kanatlı bir pervaneye benzemesinden dolayı bu ismi almıştır (Ha ve ark. 2000, Shin ve ark. 2001). İlk olarak *Bacillus* türlerinde tespit edilen BPPHy'ler ile ilgili olarak yapılan bütün çalışmalarda bu enzimlerin hem katalitik faaliyetleri hemde termostabilitesi için kalsiyuma ihtiyaç duyduğu görülmüştür. Çünkü kalsiyum fitata bağlanarak elektrostatik etkileri meydana getirir ve böylece fitat biyokatalitik dönüşümünün meydana gelmesi için katalitik bölgeye bağlanır. Kinetik çalışmalar pH 7.0-8.0 arasındaki değerlerde gerçekleştirilmiş ve BPPHy'lerin bu pH aralıklarında

kalsiyum fitatı hidrolizleyebildiği saptanmıştır (Oh ve ark. 2001). HAPhy'nin aksine, oldukça çalışılan bir enzim sınıfıdır (Ha ve ark. 2000).

#### 2.4.2.3. Sistidin fosfataz (CP)

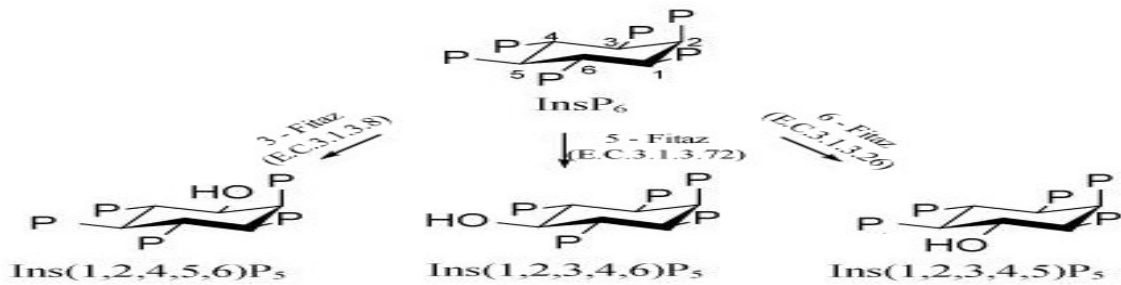
Bu enzim anaerobik rumen bakterisi olan *Selenomonas ruminantium*'da saptanmıştır. Fitik asidin rumendeki hidrolizini bu sınıftaki enzimler sağlar. Monomerik olan bu enzimler 46 kDa molekül ağırlığa sahip olmakla birlikte pH 4.0-5.5 ve 50-55°C sıcaklıkta aktiftirler. Bu enzimin yapısı ne HAPhy'a ne de BPPHy'e benzemektedir (Lei ve ark. 2007).

#### 2.4.2.4. Mor asit fosfataz (Purple asit fosfataz, PAP)

Bitki, hayvan, fungus ve bakterilerde de saptanmış olsa da çimlenmekte olan soya fasülyesi kotiledonlarından izole edilmiştir. Bitkilerde küçük monomerik proteinler (~35 kDa) ve büyük homodimerik proteinler (~55 kDa) olarak iki sınıfa ayrılmıştır. Diğer fitazlarla karşılaştırıldığında fitatı hidrolizleme yeteneği düşüktür (Lei ve ark. 2007).

#### 2.4.3. Fitaz enziminin stereospesifikliğine göre sınıflandırılması

IUPAC-IUBMB (The International Union of Pure and Applied Chemistry-The International Union of Biochemistry and Molecular Biology) tarafından enzimler 6 ana sınıfa ayrılmış ve fitazlar 3. sınıfta yer alan hidrolazlara dahil edilmiştir. IUPAC-IUBMB fitazları fitik asidin defosforilasyonunun başladığı bölgeye (myo-inositol halkasındaki karbonun pozisyonu) ve alt inositol fosfatların farklı izomerlerini üretmelerine bağlı olarak 3 ana gruba ayırmışlardır (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5.** Fitik asidin defosforilasyonunun başladığı konuma göre fitaz çeşitleri (Bohn ve ark. 2008 ve Dvorakova 1998'dan değiştirilerek alınmıştır.)

3-fitazlar (E.C 3.1.3.8 veya myo-inositol hegzafosfat 3-fosfohidrolaz), mikrobiyal fitazlar olarak da adlandırılırlar ve myo-inositol hegzafosfat halkasındaki C3 pozisyonundaki fosfor kalıntısını öncelikli olarak hidrolizleyerek, D-myo-inositol-1,2,4,5,6-pentafosfat ve ortofosfat (inorganik fosfat) oluşturur (Selle ve Ravindran 2007). Özellikle mantar kökenli olanlar, inositol halkasındaki C1 veya C3 karbondaki bulunan fosfat grubunu parçalamaktadır.

6-fitazlar (E.C 3.1.3.26 veya myo-inositol hegzafosfat 6-fosfohidrolaz), bitkisel fitazlar olarak da adlandırılırlar ve myo-inositol hegzafosfat halkasındaki C6 pozisyonundaki fosfatı öncelikli olarak hidrolizler ve hidroliz sonucunda D-myo-inositol-1,2,3,4,5-pentafosfat ve ortofosfat (inorganik fosfat) oluşur (Selle ve Ravindran 2007).

5-fitazlar (E.C 3.1.3.72 veya myo-inositol hegzafosfat 5-fosfohidrolaz) zambak poleninden izole edilmişlerdir ve C5 karbondaki fosfatı hidroliz ederler (Bohn ve ark. 2008). 5-fitazın myo-inositol hegzafosfat halkasındaki C5 pozisyonundaki fosfatı hidrolizi sonucu olarak L-myo-inositol 1,2,3,4,6-pentafosfat ve ortofosfat (inorganik fosfat) oluşur.

Genellikle 3-fitazlar mikroorganizmalarda, 6-fitazlar ise bitkilerde görülmektedir (Konietzny ve Greiner 2004). Ancak bu genel kuralın dışında da üretim görülmüştür. Son zamanlarda *Aspergillus niger* ve değişik soya fasulyesinin tohumlarından izole edilen fitazda 3-fitaz aktivitesi; *Peniophora lycii* ve *Escherichia coli*'den izole edilen fitazda ise 6-fitaz aktivitesi görülmüştür (Sandberg ve Andlid 2002, Selle ve ark. 2007b, Kumar ve ark. 2010).

Etkinlik bakımından mikrobiyal fitazın pH 2.0-6.0 aralığında, bitkisel kökenli fitazın ise pH 5.0 civarında optimum olduğu ileri sürülmektedir (Wodzinski ve Ullah 1996). Genelde 3-fitazlar fitat molekülünü tam olarak defosforile edemezler fakat 6-fitazlar bu işlemi tam olarak gerçekleştirebilmektedirler (Wodzinski ve Ullah 1996). Fitatın fitaz enzimi ile hidrolizi sırasında fosfat grupları basamaklar halinde ayrılmakta ve bağırsaklardan emilime hazır hale gelmektedirler (Pointillart 1994).



## 2.5. Fitaz enzimi kaynakları

Fitaz aktivitesinin ilk olarak, pirinç kepeğinde (Suzuki ve ark. 1907) ve buzağuların kanında (McCollum ve Hart 1908) bulunduğu bildirilmiştir. Günümüzde fitaz enziminin elde edilmesinde kullanılan en önemli kaynak *Aspergillus niger* adlı mantardır. Ancak fitaz enzimi fasülye, buğday germi, kolza tohumu, mısır, bakteri (*Pseudomonas* sp. ve *Bacillus subtilis*) ve diğer funguslardan da (*Saccharomyces cerevisiae* ve *Aspergillus*) izole edilebilmektedir (Newman 1991).

Hayvanlarda fitatın hidrolizi 4 farklı kaynaktan gelen fitaz enziminin aktivitesi ile sağlanabilir (Angel ve ark. 2005). Bunlar; yem hammaddelerinde doğal olarak bulunan bitkisel fitaz, sindirim kanallarındaki mikroorganizmalar tarafından endojen olarak üretilen mikrobiyal fitaz, bağırsak mukozası hücrelerince üretilip incebağırsak membranına bağlı olan intestinal fitaz ve yeme dışarıdan ekzojen olarak ilave edilen mikrobiyal fitaz enzimlerinin aktiviteleridir. Genel olarak bitki ve mikrobiyal fitaz aktivitesinin aksine, insan ve hayvanlarda bulunan endojen fitazın aktivitesinin daha önemsiz olduğu saptanmıştır (Weremko ve ark. 1997, Kumar ve ark. 2010).

Kümes hayvanlarının sindirim sisteminde fitatın hidrolizi üç farklı kaynaktan gelen fitaz enzimi ile olmaktadır. Bu kaynaklar bazı yemlerin bünyesinde tabii olarak bulunan fitaz, sindirim kanallarındaki mikroorganizmalar tarafından üretilen fitaz ve ince bağırsak mukoza hücreleri tarafından üretilen vücut orijinli fitazdır. Fakat özellikle gelişmekte olan kanatlılarda incebağırsak bağırsak mukozası tarafından üretilen fitaz miktarının ihmal edilebilecek ya da önemsiz seviyede olduğu bildirilmiştir (Swick ve Ivey 1992).

### 2.5.1. Mikrobiyal fitazlar

Bakteriyel fitazlar (PhyC) glikolizasyona uğramayan histidin asit fosfataz ya da  $\beta$ -propeller yapılı alkali fitazlarken (Lei ve ark. 2007) fungus ve mayalardan izole edilen fitazların çoğu glikolizasyona uğramış histidin asit fosfatazlardır. Glikolizasyon farkından dolayı bakteriyel fitazların ortalama moleküler ağırlığı (40-55 kDa) fungal fitazların moleküler ağırlığından (80-120 kDa) daha küçüktür (Van Hartingsveldt ve ark. 1993, Kerovu ve ark. 1998, Han ve Lei 1999, Golovan ve ark. 2000, Rodriguez ve ark. 2000b, Ullah ve ark. 2000, Choi ve ark. 2001).

Fungal fitazların öngörülen moleküler ağırlıkları genelde 50 kDa iken, deneysel sonuçlarda elde edilen verilerin 65-70 kDa arasında olması, fungal fitazların glikozillenmiş olduğu göstermektedir (Choi ve ark. 2001, Golovan ve ark. 2000).

Shieh ve Ware (1998) fitaz üretimi için topraktan 2 000'den fazla mikroorganizma izole etmişlerdir. İzole edilen fitaz üreticilerinin çoğunun sadece intraselüler fitaz ürettiği gözlenmiştir. Az sayıda görülen ekstraselüler fitaz üreticilerinin çoğunun da *Aspergillus* cinsine ait organizmalar olduğu ve az bir kısmının da *Penicillium* ve *Mucor* cinsine ait organizmalar olduğunu gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak toprak fungusu olan *Aspergillus niger* türlerinin en iyi ekstraselüler fitaz üreticileri olduğu görülmüştür (Howson ve Davis 1983, Volfava ve ark. 1994). Van Hartingsveldt ve ark. (1993) *Aspergillus niger* var. *ficuum*'da en uygun pH'sı 5.0 olan tek enzim etkinliğinin var olduğunu bildirmişlerdir. Fakat sonra yapılan bir araştırma ile belirlenen ikincil fitaz için en uygun pH'nın 2.5 olduğu, pH 5.0'de etkinlik göstermediği ortaya konulmuştur (Ullah ve Phillippy 1994). Bu sebeple pH 5.0'de etkinlik gösteren enzim PhyA, pH 2.5'te etkinlik gösteren enzim ise PhyB olarak adlandırılmıştır (Maenz 2001, Angel ve ark. 2002).

Bakteriyel fitazların enzim aktiviteleri 200-388 U/mL<sup>-1</sup> arasında olduğu bildirilmiştir (Quan ve ark. 2001). Bununla birlikte bakteriyel fitazların fungal fitazlara nazaran sindirim sisteminde karşılaşılan proteolitik parçalanmalara karşı daha fazla dirençli oldukları bildirilmiştir (Igbasan ve ark. 2000). Bakteriyel fitazların substrat spesifitesi, proteolizize karşı direnç göstermesi ve katalitik aktivitesi gibi özelliklerinden dolayı fungal fitazlara alternatif oluşturmaktadır (Konietzyn ve Greiner 2004).

İzole edilen edilen çoğu fitaz enziminin optimum pH aralığı 4.5-6.0'dır. Fakat *Bacillus* sp.'den elde edilen fitazlar nötr veya alkali optimum pH'ya sahiptir (Choi ve ark. 2001, Kim ve ark. 1998a). Bunun yanında çoğu *Bacillus* sp. fitazının optimum sıcaklığının 50°C olduğu bildirilmiştir (Çizelge 2.2). Mikrobiyel kaynaklı termostabil fitaz etkinliği, *Aspergillus niger* var. *ficuum* (Ullah ve Gibson 1987), *Aspergillus fumigatus* (Pasamontes ve ark. 1997a) ve *Bacillus* sp. DS11 (Kim ve ark. 1998a) türlerinde tespit edilmiştir.

**Çizelge 2.2.** Mikrobiyal fitazların bazı özellikleri (Greiner ve Konietzny 2006, Kerovuo 2000)

Fitaz Kaynağı	Optimum pH	Optimum sıcaklık (°C)	Spesifik aktivite(U/mg) (37°C)
<i>Aspergillus niger</i>	2.2, 5.0-5.5	55-58	50-103
<i>Aspergillus terreus</i>	5.0-5.5	70	142-196
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5.0-6.0	60	23-28
<i>Aspergillus oryzae</i>	5.5	50	11
<i>Aspergillus caespitosus</i>	5.5	80	-
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	6.0	65	110
<i>Penicillium simplicissimum</i>	4.0	55	3
<i>Penicillium lycii</i>	5.5	58	1080
<i>Rhizopus oligosporus</i>	4.5	55	9.47
<i>Cladosporium</i>	3.5	40	909
<i>Candida krusei</i>	4.6	40	1210
<i>Escherichia coli</i>	4.5	55-60	811-1800
<i>Klebsiella terrigena</i>	5.0	58	205
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5.0,5.5	50,60	224,297
<i>Klebsiella aerogenes</i>	4.5,5.2	68	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	4.5	60	23
<i>Pseudomonas syringae</i>	5.5	40	769
<i>Citrobacter braaki</i>	4.0	50	3457
<i>Bacillus subtilis</i>	6.5-7.5	55-60	9-15
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	7.0-8.0	70	20

Genel olarak mantarlardan üretilen fitazlar ekstraselüler olmasına rağmen bakteriler tarafından üretilen fitazlar çoğunlukla hücre ile ilişkilidir. *Bacillus* (Powar ve Jagannathan 1982, Shimizu 1992, Kerovuo ve ark. 1998, Kim ve ark. 1998a, Choi ve ark. 2001) ve *Enterobacter* (Yoon ve ark. 1996) cinsleri ekstraselüler fitaz aktivitesi göstermektedirler.

*A. niger*, *E. coli*, *Bacillus* sp. gibi bazı mikroorganizmalardan elde edilen fitaz, fitik asite karşı yüksek affiniteye sahiptir bununla birlikte bitki fitazları ve *Aspergillus fumigatus* fitazı daha geniş substrat spesifikliğine (Wyss ve ark. 1999a) ve fitik asidi daha alt inositol fosfatlara indirgeme yeteneğine sahipken, *Bacillus* sp. fitazları fitik asit molekülünü inositol trifosfata indirgemektedirler (Kerovuo ve ark. 2000).

İlk ticari fitaz enzimi olan Natuphos, ilk olarak bir fungus olan *Aspergillus niger*'den izole edilmiş ve 1991'de piyasaya çıkmıştır. Bu enzim 80 kDa moleküler ağırlığa sahip olup, 1,4 kb DNA fragmenti tarafından kodlanmış *Aspergillus niger* PhyA' dır (Van Hartingsveldt ve ark. 1993, Han ve Lei 1999). *Aspergillus niger* haricinde ticari amaçla yaygın olarak kullanılan diğer fitazlar *A.ficuum* ve *A.fumigatus*'dan elde edilmiştir (Wyss ve ark. 1999a).

Son çalışmalarda ekşi mayadan izole edilen bazı laktik asit bakterilerinin önemli ölçüde fitat indirgeme kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. *Lactobacillus sanfranciscensis* ekşi mayadan izole edilen farklı laktik asit bakteri suşları arasındaki en iyi fitaz üreticisi olarak tanımlanmıştır.

Bazı deniz mayalarının da fitaz ürettikleri rapor edilmiştir (Hirimuthugoda ve ark. 2006). Bu denizel mayalar henüz tam olarak karakterize edilmemiştir fakat filogenetik olarak *Hanseniaspora uvorum*, *Yarrowia lipolytica*, *Kadamaea ohmeri*, *Candida tropicalis* ve *C. Carpophila* ile ilişkilendirilmişlerdir. Alkali fitaz üreten bu deniz mayalarının deniz fosfor kirliliği biyoremediasyonunda kullanılabilecekleri öngörülmektedir. Bununla birlikte son zamanlarda Quan ve ark. (2004) hava ile taşınan *Cladosporium* sp. FP-1 fungusundan fitaz enzimi izole etmiştir.

### 2.5.2. Bitkisel fitazlar

Fitaz enzimi bitkiler alemi tarafından yaygın olarak üretilmektedir bununla birlikte pirinç (Hayakawa ve ark. 1989), kolza tohumu (Houde ve ark. 1990), soya fasulyesi (Hamada 1996), mısır (Maugenest ve ark. 1999), buğday (Nakano ve ark. 1999) ve çavdardan (Weremko ve ark. 1997) izole edilip tanımlanmıştır. Bu bitkilerin yanında beyaz hardal, patates, marul, ıspanak, turp, çimen ve zambak poleninden de fitaz elde edilmiştir (Dvorakova 1998). Ayrıca avokado ve taze soğan yaprakları gibi oldukça tüketilen meyve ve sebzelerde de fitaz aktivitesi tespit edilmiştir (Phillippy ve Wyatt 2001). Buğday, çavdar, tritikale (buğday×çavdar melezi) ve arpada yüksek düzeylerde fitaz enzimi bulunmaktadır (Eeckhout ve De Paepe 1994, Viveros ve ark. 2000, Selle ve Ravindran 2007). Örneğin; buğday, kavuzlu buğday, çavdar, tritikale ve arpa gibi tahıllardaki fitazın aktivitesi 5 000 U/kg'den daha yüksek değerlere ulaşabilir. Fakat mısır, pamuk tohumu ve soya fasulyesi küspesinde ise fitaz etkinliği düşük düzeydedir (Alçiçek ve ark. 1995, Pointillart 1994, Eeckhout ve De Paepe 1994).

Buğday, acı bakla, yulaf ve arpadan izole edilen bitki fitazlarının moleküler ağırlıkları 47-76 kDa aralığındadır (Maugenest ve ark. 1997, Greiner ve ark. 1999, Greiner ve ark. 2000a, Greiner ve ark. 2000b, Greiner 2002). Bitkisel fitaz etkinliği için en uygun sıcaklık 47-55°C (Alçiçek ve ark. 1995, Pointillart 1994) iken genellikle 70°C üzerinde inaktif hale gelmektedirler. Bitki tohumlarından elde edilen fitaz enzimlerinin optimum pH'sı, 4.0-7.5 aralığında değişirken, genelde optimum pH'ları 4.0-5.6 arasındadır (Dvorakova 1998).

Bitkisel fitazlar optimum pH'sına göre asidik ve alkali olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Asidik bitki fitazları, pH 5.0, alkali fitazlar ise, pH 8.0 civarında optimum aktiviteye sahiptirler. Asidik fitazlara soya fasulyesi tohum fitazı (Gibson ve Ullah 1988), buğday kepeğinin F1 fitazı (Lim ve Tate 1973), *Lilium longiflorum* polen fitazı, (Baldi ve ark. 1988) ve *Petunia hybrida* polen (Jackson ve Linkens 1982) fitazları örnek verilebilir. Alkali fitazlar *Lilium longiflorum* (Baldi ve ark. 1988) ve *Typha latifolia* (Hara ve ark. 1985) bitkilerinin farklı iki polen türünde tanımlanmıştır. Alkali fitazlar, asidik fitazdan farklı olarak, fitata oldukça spesifiktir ve üç ya da daha az ester grupları içeren myo-inositol fosfatları katalizleyemediği bildirilmiştir (Baldi ve ark. 1988).

Bitkisel kaynaklı fitazlar, yemlerin işlenmesi esnasında uygulanan sıcaklık (Wodzinski ve Ullah 1996), sindirim kanalının üst kısmında bulunan düşük pH ve mideden salgılanan pepsin enzimi etkisi ile inhibe olmaktadır (Phillippy 1999). Peletleme sıcaklığının 75°C'nin üzerine olması fitaz etkinliğini düşürmektedir (Hughes ve Soares 1998). Fakat bu durum enzimin formu ve tipine bağlı olarak değişmektedir (Maenz 2001).

### **2.5.3. Hayvansal fitazlar**

Fitaz aktivitesi çeşitli hayvan türlerinin dokularında tespit edilmesine (Bitar ve Reinhold 1972) rağmen hayvansal kaynaklı fitazların hiçbirinin moleküler karakterizasyonu tamamlanmamıştır. Çünkü fitat fosforunun kullanılabilirliğini arttırmak için, düşük maliyetli ekzojen fitazın ilave edilmesi hayvansal fitazın araştırılmasını gölgede bırakmıştır.

İnsan ve hayvanların kalınbağırsaklarındaki mikroflora ve ince barsak mukozası tarafından üretilen endojen fitaz enzimleri vardır. Genel olarak bitki ve mikrobiyal fitazların aksine insan ve hayvanlardaki bu endojenöz fitazın aktivitesi önemsizdir (Weremko ve ark. 1997). Fakat insanlar da dahil olmak üzere çoğu hayvan fosfor açısından yetersiz beslendiğinde, barsak fitaz ve fosfataz aktivitelerini arttırmak için uyum sağlama kapasitesine sahiptirler (Zhang ve ark. 2005).

#### **2.5.3.1. Sindirim kanalı mikroflorası tarafından sentezlenen fitazlar**

Sindirim kanalı mikroflorasını oluşturan mikroorganizmaların fitat fosforundan yararlanma konusunda yetenekli oldukları bildirilmiştir. Kalın bağırsak veya rumende bulunan fitaz aktivitesi esasen mikrobiyal kökenlidir (Wise ve Gilbert 1982, Yanke ve ark. 1998). Ruminantlar, rumendeki mikrobiyal flora tarafından üretilen fitaz enzimi ile fitatı parçalayabilmektedirler (Yanke ve ark. 1998). Fitatın parçalanması ile açığa çıkan fosfordan hem mikrobiyal flora hem de konak yararlanır (Kerovuo 2000, Aşan 2007). Kanatlılardaki sindirim kanalı mikroflorası tarafından sentezlenen fitazın, fitat fosforundan yararlanımına etkisi üzerine çok fazla çalışma yapılmamıştır. Fakat araştırmacılar bu etkinin minimal düzeyde olduğunu belirtmektedirler (Angel ve ark. 2002). Bu fitazların daha çok domuzlarda bulunduğu bildirilmiştir. Sandberg ve ark.

(1993), tarafından domuzların kalın barsağındaki mikrofloral fitaz tarafından fitatın hidroliz edildiği saptanmıştır. Ayrıca insanların kalın barsağında bulunan çoğu bakterinin de fitatın hidrolizini sağlayabildiği saptanmıştır (Walker ve ark. 1948)

### **2.5.3.2. İntestinal fitazlar**

Barsak mukozal fitaz aktivitesi, başlangıç bölgesi jejunum olmak üzere Hu ve ark. (1996), tarafından domuzlarda tanımlanmıştır. İnsan üzerine yapılan çalışmalar ince barsakta çok düşük fitaz aktivitesinin olduğunu göstermektedir dolayısıyla ince barsağın fitatı indirgemek için sınırlı kabiliyeti vardır (Iqbal ve ark. 1994). İnce bağırsak yüzey epitelinin mikrovillus membranı üzerinde bulunan intestinal fitazın hidrolitik etkinliği bitkisel ve mikrobiyel fitazlardan farklı şekilde gerçekleşmektedir. İntestinal fitaz enzimi, membranın üzerini saran sıvı katman içerisinde bağırsak mikroflorası ile birlikte hafif asidik ortamda (pH 6.0) bulunmaktadır (Lucas 1983). Sıvı katmanın pH'sı intestinal fitaz etkinliği için optimum pH olup aynı zamanda fitaza dirençli fitat-mineral bileşikler oluşması için gerekli pH düzeyinin de altındadır. İntestinal fitazın etkinliği, sıvı katman içerisindeki enzimin düzeyine ve substrat üzerinde bulunan bağlanma noktalarına fitaz enziminin erişebilirliğine bağlıdır (Maenz 2001). Hayvansal fitazlar nötral ve alkali değerler arasında optimum pH'ya sahipken, kümes hayvanlarının bağırsak epitel hücrelerinde optimum pH'nın asidik değerlerde (pH 5.5-6.0) olduğu gösterilmiştir (Ellestad ve ark. 2002). Bazı kanatlı hayvanlarda mukozal fitaz etkinliği en yüksek düzeyde duodenumda bulunmaktadır ve ince bağırsağın daha alt kısımlarına doğru enzim etkinliği baskılanarak azalmaktadır (Maenz ve Classen 1998).

## **2.6. Fitazların kullanım alanları**

### **2.6.1. Yem katkı maddesi olarak kullanım**

Fosfor; kanın önemli bir bileşeni olup vücutta gerçekleşen hemen hemen her metabolik reaksiyonda görev yapar. Özellikle kemik ve iskelet dokusunun yapımı, gelişimi ve yapısal bütünlüğünün korunmasında görev alır. Ayrıca hücrelerin büyümesi ve farklılaşması için gerekli olan nükleik asitlerin yapısında da yer alır. Bu açıdan hayvanlarda üreme fonksiyonlarında yerine getirilmesinde önemlidir. Fosfor ayrıca vücudun osmotik basıncın ayarlanmasında, asit-baz dengesinin korunmasında,

karbohidrat, yağ ve aminoasitlerin metabolizmasında önemlidir. Birçok enzimin yapısına katılan fosfor özellikle enerji metabolizmasında önemli olan birçok enzimin yapısına katılması açısından öneme sahiptir (Nelson 1967). Dolayısı ile fosfor enerjinin taşınması, depolanması ve serbest hale geçirilmesinde de hayati öneme sahiptir (Anonim 1980, Scott ve ark. 1982, Yazgan 1990).

Fitaz enzimini ruminantların rumenlerinde bulunan bakteriler ve bağırsaklarında bulunan anaerobik funguslar üretebilir. Bu sebeple geniş getiren hayvanlar bitkisel kökenli yem maddelerinde bulunan fitik asit formundaki fosfordan yaklaşık olarak % 33-90 oranında yararlanabilmektedirler (McDonald ve ark. 1987).

Endojen fitaz aktivitesi çok düşük olan kanatlı, domuz ve balık gibi tek mideli hayvanlar bitkisel kaynaklı yem maddelerindeki fosforun çok az bir kısmını (1/3'ünden daha az) değerlendirebildikleri için (Nelson 1967, Maenz ve Classen 1998, Pallauf ve ark. 1994) hayvanların atıklarında büyük miktarlarda fosfor bulunur. Bunun sebebi gastrointestinal fitaz sisteminden yoksun olmalarıdır. Bu durumda yapısal ve metabolik gelişim için esansiyel bir mineral olan fosforun ihtiyacının karşılanabilmesi için yemlerde inorganik fosfat kaynaklarının kullanımı kaçınılmaz olmuştur (Anonim 1994). Fakat eklenen inorganik fosfatın büyük kısmı da tıpkı fitata bağlı fosfat gibi dışkı ile atılmaktadır. Rasyona ilave edilecek fosfor kaynağı enerji ve proteinden sonra 3. derecede pahalı ham maddedir. Bu da üretim maliyetini doğrudan arttırmaktadır. Sonuç olarak, rasyonda inorganik fosfat kullanımı, hem ekonomik hem çevresel etkiler yaratmaktadır (Boling 1999). Bir diğer önemli sorun da rasyona ilave edilen inorganik fosfor kaynaklarının elde edildiği rezervlerin yenilenemeyen nitelikte olmasıdır. Bu nedenle gelecekte inorganik fosfor kaynakları bakımından ciddi sıkıntılar yaşanacağı öngörülmektedir.

Tek mideli hayvanlarda, fitata bağlı fosforu serbest bırakan mikrobiyal fitaz kullanımı, başarılı bir şekilde uygulanmış ve kullanılabilir fosforun genelde %20-45 arasındaki değerlerde arttığı görülmüştür. Böylece çevre kirliliği bakımından önem taşıyan fosfor atımı yaklaşık %42 oranında azaltılabilmekte (Simons ve ark. 1990) bununla birlikte protein ve mineral sindirimi artırılabilir (Yi ve ark. 1996, Sebastian ve ark. 1997).



Yem katkı maddesi olarak da genellikle *A. niger* (3-fitaz), *Peniophora lycii* (6-fitaz) ve *Escherichia coli* (6-fitaz) 'den elde edilen mikrobiyal fitazlar kullanılır. Bunun nedeni mikrobiyal fitazların daha geniş pH aralığında aktif olması, fitatın en çok çözünür olduğu mide koşullarına uyumlu olması ve özellikle bazı fungal fitazların termostabiliteye sahip olmasıdır. Fitazların ticari değeri firmadan firmaya ve konsantasyonuna bağlı olarak kg başına 12,5-15 ABD Doları civarındadır (Cao ve ark. 2007).

Eksojen fitaz enziminin, fitat fosfor yararlanılabilirliğini artırdığı Nelson ve ark. (1968) tarafından ispat edilmesine ve pek çok araştırmacının domuz ve kanatlılarda aminoasit ve azotun barsaktaki sindirilebilirliğini artırdığını bildirmesine (Oficer ve Batterham 1992, Mroz ve ark. 1994) rağmen, yemlere inorganik fosfor katılmasının daha ekonomik olması fitaz enzimi kullanımının sınırlı kalmasında etkili olmuştur. Ancak son yıllarda çevre bilincinin gelişmesi ile Avrupa'nın bazı bölgeleri ve Amerika'da fosfor kirliliğini azaltma yönündeki baskıların artması ve bu süreçte gelişen biyoteknoloji sayesinde üretilen ticari fitaz enziminin inorganik fosfora göre ekonomik bakımdan da avantajlı bir hal alması (Bedford 2000), özellikle domuz ve kanatlılarda fitat fosfor yararlanılabilirliğini artırmak amacıyla söz konusu enzimin kullanımını oldukça yaygınlaştırmıştır.

### **2.6.2. Gıda Sanayi**

Gıda sanayinde, ekmek yapımı (Haros ve ark. 2001), bitkisel protein izolatlarının üretimi (Wang ve ark. 1999, Fredrikson ve ark. 2001) ve tahıl kepeklerinin parçalanmasını sağlamak için fitaz enzimi ilavesi yapılmaktadır (Kvist ve ark. 2005). Vejeteryanlar, dengesiz beslenen insanlar, yüksek oranda tahıl baklagil ve soya proteini ile beslenen insanlar, gelişmemiş ülkelerde mayasız ekmek ile beslenen insanlar, soya bazlı mama tüketen bebekler fazla oranda fitat almaktadır (Simell ve ark. 1989). Diyetlerde fitatın bulunması çinko, demir, kalsiyum, magnezyum, manganez ve bakır gibi minerallerin alınımını negatif etkilemektedir (Lopez ve ark. 2002, Konietzny ve Greiner 2003). Fizyolojik pH değerlerinde çözünmez mineral-fitat komplekslerinin oluşumu, düşük mineral emiliminin temel nedenidir. Bu kompleksler insan sindirim sisteminin üst kısmında sınırlı miktarda mikrobiyal popülasyonun olması ve endojen fitatı hidrolize edici enzimlerin olmamasından dolayı ince bağırsakta, fitat çok sınırlı

miktarda hidroliz olabilmektedir dolayısıyla mineraller sindirim sisteminde yeterince absorbe olmaz (Iqbal ve ark. 1994). Bununla birlikte fitat, protein, aminoasit ve nişasta gibi besin maddeleri ile bileşikler oluşturarak bu besin maddeleri üzerine olan enzim etkinliklerinin engellenmesine ve sindirilebilirliklerinin düşmesine de neden olmaktadır. Fitata bağlı protein, proteaz etkinliğinden daha az etkilenmektedir. Buna ek olarak sindirim kanalı içerisindeki fitata bağlı proteinler ve mineraller sindirim enzimlerinin etkinliğini bozucu etkiye sahiptir. Bu sebeple fitatın hidrolizini sağlayan fitaz enziminin diyetlerde kullanılması sağlık açısından önemlidir. Bununla birlikte insanların beslenmesinde fitazın kullanılması besinle alınan fitata bağlı minerallerin serbest kalmasını sağlar. Bunun yanında fitazlar myo-inositol hegzakisfosfatın sıralı hidrolizini gerçekleştirerek insan sağlığına faydalı özel inositol fosfatların (myo-inositol fosfat) oluşumunu sağlar (Lei ve ark. 2007, Greiner ve Konietzy 1999).

### **2.6.3. Kağıt endüstrisi**

Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde kullanılan termostabil fitaz, fitik asiti parçalamada kullanılan yeni biyolojik ajandır. Kağıt hamuru ve kağıt yapımı süresince bitki fitik asitinin uzaklaştırılması gereklidir. Fitik asitin enzimatikolarak parçalanması ile mutajenik ve çok zehirli yan ürünler meydana gelmez. Bu sebeple fitazların kağıt hamuru ve kağıt yapımında kullanımı ile temiz teknolojiler gelişirken, çevrenin korunması da sağlanır (Liu ve ark.1998).

### **2.6.4. Biyoteknolojik uygulamalar ve ilaç sanayi**

İnositol veya inositol fosfatların endüstriyel üretiminde fitaz enzimi kullanımı önerilmiştir. Bu üretim fitazın, fitik asiti myo-inositol fosfat türevlerine, serbest myo-inositollere ve inorganik fosfata dönüştürülmesi ile gerçekleştirilir (Brocades 1991). Transmembran sinyalizasyonunda ve intraselüler kaynaklardan kalsiyumun hareketini sağlamada büyük rol oynayan inositol fosfatlara olan ilginin artması, çeşitli inositol fosfatların hazırlanmasına yol açmıştır (Billington 1993).

Myo-inositol fosfatlar hayvan hücrelerinde de bulunmuştur. Ancak hayvan hücrelerindeki bu bileşikler fosfor deposu ya da myo-inositol deposu olarak rol almazlar. Bunların temel rolü, hücre zarı yapısının sağlamlığı ve bütünlüğünü

sağlamaktır. İnositol fosfat türevleri enzim stabilizatörü (Siren 1986b), metabolik araştırmalar için enzim substratı, enzim inhibitörü ve bu nedenle ilaç olarak kullanılmaktadır (Laumen ve Ghisalba 1994). Spesifik inositol trifosfatların, nöropeptid Y'nin anormal seviyelerine bağlı durumları veya hastalıkları hafiflettiği ya da engellediği öne sürülmüştür (Siren ve ark. 1992).

İnositol fosfat karışımlarının eklem iltihabı ve astım gibi solunum hastalıklarına karşı kullanıldığı ve spesifik inositol trifosfatların ağrı kesici olarak önerildiği de bildirilmiştir (Siren 1995). İnositol-trifosfat esterlerinin HIV'de dahil olmak üzere retroviral enfeksiyonlara karşı inhibitör etkisinin olduğu gösterilmiştir (Siren 1998).

Siren (1986) tarafından *Saccharomyces cerevisia* fitazı kullanılarak fitik asitin enzimatik hidrolizi ile D-myo-inositol 1,2,6-trifosfat, D-myo-inositol 1,2,5-trifosfat, L-myo-inositol 1,3,4-trifosfat ve myo-inositol 1,2,3-trifosfatların hazırlanması tanımlanmıştır (Siren 1986a). Ayrıca *E.coli* fitazı kullanılarak inositol 1,2,3,4,5-pentakisfosfat, inositol 2,3,4,5-tetrakisfosfat, inositol 2,4,5-trifosfat ve inositol 2,5-bifosfat da hazırlanmaktadır (Greiner ve Konietzny 1996).

## 2.7. *Bacillus* cinsi

*Bacillus* adı ilk kez 1872 yılında Ferdinand Cohn tarafından kullanılmıştır (Lin 1997). Carl Woese tarafından 16S rRNA ve 18S rRNA dizilerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulmuş sınıflandırmaya göre, *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar bakterisi (eubakteri=gerçek bakteriler) domaini içerisine dahil edilmiştir (Woese ve Wolfe 1985, Woese 1999). Biyokimyasal, morfolojik ve moleküler biyolojik tekniklere göre *Bacillus*'ların taksonomik sınıflandırılması Çizelge 2.3'de verilmiştir.

### Çizelge2.3. *Bacillus* cinsinin taksonomik sınıflandırılması

Domain	Bacteria (Eubacteria)
Alem	Firmicutes (Gram (+) Bakteri)
Sınıf	Bacilli
Takım	Bacillales
Familya	Bacillaceae
Cins	Bacillus

*Bacillus* cinsi organizmalar Gram(+), spor oluşturabilen, çubuk şeklinde, anaerob veya fakültatif aerob, katalaz pozitif, mikroorganizmalardır (Claus and Berkeley 1986). *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların ayırt edilmesinde kullanılan temel özellikler Çizelge 2.4'de verilmiştir.

**Çizelge 2.4.** *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların genel özellikleri (Claus ve Berkeley 1986) D: Değişken

Özellik	<i>Bacillus</i> cinsi
Çubuk şekli	+
Hücre çapı	<2.5 µm
Filament varlığı	-
Hareket yeteneği	+
Endospor oluşumu	+
Gram reaksiyonu	+
Katalaz aktivitesi	+
Glukozdan asit oluşumu	+
Zorunlu anaerob üreme	D
Fakültatif anaerob üreme	D
Homolaktik fermentasyon	D
Nitratın nitrite redüksiyonu	D
Sülfatın sülfite redüksiyonu	-
Oksidaz aktivitesi	D
G+C oranı (%mol)	32-69

*Bacillus* cinsi bakteriler çubuk şeklinde olup, peritrik formda hareketli flagellaya sahiptirler. Vejetatif hücreler 0,5x1,2 µm ile 2,5x10 µm çapındadır (Lennete ve ark. 1985). Tek ya da gruplar halinde gelişebilirler. Çift veya zincir şeklinde koloniler oluştururlar. Genellikle beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklerde pigmentli kolonilere de rastlanır (Buchanan ve Gibbons 1974). *Bacillus* sp.'ler genellikle karbonhidrat kapsülü bulundurlar. Endospor oluşturabilen bu organizmalar aerobik veya fakültatif anaerobik solunum şekline sahiptir (Buchanan ve Gibbons 1974, Zemek ve ark. 1981). Genellikle 35-37°C'de ve pH 7.0 civarında ürerler. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren, nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi ürerler (Türk Tabipleri Birliği 2002). Şekeri fermente ederler fakat sonuçta gaz oluşturmaksızın asit üretirler. Proteinleri parçalarken ise amonyak oluşturdıkları için kokuşmaya sebep

olurlar. Genelde prototrof oldukları halde, oksotrof türlere de rastlanır. Çoğunlukla mezofilik olmakla birlikte psikrofilik ve termofilik türleri de bulunur. Ayrıca çok çeşitli metabolik özelliklerinin yanı sıra psikrofilikten termofiliğe; asidofilikten alkalifiliğe; halotoleranttan halofiliğe gibi geniş bir fizyolojik yelpazeye sahiptir ve bu yüzden endüstriyel uygulamalar için kullanılma potansiyelleri yüksek olan mikroorganizmalardır (Rosovitz ve ark. 1998, Sneath 1986).

*Bacillus* cinsinin yağları ve proteinleri parçalama yetenekleri çok yüksektir. Bu nedenle bazı türlerinin çeşitli besinlerde buldukları ve besin maddelerinin dönüşümü ve bozulmalarında rol oynadıkları bilinmektedir. Bazı türleri ise antibiyotik veya toksin üretir. *Bacillus* cinsi bireylerinin çoğu zararsız, izolasyonu ve teşhisi kolay, hızlı büyüme oranı ile kısa fermentasyon süresi ve sentezledikleri proteinleri dış ortama salgılama kapasiteleri gibi birçok nedenden dolayı cazip endüstriyel organizmalardır. Kısacası *Bacillus* cinsi bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilibilmeleri sebebiyle, bakteriler arasında dikkat çeken mikroorganizmalardandır (Ediz ve Beyatlı 2005).

Birçok biyoteknolojik çalışmada kullanılan *Bacillus* cinsi üyeleri ürettikleri proteinler nedeniyle ticari öneme sahiptirler (Kim ve ark. 2005, Annamalai ve ark. 2011). *Bacillus* cinsi bakterilerin ürettiği endüstriyel enzimlerden olan selülaz ve amilazlar deterjan endüstrisinde; nötral proteazlar süt endüstrisinde; farklı amilaz ve pullulanazlar besin ve meyve suyu endüstrisinde kullanılmaktadır. Doğada bazı *Bacillus* türlerinin kağıt, tekstil ve deterjan endüstrilerinde geniş kullanım potansiyeline sahip olan enzimleri sentezleyebilmeleri sebebiyle bu cinsten yeni bakteriyel suşların izolasyonuna olan ilgi devam etmektedir (Ghorbel ve ark. 2009).

*Bacillus* cinsi bireyler uygun olmayan şartlarda spor oluşturma yeteneğindedir. Sporları sayesinde olumsuz koşullara karşı çok dayanıklıdırlar. Oluşturduğu endospor silindirik, oval, yuvarlak veya böbrek şeklinde olup, hücre içerisinde sentral ya da subterminal olarak yerleşebilir. Spor vejetatif hücreden daha dar olabildiği gibi daha geniş de olabilir. Sporlanma kabiliyetleri ve metabolizma faaliyetlerinin çeşitliliği, geniş bir çevreye yayılmalarında önemli avantajlar sağlar (Rosovitz ve ark. 1998). *Bacillus* cinsi

üyelerinin habitatları toprak olmasına rağmen hava, su ve yiyecek gibi birçok ortamda bulunabilirler. Genellikle iyi havalanmış, nemli ve yüksek organik madde içeren toprakları seçen *Bacillus* sp.'ler, en fazla toprağın ilk 10 cm'lik üst kısmında bulunurlar. *Bacillus* türleri deniz ve tatlı sularda ve onların sedimentlerinde de bulunabilirler. Bazı *Bacillus* türleri ise ekstrem şartlarda büyüebilme kapasitesindedirler ve üre içeren, yüksek pH değeri olan, asitli veya yüksek ısıli ortamlardan izole edilebilirler (Ediz ve Beyatlı 2005).

## 2.8. Klonlama

Rekombinant DNA teknolojisinin temeli rekombinasyondur. Doğada rekombinasyon eşeyli üremede mayoz bölünmedeki krossing-over olayı sayesinde gerçekleşirken eşeysiz üremede (bakteri vb.) konjugasyon, transdüksiyon ve transformasyon sayesinde gerçekleşir. Bu olaylardaki DNA molekülleri arasında homoloji vardır. Bu sebeple doğadaki çeşitlenme aynı türe ait bireyler arasında ya da çok yakın türler arasında gerçekleşmektedir. Dolayısıyla doğada genetik bilginin değişmesi daha çok raslantıya bağlı olup, tür içinde kalmaktadır. Bununla birlikte mutasyonlarla da genetik bilgi değişmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisi genelde, bir organizmadan izole edilen ve içinde istenilen geni taşıyan DNA parçalarının, taşıyıcı özellikte bir DNA molekülüne bağlanması ile rekombinant DNA(rDNA) moleküllerinin oluşturulması ve rekombinant DNA moleküllerinin uygun bir konak hücreye aktararak, konakta çoğaltılmasını kapsayan bir süreçtir. Bu sürecin ilgili DNA dizisinin izolasyonu ve birçok kopyasının *in vivo* koşullarda üretilmesini kapsayan kısmı ise gen klonlaması olarak adlandırılır.

Geliştirilen birçok klonlama yönteminin yanı sıra çeşitli ticari klonlama kitleri de bulunmaktadır. Bu yöntemler ligasyon-bağımlı klonlama ve ligasyon-bağımsız klonlama olarak iki gruba ayrılır. Ligasyon bağımlı klonlama daha yaygın kullanılmaktadır (Guo ve Bi 2002). PZR ürünlerinin ligasyon-bağımlı klonlanma yöntemleri DNA uçlarına göre kendi içinde küt uçların klonlaması, yapışkan uçların klonlaması ve T-A klonlama olmak üzere üçe ayrılır.

Uygun ligasyon bağımlı klonlama yönteminin seçiminde çeşitli faktörler göz önünde tutulmalıdır. Bu faktörlerden en önemlisi klonlamanın amacıdır. Örneğin klonlama, protein ekspresyonu için yapılacak ise ekspresyon vektörüne klonlama daha yararlı olacaktır. Diğer önemli faktör ise uygun vektörlerin seçimi ve hazırlanmasıdır. Örneğin, yaygın olarak kullanılan plazmit vektörlerin klonlama kapasitesinin dışında kalan PZR ürünlerinin (10 kb'dan fazla) klonlanmasında kozmit gibi vektörler kullanılmalıdır. Ayrıca "insert" denilen dizileri içeren klonların seçimini kolaylaştırmak ve klonlama etkinliğinin gelişmesini sağlamak için etkin bir tarama sisteminin kullanılması da oldukça önemlidir (Guo ve Bi 2002, Kahn ve House 2004).

Yapışkan uçlu klonlama, birçok laboratuvarında rutin olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde, primerlerinin 5' uçlarına restriksiyon bölgeleri yerleştirilir. Primerler, PZR reaksiyonu sırasında PZR ürünlerine entegre olur. İlgili restriksiyon enzimleriyle yapılan kesim sonrasında PZR ürünlerinin iki ucunda, yapışkan uçlar oluşur. Kesilmiş PZR ürünleri ve vektörler çok yüksek etkinlikte birleştirilebilir ve oldukça etkin bir şekilde yapışkan uçlu klonlama gerçekleştirilebilir. İki PZR primerinin kesiminde kullanılan restriksiyon enzimleri aynı olabildiği gibi farklı da olabilir. Farklı oldukları koşullarda PZR ürünleri vektörlere yalnızca tek bir yönde girebilir (Guo ve Bi 2002).

Yapışkan uçlu klonlamada bazı problemler oluşabilmektedir. Özellikle kesim bölgeleri çift iplikli PZR ürünlerinin 5' uçlarının yakınında olan restriksiyon endonükleazlar, DNA uçlarına stabil olmayan bir biçimde bağlandıklarından dolayı etkili kesim yapamazlar. Bunun çözümü restriksiyon bölgesinin 5' ucunun önüne ekstra nükleotit eklenmesidir. Ancak bu çözüm bazı durumlarda primerlerin PZR ürünlerine tutunma etkinliğini de düşürebilmektedir. Yapışkan uçlu klonlamada görülebilen diğer problem, istenmeyen iç kesim bölgelerinin bulunabilmesidir. Bu problemi öngörmek zordur, çünkü genellikle "insert" denilen diziler tam olarak bilinmez. Bu tip klonlamada ayrıca primer dimerlerinin oluşumu da problem teşkil etmektedir. Çünkü restriksiyon tanıma dizileri genellikle ters tekrarlı (palindromik) dizilerdir ki bu da primer dimerlerinin oluşumuna yol açar. Primer dimerlerinin oluşumu da amplifikasyon etkinliğinin düşmesine yol açmaktadır (Guo ve Bi 2002).

Birçok DNA polimeraz gibi Taq DNA polimeraz da küt uçlu DNA fragmanlarının 3' uçlarına ilave nükleotitler ekleyebilir. Taq DNA polimeraz bu terminal transferaz aktivitesi sayesinde çift iplikli DNA'nın küt uçlarına tek bir 3'-A ekler. Bu sebeple Taq DNA polimerazla çoğaltılmış birçok PZR ürününün iki ucunda tek bir 3'-A çıkıntısı vardır. 3'-A çıkıntılarında sahip olan PZR ürünlerinin doğrudan klonlanmasında, uçlarında 3'-T çıkıntısı olan T-vektörü kullanılabilir. Lineer bir vektör olan T-vektöründeki 3'-T çıkıntısı ile PZR ürünündeki 3'-A çıkıntıları arasındaki tamamlayıcılık Taq DNA polimeraz ile çoğaltılmış PZR ürünlerinin T-vektörüne doğrudan ligasyonunu sağlar ve bu yöntem "TA klonlama" olarak adlandırılır.

TA klonlama yöntemi basit olmasının yanında küt uçlu klonlamadan da daha etkindir (Zhou ve Gomez-Sanchez 2000). Geleneksel ligasyon-bağımlı yöntemlerin yanı sıra enzimsiz veya ligazsız klonlama olarak da adlandırılan ligasyon-bağımsız klonlama yöntemleri de kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemde çok sayıda primer gereksiniminin olması, kullanılacak konakçının sınırlı sayıda olması, kullanılan "insert" denilen DNA fragmanın ve vektörün PZR ile çoğaltılması gibi birtakım sınırlandırmalar bulunmaktadır (Guo ve Bi 2002, Tillett ve Neilan 1999).

Fitaz üretim veriminin artırılması, fitaz ekspresyonu ve saflaştırılmasının kolaylaştırılması için bir çok çalışmada fitazın klonlanması ve karakterizasyonu için bir çok çalışma yapılmıştır. *E.coli*, mantar ve mayaların çeşitli suşları konak olarak kullanılmıştır. Son yıllarda araştırmacılar fitaz üreten transgenik ve hayvanlar hakkındaki çalışmalara odaklanmışlardır bu çalışmalardan en iyi bilineni *Aspergillus niger* fitazının tütünde klonlanıp ifade ettirilmesidir (Ullah ve ark.1999).

Günümüzde de ticari fitaz preparatlarının çoğu fitaz şifreli gen kaynaklı *Aspergillus niger*'den elde edilmektedir (Maenz 2001). *Aspergillus fumigatus* fitazı, *Aspergillus niger* PhyA fitazı ile %66 dizi homolojisini paylaşır, fakat çok daha iyi termotolerantlık gösterir. Fakat *Pichia anomala* (Vohra ve Satyanarayana 2002) mayasından izole edilen fitaz yüksek sıcaklıklara direnç gösterdiği için rekombinant DNA teknolojisi aracılığıyla *E.coli* fitazının termal stabilitesinin artırılmasında kullanılmıştır (Rodriguez ve ark. 2000a).



Findenegg ve Nelemans (1993) yaptığı araştırma sonucunda toprağa ilave edilen fitaz sayesinde fitinin parçalanma oranının artmasına bağlı olarak büyümeyi uyardığını bildirmişlerdir. Bu çalışma bitkilerin köklerinde fitaz geninin ekspresyonu ile transgenik bitkilerle topraktaki fosforun kullanılabilceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır (Day 1996).

Fitaz kodlayan genler genellikle *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus fumigatus*, *Escherichia coli* ve *Schwanniomyces occidentalis*'den elde edilmiştir ve çeşitli, bitkilerde klonlanmıştır (Greiner ve Konietzny 2006).

Transgenesis, pirinç (Hamada ve ark. 2005), buğday (Brinch-Pedersen ve ark. 2000), şekerkamışı (Santosa ve ark. 2004), *Arabidopsis* (Mudge ve ark. 2003), susam (Jin ve ark. 2004), soya fasulyesi (Li ve ark. 1997), kanola (Ponstein ve ark. 2002) ve patatestte (Ullah ve ark. 2003) uygulanmıştır.

İnsan beslenmesi uygulamaları için, *Aspergillus niger* fitazı, pirinç bitkisine klonlanıp eksprese edilerek transgenik bir bitki geliştirilmiştir (Lucca ve ark. 2001). Bu fitaz, beyaz veya parlatılmış pirincin demir kaynağı olarak kullanılabilmesi için geliştirilmiştir (Wyss ve ark. 1999a).

Fitaz enziminin klonlanması ile ilgili literatürde çalışmalar mevcuttur. Birçok mikroorganizmadan elde edilen fitaz geni farklı konakçı organizmalara aktarılmış ve enzim ifade edilmiştir (Çizelge 2.5).

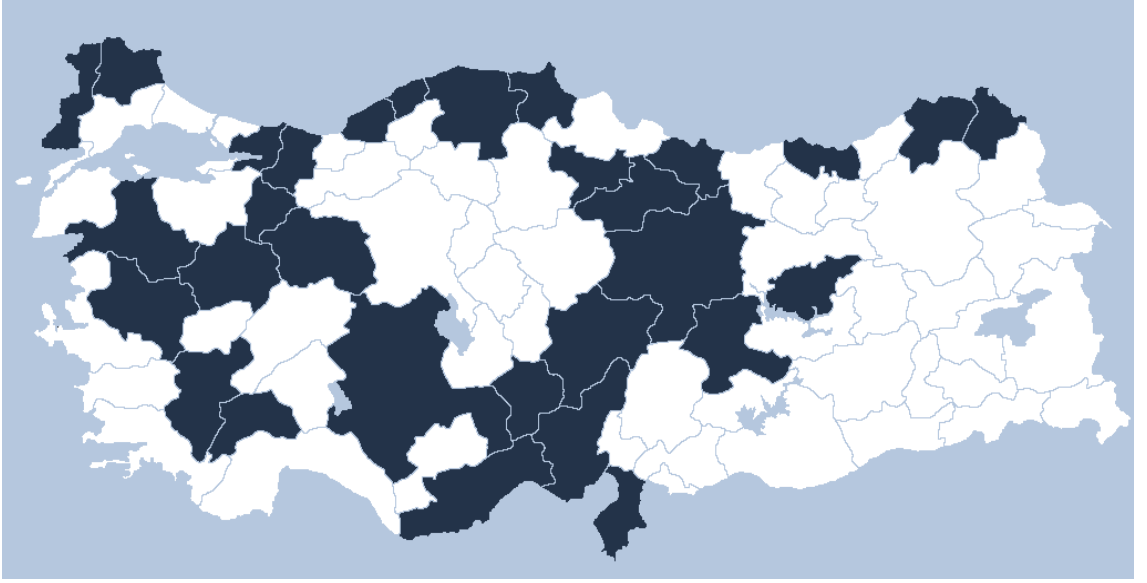
**Çizelge 2.5.** Fitaz enziminin izole edildiği organizmalar ve klonladığı konaklar (Tye 2002)

Gen	Genin Alındığı Organizma	Ekpresyonun Sağlandığı Konak	Kaynaklar
PhyC	<i>Bacillus subtilis</i> VTTE68013	<i>Escherichia coli</i>	Kerovuo ve ark. 1998
PhyC	<i>Bacillus subtilis</i> VTTE68013	<i>Lactobacillus plantarum</i> 755	Kerovuo ve Tynkkynens 2000
TS-Phy	<i>Bacillus amyloliqueficiens</i> DS11	<i>Escherichia coli</i>	Kim ve ark. 1998b
aPPA	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Dassa ve ark. 1990
-	<i>Escherichia coli</i>	Fare	Golovan ve ark. 2001a
-	<i>Escherichia coli</i>	Domuz	Golovan ve ark. 2001b
PhyB	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Escherichia coli</i>	Ehrlich ve ark. 1993
PhyA	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Han ve Lei 1999
PhyA	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Han ve ark. 1999
PhyA	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Nicotina tabacum</i>	Ullah ve ark. 1999
PhyA	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Alfalfa</i>	Ullah ve ark. 2002
-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Pasamontes ve ark. 1997b
-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Rodriguez ve ark. 2000a
PhyA	<i>Peniophora lycii</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Lassen ve ark. 2001
PhyA	<i>Agrocybe pediades</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Lassen ve ark. 2001
PhyA1	<i>Cf. Ceriporia</i> sp.	<i>Aspergillus oryzae</i>	Lassen ve ark. 2001
PhyA2	<i>Cf. Ceriporia</i> sp.	<i>Aspergillus oryzae</i>	Lassen ve ark. 2001
PhyA	<i>Trametes pubescens</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Lassen ve ark. 2001
Phy S11	<i>Zea mays</i>	<i>Escherichia coli</i> BL21	Maugenest ve ark. 1997

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Türkiye'deki 30 farklı ilden alınan toprak örneklerinden çalışmada kullanılacak *Bacillus* sp. suşları izole edilmiştir (Şekil 3.1). İzolasyon sonucu en yüksek fitaz aktivitesine sahip bir adet *Bacillus* sp. suşu seçilmiş ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere kültür saklama besiyerinde korunmuştur.



**Şekil 3.1.** Kullanılan toprak örneklerinin alındığı iller: Adana, Amasya, Ardahan, Artvin, Balıkesir, Bartın, Bilecik, Burdur, Denizli, Edirne, Eskişehir, Hatay, Kastamonu, Kayseri, Kırklareli, Kocaeli, Konya, Kütahya, Malatya, Manisa, Mersin, Niğde, Ordu, Sakarya, Sinop, Sivas, Trabzon, Tunceli, Tokat, Zonguldak.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Fitaz pozitif bakterilerin kalitatif tayini

Çalışmada kullanılacak olan fitaz pozitif bakterilerin izolasyonu için, toprakların ince kısmından 0,25 g tartılmış ve 10 mL steril fizyolojik tuzlu su içerisinde iyice vortekslenerek karıştırılmıştır. Örnekler, 60°C'de 30 dakika tutularak vejetatif formların ölmesi ve ortamda yalnızca sporlu bakterilerin kalması sağlanmıştır. Daha sonra tüplerin ağzuları kapatılarak soğumaya bırakılmıştır (Lennette ve ark. 1985).

Çalışmada fitaz pozitif bakterilerin saptanması amacıyla plak agar yöntemi kullanılmıştır. Bakterilerin fitaz üretme kapasitelerinin katı besiyerde belirlenebilmesi amacıyla modifiye edilmiş fitaz tarama ortamı (PSM) kullanılmıştır (Çizelge 3.1) (Howson ve Davis 1983). Fitaz tarama ortamının hazırlanmasında kullanılan maddeler miktarına uygun bir şekilde ölçülüp erlende karıştırılmış ve ortamın pH'sı 1N HCl ya da 1N NaOH kullanılarak ayarlanmıştır. Daha sonra 121°C'de 40 dakika otoklavlanarak sterilizasyon sağlanmıştır. Otoklavlama işlemi bittikten sonra 50-55°C'ye kadar soğutulan besiyerinden, 180°C'de 1 saat pastör fırınında steril edilmiş petri kaplarına 15'er mL dökülmüş ve soğumaya bırakılmıştır.

**Çizelge 3.1.** Fitaz pozitif bakterilerin seçiminde kullanılan katı besiyeri

İçerik	Fitatlı besiyeri (g/L)
Glukoz	20
Na-fitat	4
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5
KCl	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
Agar	15
pH	7.0

Farklı illerden alınan toprak örneklerinden 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup> ve 10<sup>-9</sup> olmak üzere seri dilüsyonlar yapılmış ve petrilere 0,1 mL örnek pipetlenerek yayma yöntemine göre ekim yapılmıştır (Temiz 1994). Ekimi tamamlanan petrilere 37°C'de 96 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda petri kaplarındaki koloniler gözlemlenmiş, zon oluşumunun varlığına göre bakteriler fitaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Zonların büyüklükleri cetvel ile ölçülmüştür. Çalışmada zon çapı büyük olan suşlar seçilmiş ve saf kültür olarak LB agarlı ortamda kültüre edilerek, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2.** Fitaz pozitif bakterilerin saklanması için kullanılan LB agarlı besiyeri

İçerik	LB agarlı besiyeri(g/L)
Tripton	10
NaCl	10
Yeast extract	5
Agar	15
pH	7.0

### 3.2.2. *Bacillus*'un taksonomik sınıflandırması için morfolojik ve fizyolojik özelliklerin belirlenmesi

İzole edilen bakterilerden, en büyük zon çapına sahip olan bakterilerin saf kültürlerinin morfolojik ve fizyolojik özellikleri incelenerek, *Bergey's Manual of Systematic Microbiology*'den alınan tayin anahtarına göre *Bacillus*'lar belirlenmiştir (Buchanan ve Gibbons 1974). Bu sebeple, bu bakterilerin gram ve spor boyamaları, hareketlilik testleri ve katalaz testleri yapılmıştır. Bu deneylerde kullanılan besiyerleri Çizelge 3.3'de verilmiştir. Ayrıca, en yüksek fitaz zonuna sahip bakterinin 16S rRNA mikrobiyal tür analizi hizmet alımı yoluyla yapılmıştır (RefGen, Ankara).

**Çizelge3.3.** Taksonomik sınıflandırma amacıyla yapılan deneylerde kullanılan besiyerleri (Çotuk 2003).

İçerik	Hareketlilik Testi (%g)	Katalaz Testi (%g)	Spor Boyama (% g)	Gram Boyama (%g)
Nişasta	-	-	-	-
Nutrient Broth	0,8	0,8	0,8	0,8
Agar	1	2	1	1
pH	7.0	7.0	7.0	7.0

### 3.2.2.1. Hareketlilik Testi

Hareketlilik testi için agar ve nutrient broth kullanılarak ortam hazırlanmıştır. Steril petriler, alt taraflarından kalemle çizilerek ikiye bölünmüş ve bakteri ekilecek kısım işaretlenmiştir. Sıvı besiyerinde üretilen kültürden 0,1 mL pipetlenecek şekilde, belirlenen bölgeye çizgiyi geçmeyecek şekilde konulduktan sonra drigalski özesi ile iyi bir şekilde yayılmıştır. Daha sonra 37°C'de 18 saat boyunca inkübe edilmiştir (Temiz 1994).

### 3.2.2.2. Katalaz testi

Katalaz testinde kullanılan besiyerine ekilmiş bakteriler, 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda oluşan koloniler üzerine 1-2 damla %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılmış ve gaz çıkışı olup olmamasına göre değerlendirme yapılmıştır. Katı besi yerinde gelişen saf kolonilerin üzerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılarak gaz çıkışı gözlenmiştir. Gaz çıkışı, bakterilerin hidrojen peroksidazı kullandığını gösteren pozitif bir sonuçtur (William ve ark. 2001). Aerobik solunum yapan bakteriler genellikle katalaz enzimi sentezleyebilirler. Dolayısıyla genellikle aerobik solunum yapan *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların katalaz pozitif olması beklenmektedir.

### 3.2.2.3. Gram boyama

Gram boyama işlemi Temiz (1994)'in belirttiği yöntemle yapılmıştır. Buna göre; bakterilerin 18 saat'lik taze kültürlerinden, steril öze ile alınarak 1 damla steril distile su ile lam üzerine yayma preparat hazırlanmış ve preparatlar hava akımı ile kurutulmuştur. Kuruma tamamlandıktan sonra lamlar 3 defa alevden geçirilerek tespit işlemi yapılmıştır. Daha sonra lamların üzerine, mikrobiyal film tabakasını kaplayacak şekilde, bol miktarda %1'lik kristal viole damlatılarak 1 dakika beklenmiştir. Kristal viole su ile yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra lamların üzerine %0,5 I ve %5 KI ile hazırlanmış gram iyodin (lügol) dökülerek yine 1-2 dakika beklenmiştir. Daha sonra lugol, su ile yıkanarak uzaklaştırılmış ve lamlar %95'lik etil alkol ile renk kayboluncaya kadar yıkanarak dekolorize edilmiştir. Ardından, film tabakası 45 saniye safranin ile muamele edilmiş ve daha sonra safranin su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır.

Bu şekilde hazırlanan preparatlar, havada kurutulmuş ve immersiyon yağı ile 10x100' lük objektifte, Olympus CH-2 marka ışık mikroskopunda incelenmiştir. Gram(+) olan

mikroorganizmalar koyu mor (menekşe), Gram(-) olanlar ise açık pembe renkli görünümleri ile ayırt edilmiştir.

#### **3.2.2.4. Spor boyama**

Bu aşamada Schaeffer–Fulton yöntemi kullanılmıştır. *Bacillus* cinslerine ait türlerin oluşturduğu sporların etrafındaki duvar oldukça kalın olduğu için malaşit yeşili ile boyama yapılmıştır (William ve ark. 2001, Çökmüş ve ark. 1995). Spor boyamada kullanılan ortama ekimi yapıp 37°C'de 18 saat inkübe edilmiş taze katı kültürden steril öze ile alınıp, 1 damla steril distile su ile lam üzerinde yayma preparat yapılmıştır. Daha sonra havada kurutulmuş ve ardından 3 kez alevden geçirilerek fikse edilmiştir. Preperatın üzeri kurutma kağıdı ile kaplanmış ve üzerine malaşit yeşili çözeltisi dökülerek, aleve yakın bir bölgede tutulmuş ve buharlaştıkça boya ilave edilmiştir. Bu işlem sonunda preperat distile su ile nazıkçe 10 saniye yıkanmıştır. Karşıt boyama için preperat 30 saniye safranin boyanmış ve tekrar distile suyla yıkanıp havada kurutulmuştur.

Bakteri sporlarının morfolojileri, Olympus CH-2 marka mikroskopta 10x100'lük objektifte immersiyon yağı kullanılarak incelenmiştir. Bu yöntem ile boyanan sporlar mikroskopta yeşil, vejetatif hücreler ise pembe-kırmızı renkte görülmektedir.

#### **3.2.2.5. 16S rRNA Analizi**

En yüksek fitaz aktivitesinin görüldüğü *Bacillus* sp. suşunun hizmet alımı ile 16S rRNA analizi yapılmış (RefGen, Ankara) ve bakteri tür düzeyinde adlandırılmıştır. *Bacillus* sp. suşunun 16S rRNA analizini yapmak için 27F ve 1492R primerleri kullanılmıştır.

#### **3.2.3. Bakteri kültürünün saklanması için kullanılan besiyerleri**

Bu çalışmada kullanılan fitaz pozitif bakterilerin saklanması amacıyla farklı besiyerleri kullanılmıştır. Buna göre, bakterilerin buzdolabı koşullarında uzun süre dayanmalarını sağlamak amacıyla Çizelge 3.4'de verilen kültür saklama besiyeri kullanılmış olup, kültürler 30 günde 1 kez yeniden hazırlanan agarlı besiyerine seri çizgi ekimlerin yapılması sureti ile korunmuşlardır.

**Çizelge 3.4.** Bakteri kültürünün saklanması için kullanılan besiyerleri (Sarıkaya 1995)

İçerik	Kültür saklama besiyeri (% g)
Tripton	-
Yeast Extract	-
Nutrient Broth	0,8
NaCl	0,8
Agar	2
pH	7.0

### 3.2.4. Fitaz enzim genin *Bacillus sp.* suşundan izolasyonu ve kontrolü

#### 3.2.4.1. *Bacillus sp.* suşundan genomik DNA'nın izolasyonu

Yüksek fitaz aktivitesi saptanan *Bacillus sp.* suşu 37°C ve 150 rpm'de LB besiyerinde aerobik şartlarda büyütüldükten sonra G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit [for bacteria] (Intron Biotechnology) kullanılarak kromozomal DNA izole edilmiştir.

En yüksek fitaz aktivitesi saptanan *Bacillus sp.* suşunun saf kültüründen steril koşullar altında öze ile örnek alınıp, içinde sterilize edilmiş 30 mL LB besiyeri bulunan erlene ekim yapılmıştır. 37°C ve 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona başlanmıştır. Kör olarak LB besiyeri kullanılmış ve kültürün 600 nm dalga boyundaki optik yoğunluk (OD) değeri ölçülmüştür. Kültürün 600 nm dalga boyundaki optik yoğunluk (OD) değeri 0,8–1,0 aralığına ulaştığında 2 mL'si mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve hızlı bir şekilde DNA ekstraksiyonu protokolü uygulanmaya başlanmıştır.

G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit for bacteria (Intron Biotechnology) Protokolü DNA ekstraksiyonu 3 paralel reaksiyon olarak yapılmış ve izolatlar 9-1-1, 9-1-2 ve 9-1-3 olarak adlandırılmıştır.

-Mikrosantrifüj tüpünde bulunan 2 mL kültür 13 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüş ve santrifüj sonrasında üst sıvı atılmıştır.

-Çökelti üzerine 50 µL Pre-Buffer solüsyonu ilave edilip mikropipetle pipetaj yapılarak bütün hücrelerin çözülmesi sağlanmıştır. Daha sonra Gr(+) olan *Bacillus sp.* türlerinin hücre duvarını enzimatik olarak parçalanmasını sağlamak için 3µL lizozim



(100mg/mL) solüsyonu ilave edilip, iyi bir şekilde pipetaj yapıldıktan sonra 37°C'de en az 15 dakika inkübe edilmiştir. Hücrelerin parçalanmasına yardımcı olmak için mikrosantrifüj tüpü inkübasyon sırasında her 5 dakikada bir alt üst edilmiştir.

-Mikrosantrifüj tüpüne 250 µL G-Buffer solüsyonu eklenip, mikropipet ile pipetaj yapılmıştır. G-Buffer içeriğindeki RNAz A solüsyonu ile RNA molekülleri degrades edilmiş ve Proteinase K solüsyonu ile peptid bağlarının yıkılmasını sağlayarak proteinlerin parçalanmasını ve dolayısıyla DNAaz'ların inhibe edilmesi sağlanmıştır. Sonrasında mikrosantrifüj tüpü 65°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. G-Buffer etkisinin artması için inkübasyon sırasında 5 dakikada bir mikrosantrifüj tüpü alt üst edilmiştir.

-G-spin™ kolonu, 2 mL 'lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

-Mikrosantrifüj tüpüne 250 µL Binding Buffer eklenerek en az 10 kez pipetaj yapılmıştır. Mikrosantrifüj tüp içeriği mikropipet ile çekilerek kolona aktarılmış ve spin kolon 13 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve kolondan süzülen sıvı atılmıştır. Santrifüj sonrasında DNA kolona bağlanmıştır.

-Kolona 500 µL Washing Buffer A eklenerek 13 000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiş ve santrifüj sonrasında kolondan süzülen sıvı atılmıştır. Kolona 500 µL Washing Buffer B eklenerek 13 000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiş ve santrifüj sonrasında kolondan süzülen sıvı atılmıştır. Washing Buffer A ve Washing Buffer B solüsyonunun içeriğinde bulunan etanol ile DNA çöktürülmüş ve böylece tuz rezidüleri nükleik asitlerden ayrılmıştır. Daha sonra boş kolon 13 000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Sonrasında toplama tüpü atılırken, kolon steril bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Kolona 50 µL Elution Buffer kolonun membranına zarar vermeyecek biçimde eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika beklenmiş daha sonra 13 000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.

-Mikrosantrifüj tüpüne süzülen sıvıdaki kromozomal DNA daha ileri manipülasyonlarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

#### **3.2.4.2. İzole edilen kromozomal DNA'nın konsantrasyonu ve saflık derecesinin spektrofotometrik ölçümler ile tespiti**

İzole edilen genomik DNA'nın konsantrasyonu ve saflık derecesinin ölçümü için G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit [for bacteria] (Intron Biotechnology) içeriğinde bulunan Elution Buffer kör olarak kullanılmış ve 230-260-280 nm dalga boylarında okuma yapılmıştır.

### 3.2.4.3. Kromozomal DNA'nın agaroz jel elektroforezi ile kontrolü

*Bacillus* sp. suşundan izole edilen kromozomal DNA'nın görüntülenmesi %0,8 agaroz jel elektroforezi ile yapılmıştır (Çizelge 3.5 - 3.6). 3 µL'lik yükleme boyası (Gel loading dye blue 6X, New England Biolabs Inc.) ile 8 µL'lik DNA örnekleri %0,8'lik agaroz jele yüklenmiş ve 1X TBE tamponu içerisinde 100 volt akımda yaklaşık olarak 2 saat yürütülmüştür. Elde edilen bantlar jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

**Çizelge 3.5.** Kromozomal DNA'nın kontrolünde kullanılan %0,8'lik agaroz jel içeriği

%0,8 Agaroz Jel İçeriği	Miktar
1X TBE tamponu	100 mL
Agar	0,8 g
Etidyum Bromid (20 mg/mL)	5 µL

**Çizelge 3.6.** Agaroz jel elektroforezinde kullanılan 1X TBE tamponu içeriği

1X TBE Tamponu İçeriği	Miktar
Tris	10,8 g
Borik asit	5,5 g
0.5 M Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8.0)	4 mL

Son hacim 1000 mL olacak şekilde dH<sub>2</sub>O eklenmiştir.

0.5 M Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8.0) İçeriği	Miktar
Na <sub>2</sub> EDTA	73,06 g
NaOH	9 g
dH <sub>2</sub> O	400 mL

10 N NaOH ile pH 8.0 olarak ayarlanmıştır. Daha sonra son hacim 500 mL olacak şekilde dH<sub>2</sub>O eklenmiştir.

10 N NaOH İçeriği	Miktar
NaOH	200 g

Son hacim 500 mL olacak şekilde dH<sub>2</sub>O eklenmiştir.

### 3.2.5. Fitaz enzim geninin PZR ile çoğaltılması

*Bacillus* sp. suşu kromozomal DNA'sı üzerinde bulunan fitaz geni (PhyC) PZR ile çoğaltılmaya çalışılmıştır. Öncelikli olarak homoloji analizleri yapılmış ve klonlaması planlanan fitaz geninin çoğaltılması için uygun geri ve ileri primerler hazırlanmıştır. Homoloji analizinde literatürde bulunan gen sekansları kullanılarak ClustalW2 programı yardımı ile sekanslar hizalanmış ve korunmuş olan bölgelerin sekans bilgisinden yararlanılarak PhyC genini çoğaltabilmek için primer çiftleri hazırlanmıştır. Primerlerin kalıp DNA'ya yapıştığı sıcaklık ( $T_m$ =Annealing Temperature), primer uzunlukları dikkate alınarak her iki primer için de ayrı ayrı hesaplanmıştır. PZR reaksiyonu uygun koşullarda gerçekleştirildikten sonra amplifikasyon agaroz jel elektroforezine tabi tutulacaktır. Çoğaltılmış DNA parçasının uzunluğunun tespiti için jele örnekler ile birlikte uzunluk markörü yüklenmiştir. Beklenen moleküler ağırlıkta oluşan tek bir DNA bandı temiz bir bistiiri yardımı ile dikkatli bir şekilde kesilerek alınmış ve bant temizleme kiti (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) kullanılarak agarozdan temizlenmiştir.

#### 3.2.5.1. Fitaz enzim geninin PZR ile çoğaltılması için kullanılan primerler

Çalışmamızda topraktan izole edilen yüksek fitaz aktiviteli *Bacillus* sp. suşu ile klonlama çalışmalarına başlanmıştır. Ancak, *Bacillus megaterium* DSM319, *Bacillus megaterium* QM B1551 ve *Bacillus megaterium* WSH-002 suşlarının bütün genom sekansı NCBI veri bankasında bulunmasına rağmen bu sekansların içinde fitaza ait bir sekansa rastlanmamıştır. Bu amaçla çeşitli *Bacillus* türlerinden elde edilen sekanslar hizalanarak bir korunmuş bölge yakalanmaya ve çoğaltılmaya çalışılmış bu amaç için bir çifti dejenere olan 2 primer çifti hazırlanmıştır (Çizelge 3.7).

**Çizelge 3.7.** *Bacillus* sp.'ye ait fitaz sekanslarından faydalanarak hazırlanan primerler

İleri (forward) primer-a	5' - ATG AAG GTT CCA AAA ACA ATG CTG C- 3'	
Geri (reverse) primer-a	5' - CTA GCC GTC AGA ACG GTC TTT CAG C- 3'	
İleri(forward)primer-dejenere	5' - TAY CAC AGY CAR AAA ACM GG-3'	
Geri(reverse)primer-dejenere	5' - ACR ATT TTR AAR TTY TGA TT- 3'	
M=A/C	R=A/G	Y=C/T

### 3.2.5.2. Fitaz geninin PZR reaksiyonu ile çoğaltılması için kullanılan programlar ve koşullar

PZR reaksiyonu için 200 µL steril PZR tüpünün içerisinde 320 ng DNA, 1X PZR Tampon çözeltisi (75 mM Tris-HCl 25°C, pH 8.8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, %0,01 (v/v) Tween20), 200 µM dNTP Karışımı, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 ünite Taq DNA polimeraz, 0,4 µmol ileri primer, 0,4 µmol geri primer ve steril distile su son hacim 25 µL olacak şekilde karıştırılmıştır (Çizelge 3.8). Kullanılan primerlerin sekansları Çizelge 3.7'de verilmiştir. PZR döngü programları her 2 primer çifti için farklı olup Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10'da verilmiştir.

**Çizelge 3.8.** PZR koşulları

160 ng/µL DNA	2 µL
10 pmol/µL Forward Primer	1 µL
10 pmol/µL Reverse Primer	1 µL
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µL
10 mM dNTP	0,5 µL
5 U/µL Taq DNA polimeraz	0,25 µL
10X PZR Tamponu	2,5 µL
dH <sub>2</sub> O	16,25 µL
Toplam Hacim	25 µL

Taq DNA polimeraz enzimi sentezlenen DNA molekülüne 1 dakikada yaklaşık olarak 1000 baz eklemektedir. Yaklaşık olarak 1150 bazlık bir bölgenin amplifikasyonu sağlanmaya çalışıldığı için uzama aşaması (elongasyon) 1 dakika olarak belirlenmiştir.

Her iki primer çifti için primerlerin kalıp DNA'ya bağlandığı sıcaklıklar hesaplanmıştır. Fakat ileri primer-dejenere'nin kalıp DNA'ya yapıştığı sıcaklık değeri 45,6-53,8°C arasında iken, geri primer-dejenerede 35,4-43,6°C arasındadır. Bu değerler arasında ortak bir nokta bulunmadığı için daha düşük olan sıcaklık dereceleri seçilmesi gerekmektedir. Bu sebeple dejenere primerlerin T<sub>m</sub> (annealing temperature) değeri 40°C olarak belirlenmiştir.

**Çizelge 3.9.** İleri (forward) primer-a ve geri (reverse) primer-a'nın kullanıldığı PZR döngü programı

PZR döngü programı (A)		
94 °C	5 dakika	1 siklus
94 °C	1 dakika	34 siklus
38 °C	1 dakika	
72 °C	1 dakika	
72 °C	5 dakika	1 siklus

**Çizelge 3.10.** İleri (forward) primer-dejenere ve geri (reverse) primer-dejenere'nin kullanıldığı PZR döngü programı

PZR döngü programı (Dejenere)		
94 °C	5 dakika	1 siklus
94 °C	1 dakika	34 siklus
40 °C	1 dakika	
72 °C	1 dakika	
72 °C	5 dakika	1 siklus

### 3.2.5.3. PZR ürününün agaroz jel elektroforezi ile kontrolü

PZR ürününün görüntülenmesi %1,5 agaroz jel elektroforezi ile yapılmıştır (bkz. Çizelge 3.6) (Çizelge 3.11). Çünkü küçük boya sahip olan DNA parçalarının daha iyi ayrışması için agaroz jel konsantrasyonunun artırılması gerekir. 5 µL'lik yükleme boyası (Gel loading dye blue 6X, New England Biolabs Inc.) ile 25 µl'lik PZR ürünleri %1,5 'luk agaroz jele yüklenmiş ve Çizelge 3.6'da belirtilen 1X TBE tamponu içerisinde 100 volt akımda yaklaşık olarak 2 saat yürütülmüştür. İlk kuyucuğa 10 µL uzunluk markörü (100bp DNA ladder, New England Biolabs Inc.) yüklenmiştir. Elde edilen bantlar jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

**Çizelge 3.11.** PZR ürünün görüntülenmesinde kullanılan %1,5'luk agaroz jel içeriği

%1,5 Agaroz Jel İçeriği	Miktar
1X TBE tamponu	100 mL
Agar	1,5 g
Etidyum Bromid (20 mg/mL)	5 µL

#### **3.2.5.4. PZR ürününün agaroz jelden elde edilmesi**

Agaroz jel UV transimilatörde incelenmiştir. UV uygulaması esnasında göz ve bedenin UV ışınlarına maruz kalmaması için gerekli tedbirler alınmıştır. Beklenen moleküler ağırlıkta oluşan DNA bandı temiz bir bistüri ile dikkatli bir şekilde kesilerek alınmış ve QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) kullanılarak agarozdan temizlenmiştir.

QIAquick Gel Extraction Kit Protokolü

-UV transimilatör üzerindeki agaroz jelden DNA fragmanı temiz bir bistüri yardımıyla mümkün olduğunca az jel içerecek şekilde kesilerek çıkartılmıştır.

-Kesilen jel mikrosantrifüj tüpüne konularak tartılmıştır. Jelin ağırlığının 400 mg'dan daha fazla olmamasına dikkat edilmiştir. Fazla olduğu durumlarda birden fazla mikrosantrifüj tüpü kullanılmıştır.

-Mikrosantrifüj tüpüne konulan jelin ağırlığının 3 katı hacimde Buffer QG eklenmiştir. Bu aşamada 100 mg jelin hacmi 100 µL olarak kabul edilmiştir.

-Mikrosantrifüj tüpü 50°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Jelin çözünmesinin kolaylaştırılması için mikrosantrifüj tüpü her 2 - 3 dakikada bir vortekslenmiştir.

-Jel tamamen çözüldükten sonra mikrosantrifüj tüpüne konulan jelin ağırlığının 1 katı hacimde %100'lük izopropanol eklenmiştir. Bu aşamada da 100 mg jelin hacmi 100 µL olarak kabul edilmiştir.

-QIAquick spin kolonu, 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

-Mikrosantrifüj tüpündeki içerik iyi bir şekilde karıştırıldıktan sonra mikropipetle çekilerek kolona aktarılmış ve 15 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek DNA'nın kolona bağlanması sağlanmıştır.

-Santrifüj sonrasında toplama tüpüne süzülen sıvı atılmıştır. Kolon hacmi 800 µL olduğu için mikrosantrifüj tüpündeki karışımın hacmi 800 µL'den fazla olduğu durumlarda içeriğin önce 800 µL'lik kısmı santrifüj edilip, süzülen sıvı atılmış daha sonra diğer kalan kısmı santrifüj edilip, süzülen sıvı atılmıştır.

-DNA'yı izopropanol'den arındırmak için kolona 750 µL Buffer PE eklenmiş ve 15 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilip, toplama tüpüne süzülen sıvı atılmıştır. Daha sonra boş kolon 15 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

-Toplama tüpü atılırken, kolon 1,5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.

-Kolona, membranına zarar vermeyecek şekilde 25 µL Elution Buffer (Buffer EB) eklenmiş ve oda sıcaklığında 4 dakika beklenmiş, sonrasında 15 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve mikrosantrifüj tüpüne süzülen PZR ürünü -20°C'de saklanmıştır.

### **3.2.5.5. Agaroz jelden izole edilen PZR ürünün konsantrasyonu ve saflık derecesinin spektrofotometrik yöntemler ile tespiti**

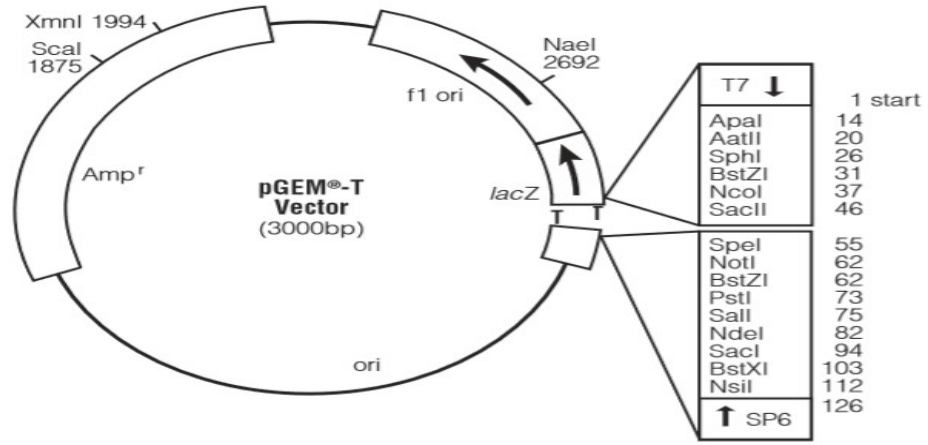
Agaroz jelden izole edilen PZR ürünün konsantrasyonu ve saflık derecesi spektrofotometrik yöntemlerle ölçülmüştür. QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) içeriğinde bulunan Elution Buffer (Buffer EB) kör olarak kullanılmış ve 230-260-280 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır.

### **3.2.6. Fitaz enzim geninin *E.coli*'de klonlanması**

Fitaz enzimi genleri T-A klonlama yöntemiyle *E.coli*'de klonlanmıştır. T-A klonlama yöntemi Taq DNA polimeraz gibi 3' >>> 5' ekzonükleaz aktivitesi olmayan DNA polimerazlarla yapılan PZR çoğaltımı sırasında çoğaltılan DNA'ların 3' ucuna fazladan bir adenin bazı eklenmesine dayalıdır. PZR ürünü olan ve 3' ucunda fazladan bir adenin bazı bulunan DNA'lar, 3' ucunda bir tane timin bazı taşıyan T-A klonlama vektörleri olarak adlandırılan plazmidlerle birleştirilmiştir. PZR ürünlerinin DNA ligaz enzimi yardımıyla plazmid vektörlerine klonlanması sağlanmıştır.

#### **3.2.6.1. pGEM®-T Easy vektörüne PZR ürünün klonlanması**

3 µL agaroz jelden izole edilen PZR ürünü, 50 ng pGEM®-T Easy vektörü (Promega) (Şekil 3.2), 1X Ligaz Tampon çözeltisi (Promega) ve 3 ünite T4 DNA Ligaz enzimi (Promega) son hacim 10 µL olacak şekilde PZR tüpüne konulmuştur (Çizelge 3.12). Karışım iyi bir şekilde mikropipet ile pipetajlanarak, 4°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ligasyon ürününün transformasyonu yapılmaya kadar 4 °C'de muhafaza edilirken, kullanılmayan kısmı daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.



**Şekil 3.2.** pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) vektörü ve sekans referans noktaları

**Çizelge 3.12.** Ligasyon reaksiyonu koşulları

Ligasyon protokolü	
2X ligasyon tampon çözeltisi	5µL
pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vektörü (50 ng)	1µL
PZR ürünü (100 ng/µL)	3µL
T4 DNA ligaz enzimi (3 U/µL)	1µL
Toplam Hacim	10µL

### 3.2.6.2. Konukçu *E. coli*'nin alıcı hücre haline getirilmesi

Kompetan hücreler Fredrick ve Helmann, 1994 prosedürüne uygun olarak hazırlanmıştır. Bu amaçla *E. coli* DH5α suşu Çizelge 3.13'de belirtilen LB agarlı katı besi yerine ekilerek 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. LB agarlı besiyerinde gelişen tek kolonilerden seçilerek 2 mL'lik Çizelge 3.14'de LB ortamına ekim yapılmış ve yine 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Gece boyu inoküle edilmiş olan kültürlerden 1 mL alınarak yeni hazırlanmış 100 mL'lik Çizelge 3.14'de belirtilen LB ortamına aktarılmış ve A590 nm değeri 0,375 olana kadar 37°C ve 250 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır (Maniatis ve ark. 1982, Inoue ve ark. 1990).



LB ortamında gelişen kültürler önceden soğutulmuş olan 50 mL'lik falkon tüplerine aktarılarak buzda 20 dakika bekletilmiş ve daha sonra +4°C'de 5 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonraki aşamalarda hücrelerin sürekli soğukta kalmasına dikkat edilmiştir. Üst sıvı atıldıktan sonra çökelti Çizelge 3.15'de belirtilen 6 mL soğuk 0.1M CaCl<sub>2</sub> ile karıştırmış ve 30 dakika buzda bekletilmiştir. Bu işlem sonrasında +4°C'de 5 000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmış ve üst sıvı atılmıştır. Daha sonra çökeltiye 1,6 mL soğutulmuş %15'lik gliserol içeren 0.1M CaCl<sub>2</sub> eklenmiştir (Çizelge 3.15). 24 saat boyunca buzda bekletildikten sonra hazır olan hücreler transformasyon için kullanılmışlardır. Böylece *E. coli* DH5α suşu rekombinant plazmitin aktarımı için alıcı hale getirilmiştir.

**Çizelge 3.13.** Kompetan DH5α hücreleri hazırlanmasında kullanılan katı besiyeri

LB agarlı besiyeri	g/L
Tripton	10
NaCl	10
Yeast extract	5
Agar	15
pH	7.0

**Çizelge 3.14.** Kompetan DH5α hücreleri hazırlanmasında kullanılan sıvı besiyeri

LB besiyeri	g/L
Tripton	10
NaCl	10
Yeast extract	5
pH	7.0

CaCl<sub>2</sub> ve gliserol içeren çözeltilerin hazırlanışı Çizelge 3.15'de verilmiştir. LB besiyeri, LB agarlı besiyeri ve %50'lik gliserol çözeltisinin sterilizasyonu 121°C'de 40 dakika otoklavlanarak sağlanmıştır. 1M'lık CaCl<sub>2</sub> çözeltisinin sterilizasyonu ise 0,22 µm filtre ile sağlanmıştır.

**Çizelge 3.15.** CaCl<sub>2</sub> ve gliserol içeren çözeltilerin hazırlanışı

0,1M CaCl <sub>2</sub>	Miktar
1M CaCl <sub>2</sub> dH <sub>2</sub> O	100 mL 900 mL

%15'lik gliserol içeren 0.1M CaCl <sub>2</sub> çözeltisi	Miktar
1 M CaCl <sub>2</sub> %50'lik gliserol çözeltisi dH <sub>2</sub> O	100 mL 300 mL 600 mL

1M CaCl <sub>2</sub>	Miktar
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O dH <sub>2</sub> O	147 g 1000 mL

%50'lik gliserol çözeltisi	Miktar
Gliserol dH <sub>2</sub> O	50 mL 100 mL

### 3.2.6.3. Rekombinant plazmitin kompetan hücelere transformasyonu

*E. coli* DH5 $\alpha$  kompetan hücelere pGEM<sup>®</sup>-T Easy vektörüne klonlanmış olan gen transforme edilmiştir. Bu amaçla kuru buz dolu bir kaba 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpü yerleştirilmiştir. Buz içindeki mikrosantrifüj tüpüne 5 mL ligasyon ürünü ve 100 mL kompetant hücre konulmuş ve mikrosantrifüj tüpü 30 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra mikrosantrifüj tüpüne 42°C'de 90 saniye ısı şoku verilip hücre yüzeyindeki porların açılması sağlanmıştır. Bu işlem sonunda mikrosantrifüj tüpü tekrar buza alınarak 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra mikrosantrifüj tüpüne önceden hazırlanmış steril ve 37°C'de bekletilmiş 500 mL'lik LB besiyeri (bkz. Çizelge 3.14) eklenerek 37°C ve 200 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.

### 3.2.6.4. Transformasyonun gerçekleştiği hucresinin belirlenmesi

Transformasyon, ilk olarak hucresinin ampisilin içeren ortamda buymesi; ikinci olarak da IPTG (laktoz analogu) ile aktive olan  $\beta$ -Galaktosidaz'ın X-Gal kimyasalını substrat olarak kullanması sonucu mavi kolonilerin oluşması ile kontrol edilmiştir. Bu amaçla Xgal, IPTG ve ampisilin içeren LB agar besiyeri hazırlanıp, karıştırılmış ve steril koşullar altında petrilere doklmüştür (izelge 3.16). Bu petrilere inkübasyon sonrasında transformasyonu gerçekleştirilen kültürden 200  $\mu$ L örnek drigalski öze yardımı ile steril koşullar altında yayılmıştır. Bu petrilere 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Ampisilin solüsyonunun pH'sının ayarlanmasında 1M NaOH solüsyonu kullanılmıştır. IPTG ve ampisilin solüsyonunu 0,22  $\mu$ m por çapına sahip filtreden geçirilerek steril edilmiştir. IPTG, ampisilin ve Xgal solüsyonları ışık görmeyecek şekilde -20°C'de muhafaza edilmiştir.

**Çizelge 3.16.** Transformasyonun gerçekleştiğinin belirlenmesi amacı ile hazırlanan besiyeri

Xgal, IPTG ve ampisillin içeren LB agar besiyeri	Miktar
LB agar besiyeri	250 mL
Xgal solüsyonu	500 $\mu$ L
IPTG solüsyonu	250 $\mu$ L
Ampisilin solüsyonu	250 $\mu$ L

LB agar besiyeri	g/L
Tripton	10
NaCl	10
Yeast extract	5
Agar	15
pH	7.0

IPTG solüsyonu	Miktar
IPTG	0.119 g
dH <sub>2</sub> O	5 mL

Xgal solüsyonu	Miktar
Xgal	0.1 g
DMF	5 mL

**Çizelge 3.16.** Transformasyonun gerçekleştiğinin belirlenmesi amacı ile hazırlanan besiyeri (devam)

Ampisilin solüsyonu	Miktar
Ampisilin dH <sub>2</sub> O	1 g 100 mL
pH	8.5

1M NaOH solüsyonu	Miktar
NaOH dH <sub>2</sub> O	40 g 1000 mL

### 3.2.6.5. Transformasyonun gerçekleştiği kolonilerin seçimi ve deney tüplerine ekim

Transformasyon, hücrelerin ampisilin içeren besiyerinde büyümesi ve X-Gal kimyasalının substrat olarak kullanımı (IPTG ile aktive edilen  $\beta$ -Galaktosidaz aktivitesi) sebebiyle mavi kolonilerin oluşması ile kontrol edilmiştir.

18 saat inkübasyon sonrasında oluşan pozitif koloniler (beyaz) seçilmiş ve ampisilin içeren 10mL'lik LB besiyeri içeren deney tüplerine steril koşullarda ekimi yapılmıştır. Deney tüpleri 37°C ve 200 rpm'de 18 saat inoküle edilmiş ve böylece transformasyon olan hücrelerin stokları oluşturulmuştur (Çizelge 3.17).

**Çizelge 3.17.** Transformasyonu gerçekleştiren kolonilerin stoklarının oluşturulmasında kullanılan besiyeri

Ampisilin içeren LB besiyeri	Miktar
LB besiyeri	250 mL
Ampisilin solüsyonu	250 $\mu$ L

LB besiyeri	g/L
Tripton	10
NaCl	10
Yeast extract	5

### 3.2.6.6. Transformasyonu gerçekleşen hücrelerden plazmid izolasyonu

Transformasyon olan hücrelerin stoklardan alınan hücreler çökertilmiş ve QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) kullanılarak üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde hücrelerin plazmidleri izole edilmiştir.

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) protokolü

-Transformasyonu olan hücre stoğundan alınan 4,5 mL'lik hücre kültürünün çökeltisi 15 000 rpm'de 3 dakika tekrarlı olarak santrifüj edilerek 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne toplanmış ve üst sıvılar atılmıştır.

-Mikrosantrifüj tüpüne 250 µL Buffer P1 eklenerek pipetaj yapılarak hücrelerin iyi bir şekilde çözülmesi sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra eklenecek olan iki tamponun toplam eklenme süresinin kısa tutulmasına dikkat edilmiştir.

-Mikrosantrifüj tüpüne 250 µL Buffer P2(Lysis Buffer) eklenerek, hızlı bir şekilde vortekslenmiştir.

-Mikrosantrifüj tüpüne 350 µL Buffer N3(Neutralization Buffer) eklenerek, hızlı bir şekilde vorteks yapılmıştır.

-Mikrosantrifüj tüpü 15 000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

-Kit içeriğindeki spin kolon, toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

-Mikrosantrifüj tüpündeki üst sıvı dikkatli bir biçimde mikropipet ile çekilerek kolona aktarılmıştır. Bu aşamada kolona çökeltinin de aktarılmamasına dikkat edilmiştir.

-Kolon 15 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve toplama tüpündeki sıvı atılmıştır.

-Kolona 500 µL Buffer PB (Binding Buffer) eklenerek, 15 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve toplama tüpüne süzölen sıvı atılmıştır.

-Kolona 750 µL Buffer PE (Wash Buffer) eklenmiştir.

-Kolon 15 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve toplama tüpüne süzölen sıvı atılmıştır.

-Boş kolon 15 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve toplama tüpü atılmıştır.

-Kolon, 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.

-Kolon membranına zarar vermeden kolona 50 µL Buffer EB (Elution Buffer) eklenerek, 1 dakika beklenmiştir.

-15 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

- Kolon atılmıştır. Çünkü izole edilen plazmit mikrosantrifüj tüpüne süzölmüştür.

Mikrosantrifüj tüpünde izole edilen plazmitin konsantrasyonu ve saflık derecesi spektrofotometrik yöntemler ile belirlenmiştir. Bu amaçla QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) içeriğinde bulunan Buffer EB (Elution Buffer) kör olarak kullanılmış ve 230-260-280 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır.

### 3.2.6.7. İzole edilen rekombinant plazmidlerin görüntülenmesi

İlgili DNA fragmentinin plazmit DNA'sına entegre olduğunu göstermek için izole edilmiş olan rekombinant plazmit DNA'sının konsantrasyonuna bağlı olarak hesaplamalar yapılmış ve *EcoRI* enzimi ile kesim yapıp agaroz jel elektroforezi ile beklenen boydaki bantlar tesbit edilmiştir. Bu işlemde 9 PZR tüpü kullanılmıştır. Her PZR tüpünün 1000 ng plazmit DNA'sı içermesine dikkat edilmiş ve hesaplamalar bu doğrultuda yapılmıştır. 1000 µg plazmit DNA'sı, 1X CutSmart Tampon Çözeltisi (New England Biolabs), 10 Ünite *EcoRI* restriksiyon enzimi (New England Biolabs) ve PZR suyu son hacim 25 µL olacak şekilde hazırlanmıştır ( Çizelge 3.18). Hazırlanan PZR tüpleri 37°C'de 120 dakika bekletilerek *EcoRI* restriksiyon enziminin kesim yapması sağlanmış daha sonra 65°C'de 20 dakika bekletilerek *EcoRI* restriksiyon enziminin inaktivasyonu sağlanmıştır.

**Çizelge 3.18.** PZR tüplerindeki plazmit DNA'sı, PZR suyu ve PZR karışımı miktarları

Plazmit no	Plazmit konsantrasyonu (ng/µL)	PZR tüp no	PZR tüpüne eklenen miktar		
			Plazmit DNA'sı (µL)	PZR suyu (µL)	PZR karışımı (µL)
1-1	143.1	1-1	7	3	15
1-2	214.4	1-2	4.7	5.3	15
1-3	201.1	1-3	5	5	15
2-1	238.8	2-1	4.2	5.8	15
2-2	154.2	2-2	6.5	3.5	15
2-3	181.3	2-3	5.5	4.5	15
3-1	190.9	3-1	5.2	4.8	15
3-2	177.6	3-2	5.6	4.4	15
3-3	133.8	3-3	7.5	2.5	15
			Toplam hacim		25 µL

**Çizelge 3.18.** PZR tüplerindeki plazmit DNA'sı, PZR suyu ve PZR karışımı miktarları (devam)

PZR karışımı içeriği	Miktar ( $\mu\text{L}$ )
10X CutSmart Buffer	2,5
PZR suyu	11,5
10 U/ $\mu\text{L}$ <i>EcoRI</i> restriksiyon enzimi	1
Toplam Hacim	15

5  $\mu\text{L}$ 'lik yükleme boyası (Gel loading dye blue 6X, New England Biolabs Inc.) ile 25  $\mu\text{L}$ 'lik PZR ürünleri %1,5'luk agaroz jele yüklenmiştir (bkz. Çizelge 3.6) (bkz. Çizelge 3.11). Daha sonra 1X TBE tamponu içerisinde 100 volt akımda yaklaşık olarak 2 saat yürütülmüştür (bkz. Çizelge 3.6). İlk kuyucuğa da 6  $\mu\text{L}$  uzunluk markörü (100bp DNA ladder, New England Biolabs Inc.) yüklenmiştir. Elde edilen bantlar jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir. Küçük boya sahip olan DNA parçalarının daha iyi ayrışabilmesi için agaroz jelin konsantrasyonunun artırılması gerektiği için PZR ürününün görüntülenmesinde %1,5'luk agaroz jel elektroforezi tercih edilmiştir.

### 3.2.7. Sekanslama

Sekanslatma işlemi 600 ng izole edilmiş plazmid (pGEM<sup>®</sup>-T easy vektörüne klonlanmış gen parçası) gönderilerek yapılmıştır. İzole edilen plazmidler ABI prism-310 Genetic Analyzer cihazı ve T7 primeri kullanılarak sekanslatılmıştır (RefGen, Ankara). Böylece klonlanan genlerinin sekansları saptanmış olacaktır. Saptanan sekansın NCBI data bankası kullanılarak literatür analizi yapılmıştır (Zhang ve Madden 1997).

## 4. BULGULAR

### 4.1. Fitaz pozitif bakterilerin kalitatif tayini

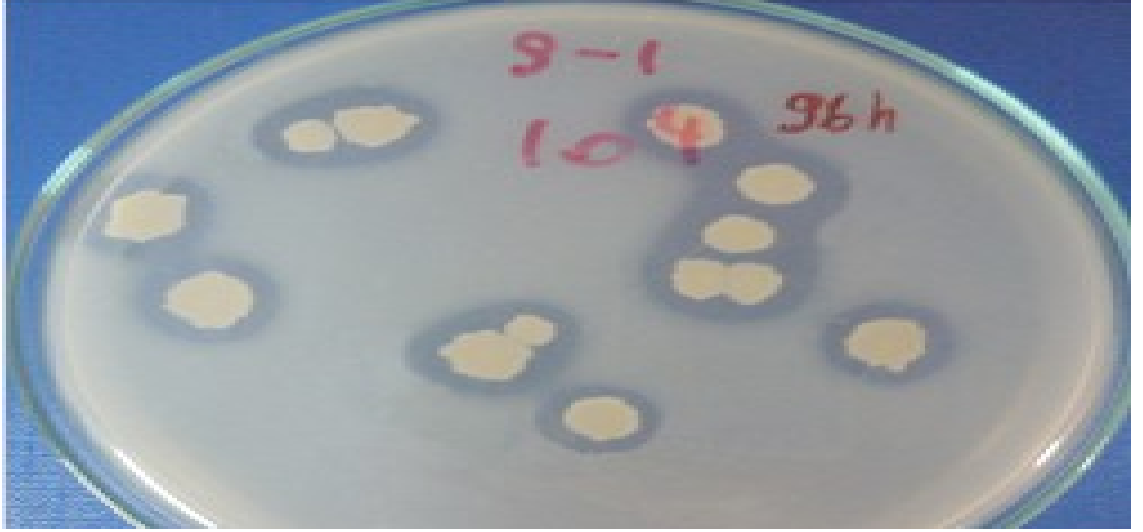
Türkiye'nin 30 farklı ilinden alınan toprak örneklerinden 300 adet bakteri izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin *Bacillus* cinsine ait olup olmadığını belirlemek üzere biyokimyasal ve morfolojik testler yapılmış, bu testlerin sonucunda 236 adet bakterinin *Bacillus* sp. olduğu ve bu suşların fitaz enzim potansiyellerine bakıldığında 19 tanesinin 120. saat sonucunda, 6 tane zayıf açıklıkta çevresel hidrolitik zonlu (2-4 mm), 10 tane orta açıklıkta çevresel hidrolitik zonlu (5-8 mm), 3 tane geniş açıklıkta çevresel hidrolitik zonlu bölgelere (9-11 mm) sahip olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** Fitaz pozitif *Bacillus* sp.'lerin fitaz zonu çapları

Bakteri No	İller	Koloni Çapı (mm)	Zon Çapı (mm)
2-1	Bilecik	3,2	5
2-2	Bilecik	3,2	3,5
3-6	Kırklareli	2,8	3
4-8	Kayseri	2	2,2
5-4	Manisa	4	4,5
5-5	Manisa	3	3,1
<b>9-1</b>	<b>Trabzon</b>	<b>7</b>	<b>11</b>
9-9	Trabzon	2,8	3
10-8	Tunceli	4,2	6
14-3	Balıkesir	4,5	7,5
14-5	Balıkesir	5	6,5
14-6	Balıkesir	4,8	7,8
15-7	Hatay	6,5	8
15-9	Hatay	6,8	7,3
18-7	Bartın	6,2	6,5
19-4	Edirne	6,1	9
19-9	Edirne	5	9
23-1	Sivas	5,5	5,6
23-2	Sivas	5,1	8



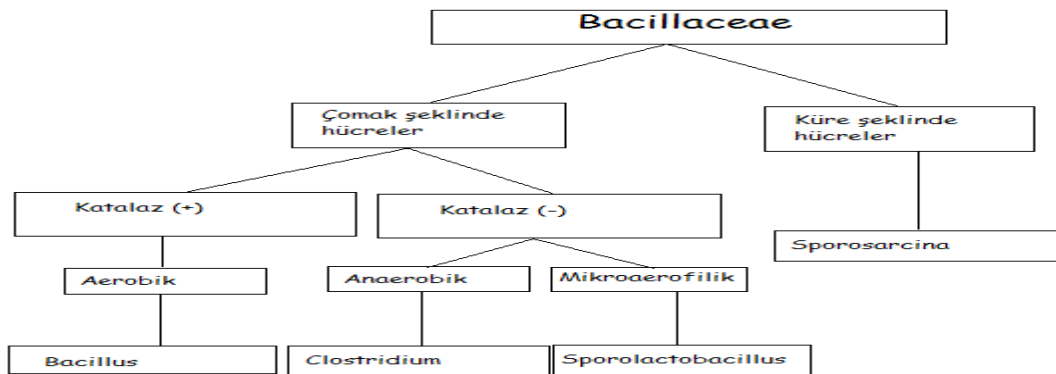
Bu suşlar arasında en geniş zonu (11 mm zonu) gösteren suş *Bacillus* sp. EBD 9-1 olarak adlandırılmıştır. Fitaz pozitif özellik gösteren izolatın besiyerindeki görüntüsü Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1. Fitaz üreten *Bacillus* sp. EBD 9-1'in PSM ortamındaki görüntüsü

#### 4.2. *Bacillus*'un taksonomik sınıflandırması için morfolojik ve fizyolojik özelliklerin belirlenmesi

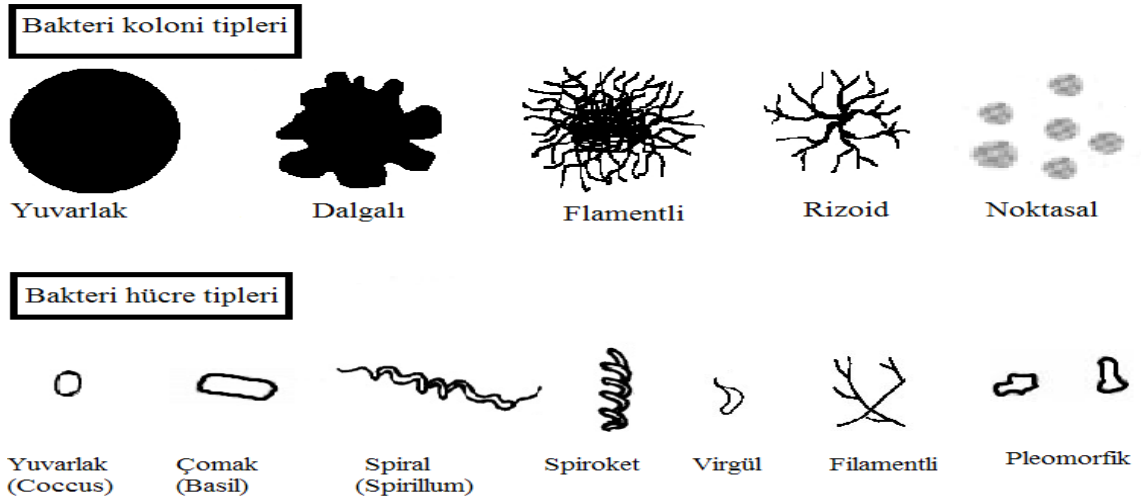
Genel olarak *Bacillus* cinsini belirlemek amacıyla aşağıdaki tayin anahtarı kullanılmaktadır (Şekil 4.2).



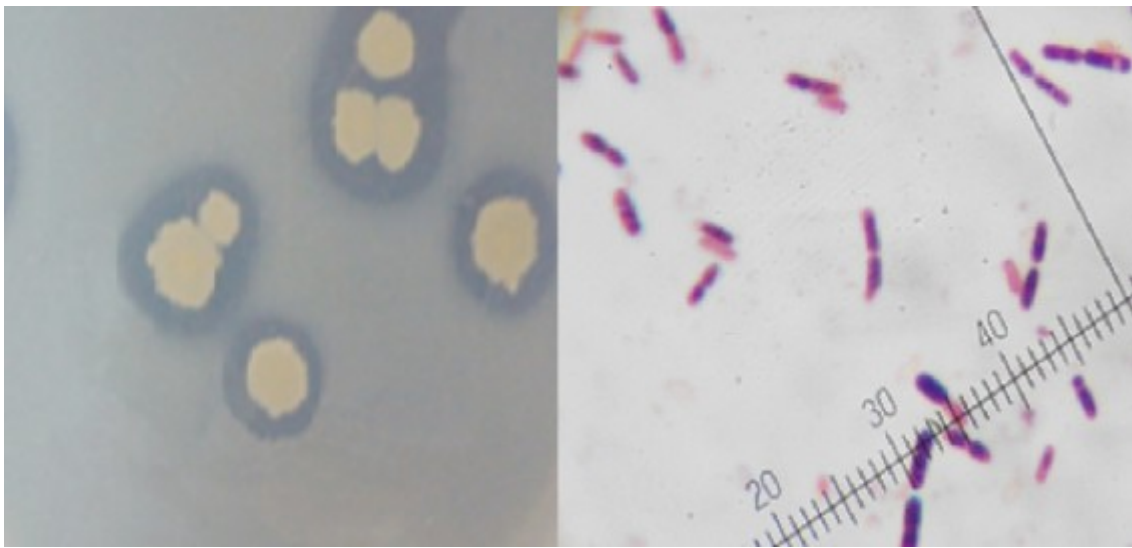
Şekil 4.2. *Bacillus* sp. izolatlarının taksonomik özellikleri (Buchanan ve Gibbons 1974)

#### 4.2.1. Koloni ve hücre morfolojisi

Bakteriler, farklı karakteristik koloni ve hücre tiplerine sahiptirler (Şekil 4.3). Çalışmamızda elde ettiğimiz bakterilerin noktasal, filamentli ve dalgalı koloni tipi özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak en yüksek fitaz aktivitesinin görüldüğü *Bacillus* sp. EBD 9-1 suşunda dalgalı koloni tipi görülmüştür. Olympus CH-2 markalı ışık mikroskopunda yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda ise bakterilerin hepsinin hücre tipinin çubuk (basil) şeklinde olduğu görülmüştür (Şekil 4.4).



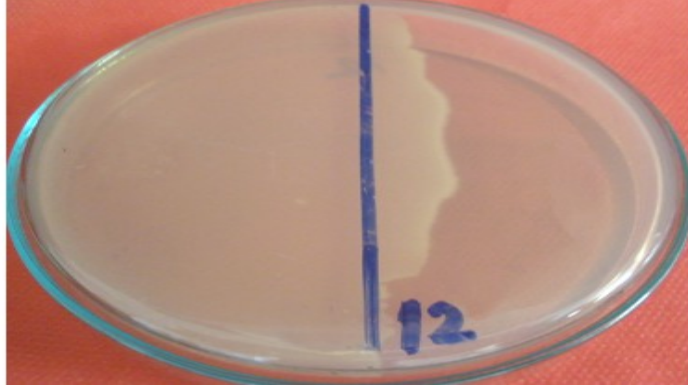
Şekil 4.3. Bakteri koloni ve hücre morfolojisi



Şekil 4.4. *Bacillus* dalgalı koloni tipi ve basil (çubuk) hücre tipi

#### 4.2.2. Hareketlilik testi

3.2.2.1'e göre yapılan hareketlilik testi sonucunda tüm bakterilerin hareketli olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Petrideki yumuşak agarlı besiyerinde hareketlilik kontrolü

#### 4.2.3. Katalaz testi

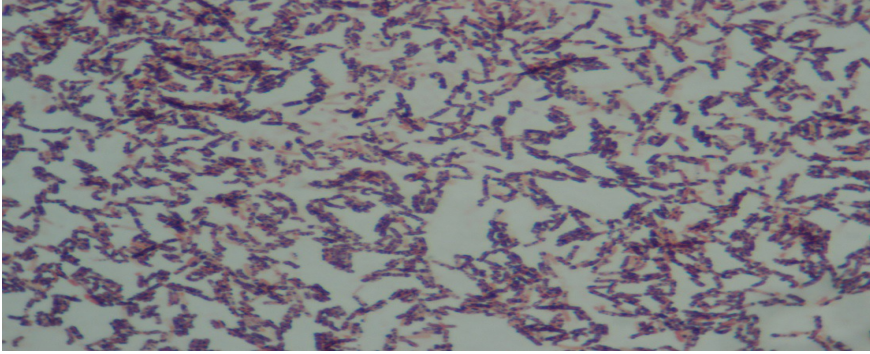
Katalaz oksidoredüktaz grubu bir enzim olup oksijene maruz kalan hemen hemen tüm canlılarda bulunur. Dolayısıyla aerobik olan *Bacillus* türleri tarafından da yaygın olarak sentezlenirler. Bu enzim ortamdaki hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ), su ve oksijene ayırmaktadır. 3.2.2.2' ye göre yapılan katalaz testinde, katı bakteri kültürüne %3'lük hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) damlatıldığında, ortamda katalaz varlığında açığa çıkan serbest oksijen, gaz kabarcıkları halinde gözlenir. Gaz kabarcıklarının çıkışı, hidrojen peroksitin ayrışmasını dolayısıyla da katalaz varlığını gösterdiğinden tüm bakteriler katalaz(+) olarak değerlendirilmiştir(Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Katalaz pozitif testinin petrideki görüntüsü

#### 4.2.4. Gram boyama

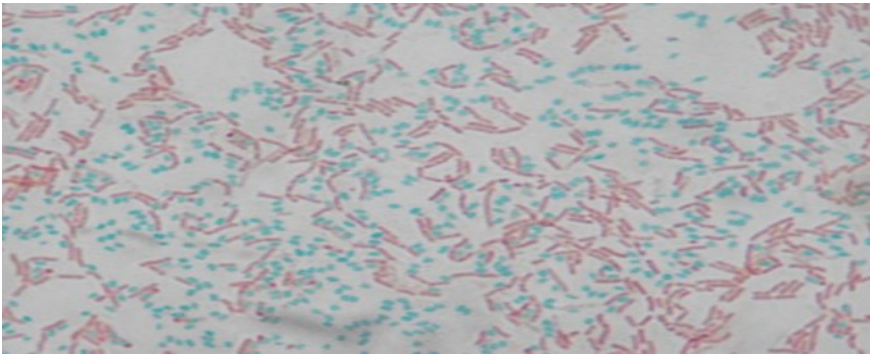
Bakterilerin tanımlanmasında önemli bir belirteç olan gram boyama 3.2.2.3'e göre yapılmış olup, gram boyama deneyinde ilk boya olan kristal viyoleyi hücre içinde tutabilen bakteriler Gram(+) olarak kabul edilmiş olup, gram boyama deneyine tabi tutulan tüm bakteriler Olympus CH-2 marka ışık mikroskopunda, 10x100'lük objektifte, immersiyon yağı ile incelendiğinde mor menekşe bir renk göstererek, Gram(+) olarak değerlendirilmişlerdir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Işık mikroskopunda bakterilerinin görünümü (100X)

#### 4.2.5. Spor boyama

Endospor oluşumu Bacillaceae familyasının tipik özelliği olup, bu familyanın üyeleri olan *Bacillus* ve *Clostridium* cinsi bakterilerde görülmektedir. Spor boyama 3.2.2.4'e göre yapılmış olup, denemeye alınan tüm bakterilerin sporlu oldukları ve yeşile boyandıkları belirlenmiştir. Vejetatif hücreler ise pembe-kırmızıya boyanmıştır. İncelemeler Olympus CH-2 marka ışık mikroskopunda, 10x100'lük objektifte, immersiyon yağı ile yapılmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Bakterilerin spor boyama sonrası görünümü (100X)

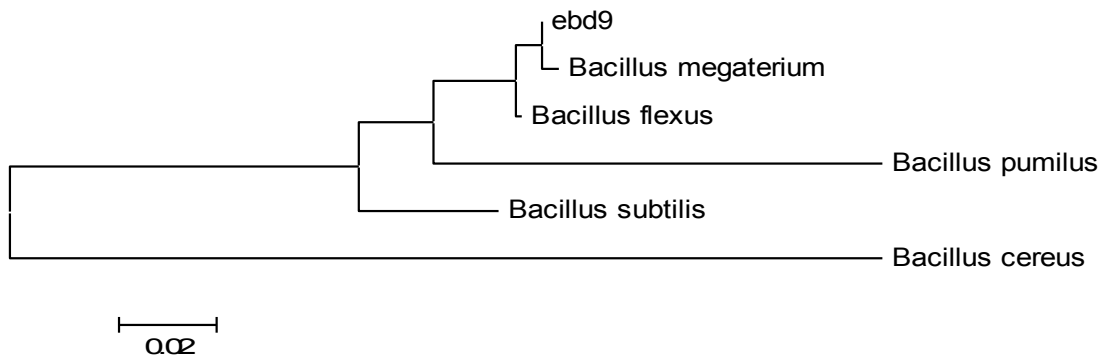
İzole edilen bakterilerin *Bacillus* cinsine ait olduğunun belirlenmesi için Çizelge 4.2'de verilen testler yapılmıştır. Bu testler sonucunda tüm bakterilerin *Bacillus* cinsine ait olduğu görülmüştür. En yüksek fitaz aktivitesinin saptandığı *Bacillus* sp. EBD 9-1 suşunun test sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** *Bacillus* cinsinin belirlenmesinde kullanılan morfolojik testler ve test sonuçları

Uygulanan testler	<i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1
Koloni tipi	Dalgalı
Hücre şekli	Basil(Çomak)
Gram boyama	+
Katalaz testi	+
Hareketlilik testi	+

#### 4.3. 16S rRNA Analizi

*Bacillus* cins düzeyinde tespit edildikten sonra, RefGen-Biyoteknoloji (Ankara) tarafından yapılan 16S rRNA dizi analizi sonucunda *Bacillus* sp. EBD 9-1 suşunun dizini gen bankasında karşılaştırılmış ve *Bacillus megaterium* ile %100 benzerlik gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.9). Bu sebeple yeni izole ettiğimiz bakteri *Bacillus megaterium* EBD 9-1 olarak adlandırılmıştır. *Bacillus megaterium* EBD 9-1 suşunun 16S rRNA analizini yapmak için bu gen bölgesine özel 27F (Çizelge 4.3) ve 1492R (Çizelge 4.4) primerleri kullanılmıştır. *Bacillus megaterium* EBD 9-1 suşunun 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisinin bir bölümünün gösterildiği kromotogram Şekil 4.10'da verilmiştir.



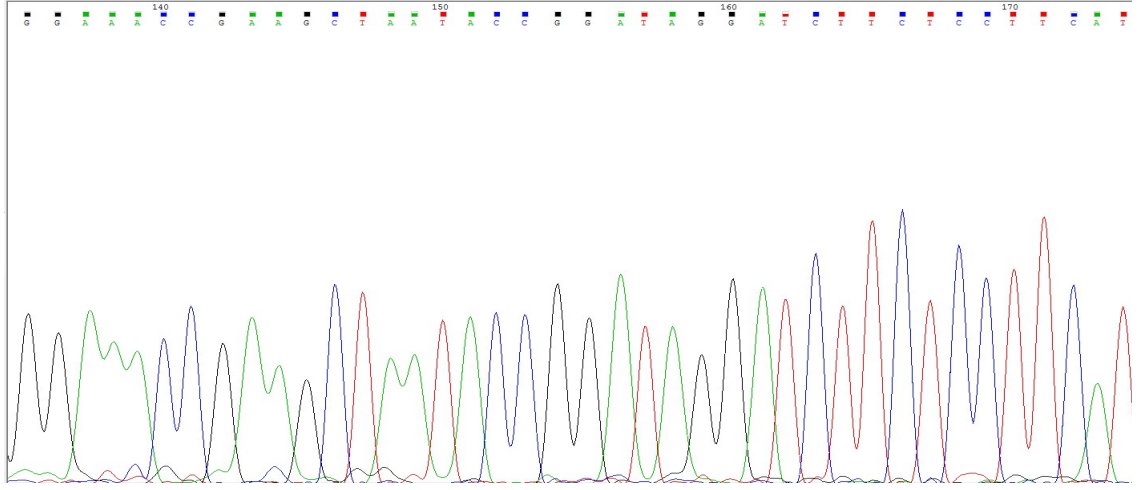
**Şekil 4.9.** *Bacillus megaterium* EBD 9-1 suşunun 16S rRNA bölgelerinin filogenetik ağacı

**Çizelge 4.3.** *Bacillus* sp. 9-1 suşunun 27F primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

```
GGGCGAACAAGGGTAACCCGGTAGAAGTTTGATCATCGGCTCAGAGAAGTC
GTAACAATGGTCACCAGTAAGAGTTTGCGGCGGACGGGTGAGTACCACGTG
GGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACC
GGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATC
ACTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA
CCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTT
TCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGC
TCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCG
TGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAGCGGAA
TTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGAGGACACCAGTGCGAAG
CGCTTTTCGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAGCGTGGGGAGCAACAG
GATAGATAACCCTGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG
```

**Çizelge 4.4.** *Bacillus* sp. 9-1 suşunun 1492R primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

```
TTGGGCCCTGGTTCAACTCCAAATGGGTTACCTTGTTACGACTTGCTGAGCA
TGATCATACTCTACTGGTTATCTGTTGCTGCGTCCGGAGGCGTGATCAAGGC
CCGGGAACGTATTCGCCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAG
CTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGTTTTATGG
GATTGGCTTGACCTCGCGGTCTTGCAGCCCTTGTACCATCCATTGTAGCAC
GTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTT
CCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGC
AACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG
ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCCGAAGGG
GAACGCTCTATCTCTAGAGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCT
TCGCGTTGCTTCGAATTAACCA
```



**Şekil 4.10.** *Bacillus megaterium* EBD 9-1 suşunun 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisinin bir bölümünün kromotogramı

#### 4.4. Fitaz enzim genin izolasyonu ve kontrolü

##### 4.4.1. *Bacillus megaterium* EBD 9-1 suşundan genomik DNA'nın izolasyonu

En yüksek fitaz aktivitesi saptanan *Bacillus megaterium* EBD 9-1 suşunun saf kültürünün optik yoğunluk (OD) değeri 600 nm dalga boyuna yaklaşık olarak 4 saatte ulaşmıştır. Daha sonra 3.2.4.1'e göre yapılan DNA ekstraksiyonu sonucunda 9-1-1, 9-1-2 ve 9-1-3 olarak adlandırılan 3 mikrosantrifüj tüpüne kromozomal DNA izole edilmiştir. İzole edilen kromozomal DNA, G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit [for bacteria] içeriğinde bulunan Elution Buffer içerisinde, ileri manipülasyonlarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

##### 4.4.2. İzole edilen genomik DNA'nın konsantrasyonu ve saflık derecesinin spektrofotometrik ölçümler ile tespiti

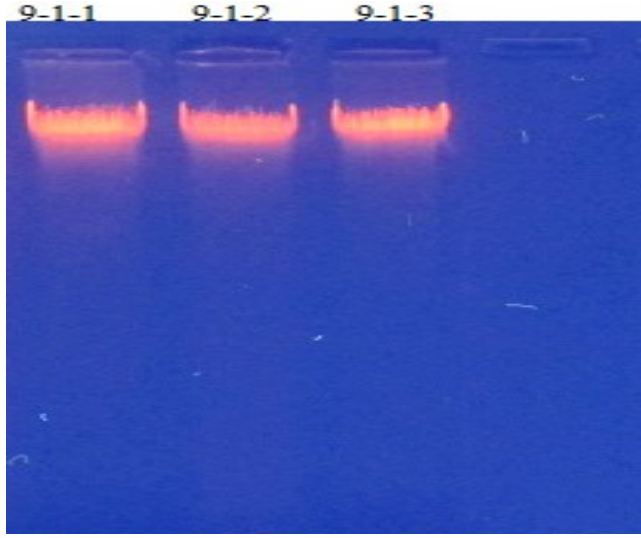
9-1-1, 9-1-2 ve 9-1-3 olarak adlandırılan genomik DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflık derecesi 3.2.4.2'e göre yapılan spektrofotometrik yöntemlerle ölçülmüştür. Bu ölçümlerde G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit [for bacteria] içeriğinde bulunan Elution Buffer kör olarak kullanılmış ve 230-260-280 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır. Ölçüm sonuçları Çizelge 4.5'de verilmiş olup, örneklerin  $A_{260}/A_{280}$  oranı (260 nm'deki absorbans değerinin 280nm'deki absorbans değerine oranı) ~1,8 olduğu için örneklerin saflık derecesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.5.** İzole edilen genomik DNA'ların konsantrasyonları

İzole edilen genomik DNA no	Konsantrasyon (ng/μL)
9-1-1	154,7
9-1-2	136,1
9-1-3	188,3

#### 4.4.3. Kromozomal DNA'nın agaroz jel elektroforezi ile kontrolü

Kromozomal DNA'nın görüntülenmesi 3.2.4.3'e göre yapılmış olup, her 3 örnekte de parçalanmanın olmadığı görülmüştür (Şekil 4.11).



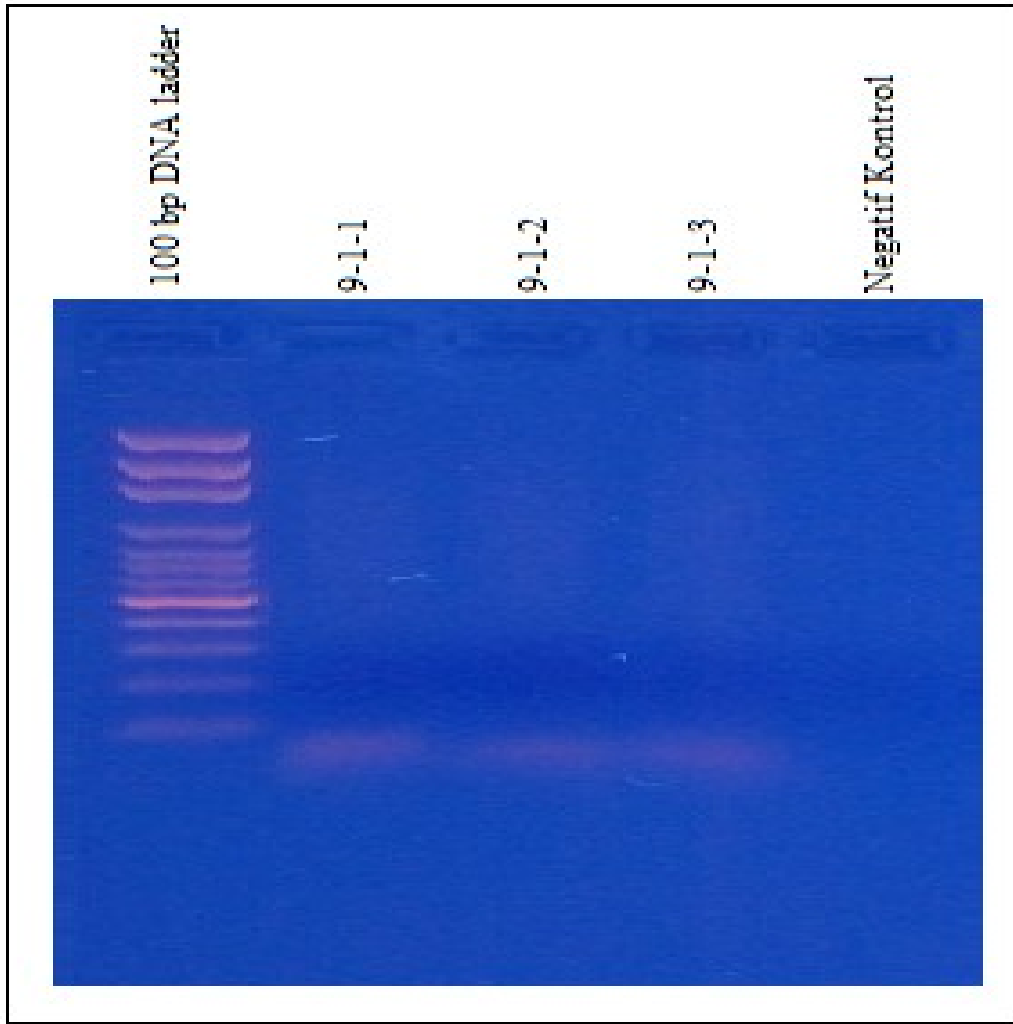
**Şekil 4.11.** Kromozomal DNA'nın %0,8'lik agaroz jel profili

#### 4.5. Fitaz geninin PZR reaksiyonu ile çoğaltılması

*Bacillus megaterium* EBD 9-1'in kromozomal DNA'sı üzerinde bulunan fitaz geni (PhyC) eldeki verilere göre tasarlanan primerler kullanılarak ve 3.2.5.2'de verilen program ve koşullara uygun olarak çoğaltılmaya çalışılmıştır. Çalışmamızda 3.2.5.1'de verilen 2 farklı primer çifti kullanılarak yapılan PZR'ler sonucu elde edilen jel profilleri Şekil 4.12-4.13'de verilmiştir. Markör olarak 3.2.5.3'de verilen şekilde NEB 100bp DNA ladder (1,517 bp, 1,200 bp, 1000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500/517 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp) kullanılıp agaroz jel elektroforezi ile PZR ürünün kontrolü yapılmıştır.

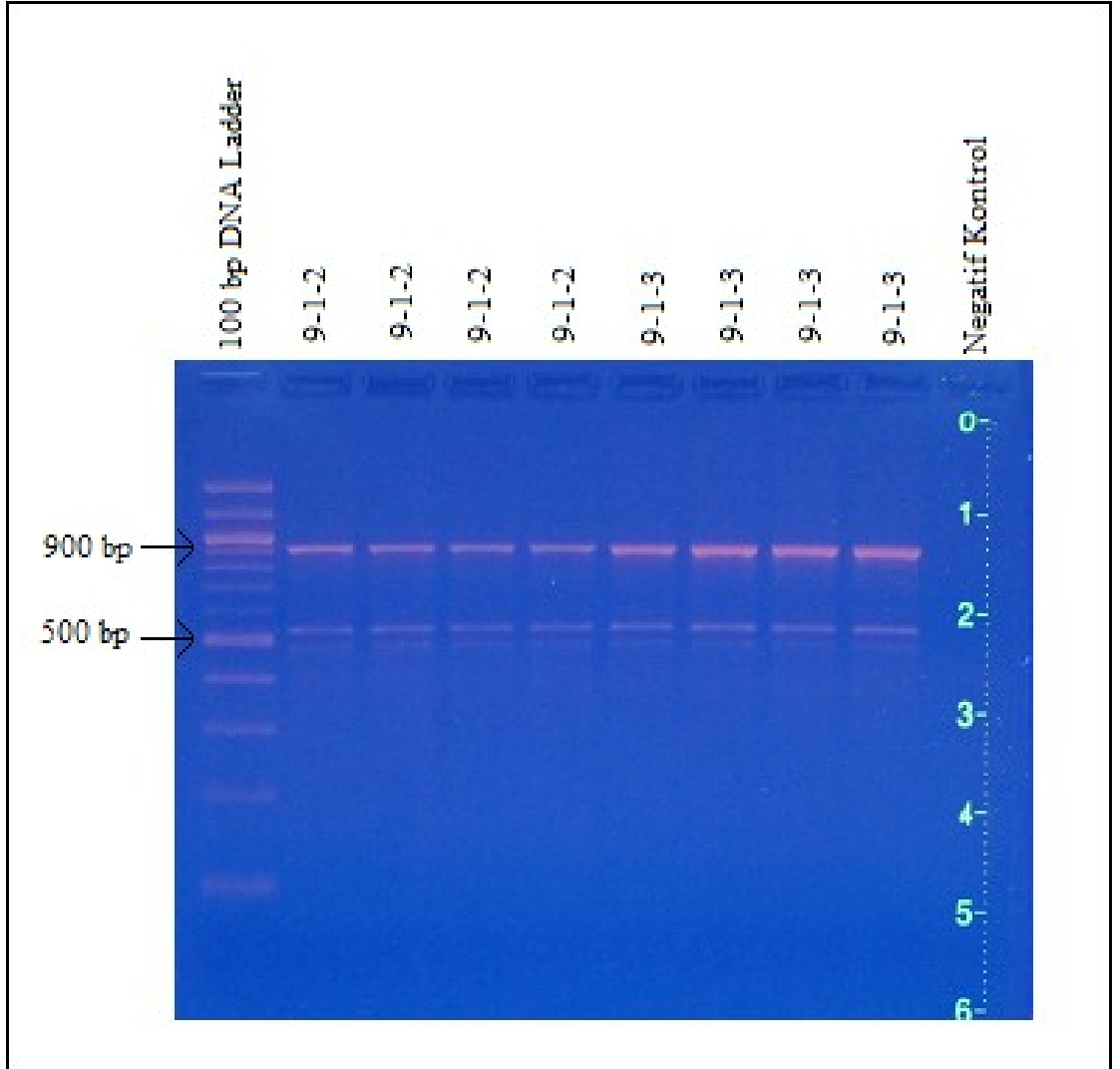


*Bacillus megaterium* EBD 9-1 suşu fitazı için ileri (forward) primer-a ve geri (reverse) primer-a kullanılarak yapılan PZR sonucu agaroz jelde bant oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4.12). PZR' de bandın elde edilememesi nedeniyle bu primer çifti sonraki çalışmalarda kullanılmamıştır. PZR'nin kontrolü için yapılan, içinde DNA bulunmayan kontrol örneklerinde agaroz jelde bant oluşumu gözlenmemiştir ve bu sonuç PZR'nin bulaşsız bir şekilde yapıldığını göstermiştir.



**Şekil 4.12.** İleri (forward) primer-a ve geri (reverse) primer-a primer çifti kullanılarak yapılan PZR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel profili  
1 nolu kuyucuk: Moleküler ağırlık markörü (100 bp DNA ladder, NEB); 2, 3 ve 4 nolu kuyucuk: *Bacillus megaterium* EBD 9-1 suşundan izole edilen DNA örnekleri; 5 nolu kuyucuk DNA örneğinin bulunmadığı negatif kontrol

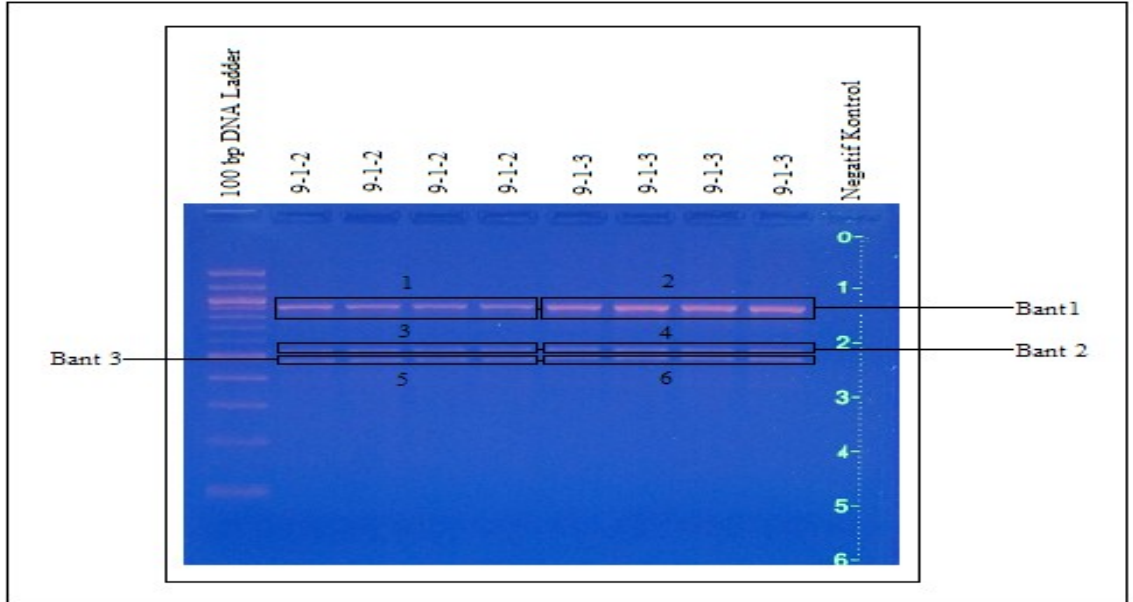
*Bacillus megaterium* EBD 9-1 suşu fitazı için ileri (forward) primer-dejenere ve geri (reverse) primer-dejenere primer çifti kullanılarak yapılan PZR sonucu olarak ~900 bp büyüklüğünde bir bant ve ~500 bp büyüklüğünde iki bant görülmüştür (Şekil 4.13). PZR'nin kontrolü için yapılan, içinde DNA bulunmayan kontrol örneklerinde agaroz jelde bant oluşumu gözlenmemiştir ve bu sonuç, PZR'nin bulaşsız bir şekilde yapıldığını göstermiştir. Sadece bu primer çiftinin agaroz jel profilinde bant oluşumu görüldüğü için sonraki çalışmalarda bu primer çifti kullanılmıştır.



**Şekil 4.13.** İleri (forward) primer-dejenere ve geri (reverse) primer-dejenere primer çifti kullanılarak yapılan PZR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jel profili  
1 nolu kuyucuk: Moleküler ağırlık markörü (100 bp DNA ladder, NEB); 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 nolu kuyucuklar: *Bacillus megaterium* EBD 9-1 suşundan izole edilen DNA örnekleri; 10 nolu kuyucuk: DNA örneğinin bulunmadığı negatif kontrol

#### 4.5.1. PZR ürününün agaroz jelden elde edilmesi

İleri (forward) primer-dejenere ve geri (reverse) primer-dejenere primer çifti kullanılarak yapılan PZR sonucunda elde edilen 3 bandın agaroz jelden izole edilmesi 3.2.5.4'e göre yapılmıştır. Agaroz jel UV transimilatörde incelenmiş ve oluşan 3 DNA bandı temiz bir bistüri yardımı ile dikkatli bir şekilde kesilerek alınmıştır (Şekil 4.14). QIAquick Gel Extraction Kit prosedüründeki kesilen jelin ağırlığının 400 mg'dan daha fazla olmamasının gerektiği kuralı sebebi ile 9-1-2 için 3 bant, 9-2-3 için 3 bant kesilmiştir. UV uygulaması altında kesilen bantlar steril olan 6 adet mikrosantrifüj tüpüne konulmuş ve tartımlar yapılmıştır. QIAquick Gel Extraction Kit prosedürüne uygun olarak her mikrosantrifüj tüpüne QG Buffer ve izopropanol eklenmiş ve bu aşamadan sonra gelen DNA örneklerinin spin kolona yüklenmesi aşamasında 1 ve 2 nolu mikrosantrifüj tüpündeki DNA örneği aynı kolona, 3 ve 4 mikrosantrifüj tüpündeki DNA örneği aynı kolona, 5 ve 6 nolu mikrosantrifüj tüpündeki DNA örneği aynı kolona yüklenmiştir. Bu şekilde konsantrasyonu düşük olan bant örneklerinden izole edilecek DNA'nın konsantrasyonu artırılmıştır. Daha sonraki işlemlere QIAquick Gel Extraction Kit prosedürüne uygun olarak devam edilmiştir ve Bant 1, Bant 2 ve Bant 3 olarak adlandırılmış olup, elde edilen 3 bant -20°C'de saklanmıştır.



**Şekil 4.14.** PZR sonucunda elde edilen 3 bandın agaroz jelden izole edilmesi

1 nolu kuyucuk: Moleküler ağırlık markörü (100bp DNA ladder, NEB); 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 nolu kuyucuklar: *Bacillus megaterium* EBD 9-1 suşundan izole edilen DNA örnekleri; 10 nolu kuyucuk: DNA örneğinin bulunmadığı negatif kontrol

#### 4.5.2. Agaroz jelden izole edilen PZR ürünün konsantrasyonu ve saflık derecesinin spektrofotometrik yöntemler ile tespiti

Agaroz jelden izole edilen PZR ürünü bantların konsantrasyonu ve saflık derecesi spektrofotometrik yöntemlerle 3.2.5.5'e göre ölçülmüştür. QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) içeriğinde bulunan Elution Buffer (Buffer EB) kör olarak kullanılıp, 230-260-280 nm dalga boylarında okuma yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir. Okumalar sonucunda çıkan optik yoğunluğun 1,8-2,0 arasında olduğu dolayısıyla saflık derecesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.6.** Agaroz jelden izole edilen PZR ürünü bantların konsantrasyonu

Bant no	Konsantrasyon (ng/ $\mu$ L)
Bant 1	104,7
Bant 2	96,1
Bant 3	93,5

#### 4.6. Fitaz enzimi geninin *E.coli*'de klonlanması

PZR ürünlerinin 3.2.6.'da verilen T-A klonlama yöntemi ile *E.coli*'de klonlanması sağlanmıştır.

##### 4.6.1. pGEM<sup>®</sup>-T Easy vektörüne PZR ürünün klonlanması

PZR aşamasında Taq DNA polimeraz enzimi kullanıldığından dolayı PZR ile çoğaltılan fitaz enzimi genlerine ait cDNA'ların 3' uçlarına amplifikasyon sırasında fazladan bir adenin eklenmiştir. Bu DNA'lar 3' ucunda fazladan bir timin içeren pGEM<sup>®</sup>-T Easy vektörüne (Promega) 2X ligasyon tampon çözeltisi (Promega) ve T4 DNA ligaz enzimi (Promega) kullanılarak 3.2.6.1'e göre klonlanmıştır.

Kullanılmayan PZR ürününün daha sonraki çalışmalarda kullanılabilmesi için -20°C'de muhafaza edilmiştir. PZR ürünü olarak Bant 1'in kullanıldığı ligasyon ürünü L1 olarak, Bant 2'nin kullanıldığı ligasyon ürünü L2 olarak ve Bant 3'ün kullanıldığı ligasyon ürünü L3 olarak isimlendirilmiştir (Çizelge 4.7).

**Çizelge 4.7.** Kullanılan PZR ürününe göre ligasyon ürününün adlandırılması

PZR ürünü no	Ligasyon ürünü no
Bant 1	L1
Bant 2	L2
Bant 3	L3

#### **4.6.2. Konukçu *E. coli*'nin alıcı hücre haline getirilmesi**

Bu çalışmada konukçu hücre olarak kullanılan *E. coli* DH5 $\alpha$  suşu 3.2.6.2'deki protokol kullanılarak alıcı hücre haline getirilmiştir.

#### **4.6.3. Rekombinant plazmitin kompetant hücrelere transformasyonu**

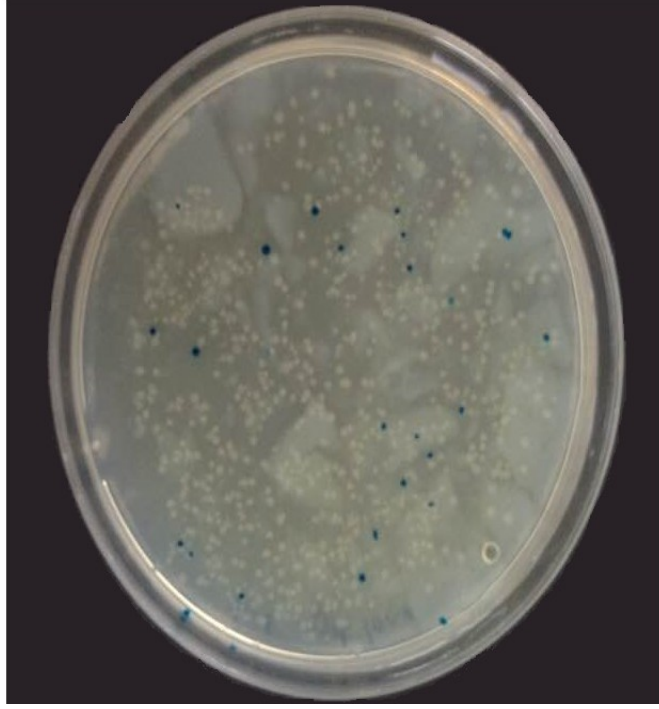
Oluşturmuş olduğumuz L1, L2 ve L3 rekombinant DNA molekülleri olan plazmitler 3.2.6.3'deki yöntem kullanılarak kompetan *E. coli* DH5 $\alpha$  hücrelerine aktarılmıştır.

#### **4.6.4. Transformasyonun gerçekleştiği hücrelerin belirlenmesi**

Rekombinant DNA molekülünü taşıyan *E. coli* DH5 $\alpha$  suşlarının tespiti için transformasyonu yapılan *E. coli* DH5 $\alpha$  suşu bakterileri Xgal, IPTG ve ampisillin içeren LB agar besiyerine ekilerek ampisillin antibiyotiğine dayanıklılık ve mavi-beyaz koloni seçimi yoluyla insert içeren plazmidleri taşıyan bakteri kolonilerinin seleksiyonu yapılmıştır. Bu seleksiyon sonucunda çok sayıda mavi ve beyaz bakteri kolonileri elde edilmiştir.

Elde edilen mavi koloniler insert taşımayan pGEM<sup>®</sup>-T Easy plazmidlerini içermekte olup klonlamanın gerçekleşmediğini yani insert ile pGEM<sup>®</sup>-T Easy plazmidinin birleştirilemediğini göstermektedir. Elde edilen beyaz koloniler ise insert taşıyan pGEM<sup>®</sup>-T Easy plazmidlerini içermekte olup klonlanma işleminin başarılı olduğunu göstermektedir.

P1, P2 ve P3 olarak adlandırılan 3 petriye 3 farklı ligasyonu ürünün klonlanması sonucunda her bir ligasyon ürünü için çok sayıda mavi ve beyaz koloniler elde edilmiştir. Transformasyon sonucu elde edilen koloniler Şekil 4.15'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.15.** Çoğaltılan DNA fragmanını taşıyan rekombinant plazmidlerin kompetan hücelere transformasyonu sonrası ampisilin içeren katı LB ortamındaki görüntüsü

#### **4.6.5. Transformasyonun gerçekleştiği kolonilerin seçimi ve deney tüplerine ekim**

18 saat inkübasyon sonrasında oluşan pozitif koloniler (beyaz) 3.2.6.5'deki prosedüre uygun olarak steril koşullarda steril mikropipet ucu ile seçilmiş ve ampisilin içeren 10 mL'lik sıvı LB besiyerinin bulunduğu deney tüplerinde kültüre alınmıştır. Her petriden 5 tane tek koloni seçilip, 5 ayrı besiyerine ekim yapılmış ve kültürler, çalkalamalı inkübatörde 37°C ve 200 rpm'de 18 saat inkübe edilmiş ve bir sonraki aşamada gerçekleştirilecek olan plazmid izolasyonu için hazırlanmıştır. Ayrıca bu şekilde transformasyon olan hücrelerin stokları oluşturulmuştur.

#### **4.6.6. Transformasyonu gerçekleşen hücrelerden plazmid izolasyonu**

5 ayrı deney tüpüne ekimi yapılmış olan kültürlerin ekşi kokulu olmayanlarından 3 tane seçilmiş ve 3.2.6.6'daki protokole uygun olarak plazmitleri izole edilmiştir. Plazmitleri izole edilen deney tüplerindeki kültürlerin hangi PZR ürününden kaynak aldığı Çizelge 4.8'de belirtilmiştir.

**Çizelge 4.8.** PZR ürünlerinden plazmit izolasyonuna kadar olan olayların gelişimi

PZR ürünü no	Ligasyon ürünü no	Petri no	Deney tüpü no	Plazmit izolasyonu yapılan deney tüpü no
Bant 1	L1	P1	1-1 1-2 1-3 1-4 1-5	1-1 1-4 1-5
Bant 2	L2	P2	2-1 2-2 2-3 2-4 2-5	2-2 2-3 2-5
Bant 3	L3	P3	3-1 3-2 3-3 3-4 3-5	3-1 3-2 3-4

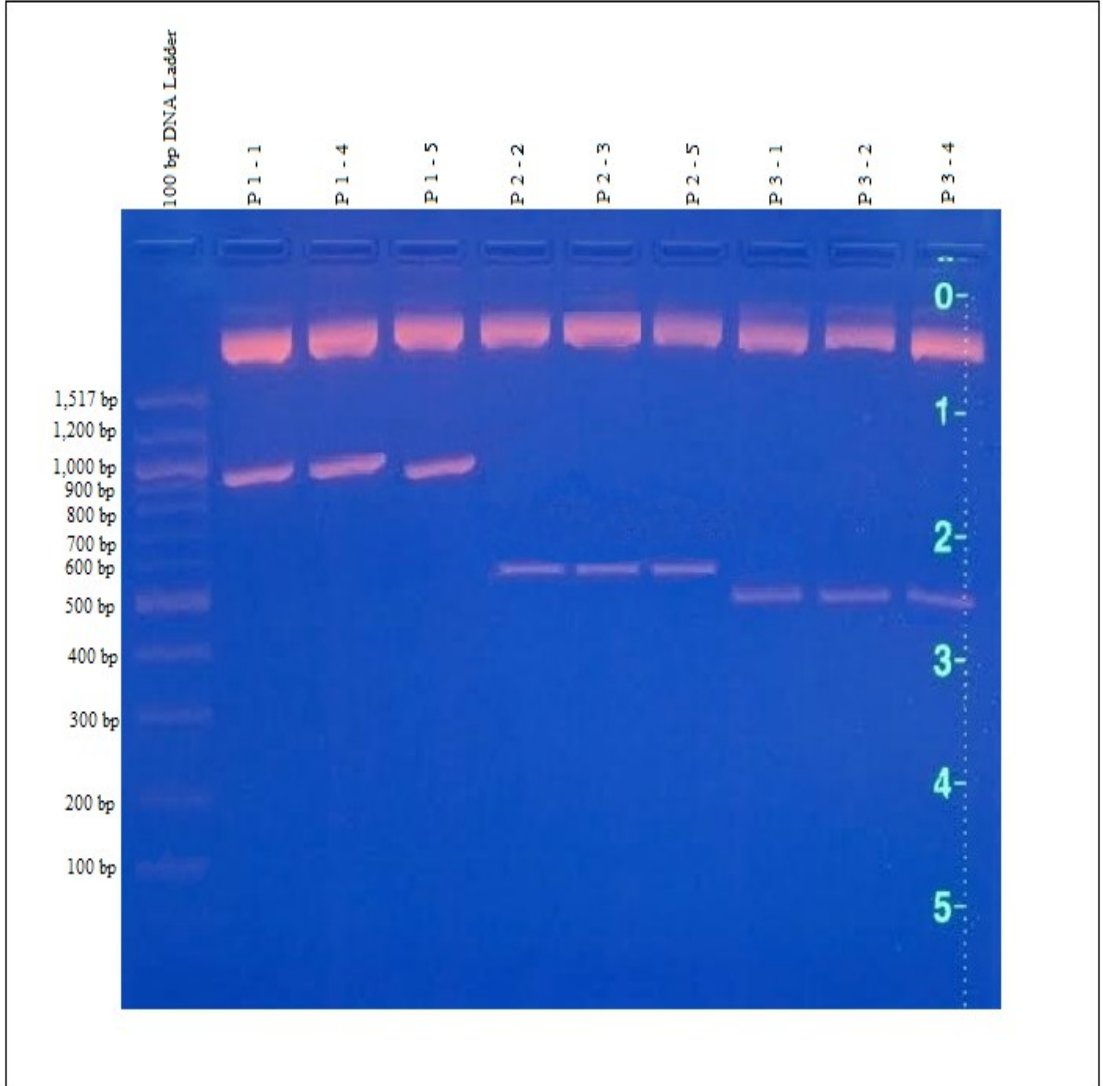
Mikrosantrifüj tüpüne izole edilen plazmitleri konsantrasyonu ve saflık derecesi spektrofotometrik yöntemler ile belirlenmiştir. Bu amaçla QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) içeriğindeki Elution Buffer kör olarak kullanılmış ve 230-260-280 nm dalga boylarında okuma yapılmıştır. Örneklerin konsantrasyonu Çizelge 4.9'da verilmiş ve saflık derecesinin yüksek olduğu sadece 260 nm'de pik görülmesinden anlaşılmıştır.

**Çizelge 4.9.** İzolasyonu yapılan plazmitlerin konsantrasyonları

Plazmit izolasyonu yapılan deney tüpü no	İzole edilen plazmit no	Konsantrasyon (ng/μL)
1-1	P 1-1	143,1
1-4	P 1-4	214,4
1-5	P 1-5	201,1
2-2	P 2-2	238,8
2-3	P 2-3	154,2
2-5	P 2-5	181,3
3-1	P 3-1	190,9
3-2	P 3-2	177,6
3-4	P 3-4	133,8

#### 4.6.7. İzole edilen rekombinant plazmidlerin görüntülenmesi

İlgili DNA fragmentinin plazmit DNA'sına entegre olduğunu göstermek için 3.2.6.7'de belirtilen şekilde *EcoRI* enzimi ile kesim yapılmış ve %1,5'luk agaroz jel elektroforezi ile elde edilen bantlar jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir (Şekil 4.16). Jel profiline bakılarak pGEM®-T Easy plazmitlerinin PZR ile çoğaltılan ilgili DNA dizilerini içerdiği tespit edilmiştir.



**Şekil 4.16.** pGEM®-T Easy rekombinant plazmitlerinin *EcoRI* restiriksiyon enzimiyle kesimi sonrasında %1,5'luk agaroz jel profili

1 nolu kuyucuk: Moleküler ağırlık markörü (100bp DNA ladder, NEB); 2, 3 ve 4 nolu kuyucuklar: pGEM®-T Easy/900bç; 5, 6 ve 7 nolu kuyucuklar: pGEM®-T Easy/ 550bç; 8,9 ve 10 nolu kuyucuklar: pGEM®-T Easy/500bç



#### 4.7.Sekanslama

Klonlanan gen parçalarının nükleotit dizileri belirlenmiştir. Okunan nükleotit dizisi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) aracılığıyla NCBI(National Center for Biotechnology Information) veri tabanındaki bilinen diğer gen dizilimleri ile karşılaştırılmıştır. Rekombinant plazmitlerin taşıdığı DNA fragmanının sekansları Çizelge 4.10-4.12'de verilmiştir. Rekombinant plazmitlerin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonuçları Şekil 4.17-4.27'de verilmiştir.

P1-4 rekombinant plazmitinin taşıdığı ilgili DNA fragmanı 758 nükleotitten oluşmaktadır (Çizelge 4.10). P1-4 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu Şekil 4.17-4.19'de verilmiştir.

**Çizelge 4.10.** P1-4 plazmitinin taşıdığı 758 nükleotitten oluşan DNA fragmanının sekansı

```
AAACCGTAATTTAAAAGCGGCTTCTACCATCGGCTTCATTTAATTTAATC
GCCGATTTAGCGGTCCTTATATTCAAGGAACAGCTTTAGGAGATTTTTTAA
CGCTAGATATTTAAACACTTTCAATTATTCTTCCCGTTTATGCATTTTTTCGCA
GCGGCCTTGCCCGTTTGGCTGCTTTTAGCACCTCGAGATTATTTAAGCAGCT
TTATGAAAATTGGTGTCTTTATCGCGCTGATTGTAGGCGTGTTTTTCGTAAAT
CCAGCAATTCATTTCCCTGCAGTTACTGAATTTATTCACGGAGGCGGCCCTA
TCTTAGCAGGACCTGTGTGGCCGTTTCATTTCCATTACGATCGCCTGCGGCGC
TATTTCCGGCTTCCATGCATTTGTTGGTTCAGGGACAACCCCTAAGATGCTC
GACCGTTGGAGTGACATTAAGTTGTAGGCTTCGGGGCGATGTTAGTCGAA
TGCTTGGTAGGAATTATGGCATTAAATGCCGCAACAGCTTTACATCCTGGAG
ACTATTTTGCAATCAACTCTACACCTGAAGTGTTTAAAACGCTCGGCATGA
ACGTGACAGCTCTTCCTCAGCTTAGCCAAGAGATTGGTCTAAACTTAGAAG
GCCGTACAGGCGGCGCTGTTACACTGGCTGTAGGATGACGTATATCTTCAC
GGAAATTCCTTGATTCAGCCACCTGTCTTCTTATTTTTTTCCATCGTCATTAT
GTTTGAGCAGTATTTATTTTACTGCTATCG
```

**Bacillus megaterium QM B1551, complete genome**  
Sequence ID: [gb|CP001983.1](#) Length: 5097129 Number of Matches: 1

Range 1: 5050225 to 5050986 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1310 bits(709)	0.0	746/763(98%)	6/763(0%)	Plus/Plus

Features: [carbon starvation protein CstA](#)

Query	1	AAACCGGTAATTTAAAAGCGGCTTCTACCATCGGCTTCATTTTAAATTTAAATCGCCGTAT	60
Sbjct	5050225	AAACCGGTAATTTAAAAGCGGCTTCTACCATCGGCTTCATTTTAAATTTAAATCGCCGTAT	5050284
Query	61	TTAGCGGTCCTTATATTCAAGGAACAGCTTTAGGAGATTTTTTAAACGCTAGATATTAATA	120
Sbjct	5050285	TTAGCGGTCCTTATATTCAAGGAACAGCTTTAGGAGATTTTTTAAACGCTAGATATTAATA	5050344
Query	121	CACITTTCAATTTATCTTCCCGTTTTATGCAATTTTTTCGCAGCGGCCCTTGCCCGTTTGGCTGC	180
Sbjct	5050345	CACITTTCAATTTATCTTCCCGTTTTATGCAATTTTTTCGCAGCGGCCCTTGCCCGTTTGGCTGC	5050404
Query	181	TTTTAGCACCTCGAGATTATTTAAGCAGCTTTATGAAAATTGGTGTCTTTATCGCCGCTGA	240
Sbjct	5050405	TTTTAGCACCTCGAGATTATTTAAGCAGCTTTATGAAAATTGGTGTCTTTATCGCCGCTGA	5050464
Query	241	TTGTAGGCGTGTITTTTCGTAATCCAGCAATTCATTTCCCTGCAGTTACTGAATTTATTC	300
Sbjct	5050465	TTGTAGGCGTGTITTTTCGTAATCCAGCAATTCATTTCCCTGCAGTTACTGAATTTATTC	5050524
Query	301	ACGGAGGCGGCCCTATCTTAGCAGGACCTGTGTGGCCGTTTCATTTCCATTACGATCGCCT	360
Sbjct	5050525	ACGGAGGCGGCCCTATCTTAGCAGGACCTGTGTGGCCGTTTCATTTCCATTACGATCGCCT	5050584
Query	361	GCGGCGCTATTTCCGGCTTCCATGCAATTTGTTGGTTTCAGGGACAACCCCTAAGATGCTCG	420
Sbjct	5050585	GCGGCGCTATTTCCGGCTTCCATGCAATTTGTTGGTTTCAGGGACAACCCCTAAGATGCTCG	5050644
Query	421	ACCGTTGGAGTGACATTTAAGTTGTAGGCTTCGGGGCGATGTTAGTCGAATGCTTGGTAG	480
Sbjct	5050645	ACCGTTGGAGTGACATTTAAGTTGTAGGCTTCGGGGCGATGTTAGTCGAATGCTTGGTAG	5050704
Query	481	GAATTATGGCATTAAATTCGCCCAACAGCTTTACATCCTGGAGACTATTTTGCATCAACT	540
Sbjct	5050705	GAATTATGGCATTAAATTCGCCCAACAGCTTTACATCCTGGAGACTATTTTGCATCAACT	5050764
Query	541	CTACACCTGAAGTGTITAAAACCGCTCGGCATGAACGTTGACAGCTCTTCCCTCAGCTTAGCC	600
Sbjct	5050765	CTACACCTGAAGTGTITAAAACCGCTCGGCATGAACGTTGACAGCTCTTCCCTCAGCTTAGCC	5050824
Query	601	AAGAGATTGGTCTAAACTTAGAAGGCCGTACAGGCGGCGCTGTTACACTGGCTGTAGG-A	659
Sbjct	5050825	AAGAGATTGGTCTAAACTTAGAAGGCCGTACAGGCGGCGCTGTTACACTGGCTGTAGGAA	5050884
Query	660	TGACGTATATCTTCACGGAATTCCTTGATTCAGCCACCTGTCTTCTTAAttttttCCA-	718
Sbjct	5050885	TGACGTATATCTTCACGGAATTCCTTGATTCAGCCACCTGTCTTCTTAAttttttCCA-	5050943
Query	719	-TCGTCAATATGTTTGAAGCAGTGTITATTTAACTGCTATCG 758	
Sbjct	5050944	-TCGTCAATATGTTTGAAGCAGTGTITATTTAACTGCTATCG 5050986	

**Şekil 4.17.** P1-4 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. *Bacillus megaterium* QM B1551 tüm genom

**Bacillus megaterium DSM319, complete genome**  
Sequence ID: [gb|CP001982.1](#) Length: 5097447 Number of Matches: 1

Range 1: 5047826 to 5048587 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1304 bits(706)	0.0	744/762(98%)	4/762(0%)	Plus/Plus

Features: [carbon starvation protein CstA](#)

Query	1	AAACCGGTAATTTAAAAGCGGCTTCTACCATCGGCTTCATTTTAAATTTAAATCGCCGTAT	60
Sbjct	5047826	AAACCGGTAATTTAAAAGCGGCTTCTACTGTGCGGCTTCATTTTAAATTTAAATCGCCGTAT	5047885
Query	61	TTAGCGGTCCTTATATTCAAGGAACAGCTTTAGGAGATTTTTTAAACGCTAGATATTAATA	120
Sbjct	5047886	TTAGCGGTCCTTATATTCAAGGAACAGCTTTAGGAGATTTTTTAAACGCTAGATATTAATA	5047945
Query	121	CACITTTCAATTTATCTTCCCGTTTTATGCAATTTTTTCGCAGCGGCCCTTGCCCGTTTGGCTGC	180
Sbjct	5047946	CACITTTCAATTTATCTTCCCGTTTTATGCAATTTTTTCGCAGCGGCCCTTGCCCGTTTGGCTGC	5048005
Query	181	TTTTAGCACCTCGAGATTATTTAAGCAGCTTTATGAAAATTGGTGTCTTTATCGCCGCTGA	240
Sbjct	5048006	TTTTAGCACCTCGAGATTATTTAAGCAGCTTTATGAAAATTGGTGTCTTTATCGCCGCTGA	5048065
Query	241	TTGTAGGCGTGTITTTTCGTAATCCAGCAATTCATTTCCCTGCAGTTACTGAATTTATTC	300
Sbjct	5048066	TTGTAGGCGTGTITTTTCGTAATCCAGCAATTCATTTCCCTGCAGTTACTGAATTTATTC	5048125
Query	301	ACGGAGGCGGCCCTATCTTAGCAGGACCTGTGTGGCCGTTTCATTTCCATTACGATCGCCT	360
Sbjct	5048126	ACGGAGGCGGCCCTATCTTAGCAGGACCTGTGTGGCCGTTTCATTTCCATTACGATCGCCT	5048185
Query	361	GCGGCGCTATTTCCGGCTTCCATGCAATTTGTTGGTTTCAGGGACAACCCCTAAGATGCTCG	420
Sbjct	5048186	GCGGCGCTATTTCCGGCTTCCATGCAATTTGTTGGTTTCAGGGACAACCCCTAAGATGCTCG	5048245
Query	421	ACCGTTGGAGTGACATTTAAGTTGTAGGCTTCGGGGCGATGTTAGTCGAATGCTTGGTAG	480
Sbjct	5048246	ACCGTTGGAGTGACATTTAAGTTGTAGGCTTCGGGGCGATGTTAGTCGAATGCTTGGTAG	5048305
Query	481	GAATTATGGCATTAAATTCGCCCAACAGCTTTACATCCTGGAGACTATTTTGCATCAACT	540
Sbjct	5048306	GAATTATGGCATTAAATTCGCCCAACAGCTTTACATCCTGGAGACTATTTTGCATCAACT	5048365
Query	541	CTACACCTGAAGTGTITAAAACCGCTCGGCATGAACGTTGACAGCTCTTCCCTCAGCTTAGCC	600
Sbjct	5048366	CTACACCTGAAGTGTITAAAACCGCTCGGCATGAACGTTGACAGCTCTTCCCTCAGCTTAGCC	5048425
Query	601	AAGAGATTGGTCTAAACTTAGAAGGCCGTACAGGCGGCGCTGTTACACTGGCTGTAGG-A	659
Sbjct	5048426	AAGAGATTGGTCTAAACTTAGAAGGCCGTACAGGCGGCGCTGTTACACTGGCTGTAGGAA	5048485
Query	660	TGACGTATATCTTCACGGAATTCCTTGATTCAGCCACCTGTCTTCTTAAttttttCCA-	718
Sbjct	5048486	TGACATATATCTTCACGGAATTCCTTGATTCAGCCACCTGTCTTCTTAAttttttCCA-	5048545
Query	719	TCGTCAATATGTTTGAAGCAGTGTITATTTAACTGCTATCG 758	
Sbjct	5048546	TCGTCAATATGTTTGAAGCAGTGTITATTTAACTGCTATCG 5048587	

**Şekil 4.18.** P1-4 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. *Bacillus megaterium* DSM319 tüm genom

Bacillus megaterium WSH-002, complete genome  
Sequence ID: [gb|CP003017.1](#) Length: 4983975 Number of Matches: 1

Range 1: 41256 to 42017 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1249 bits(676)	0.0	734/762(96%)	4/762(0%)	Plus/Minus

Features: [Carbon starvation protein A-like protein](#)

Query	1	AAACCGGTAATTTAAAAGCGGCTTCTACCATCGGCTTCATTTTAAATTTTAAATCGCCGTAT	60
Sbjct	42017	AAACAGGTAATTTAAAAGCGGCTTCTACCATCGGCTTCATTTTAAATTTTAAATCGCCGTAT	41958
Query	61	TTAGCGGTCCTTATATTC AAGGAACAGCTTTAGGAGATTTTAAACGCTAGATATTAAA	120
Sbjct	41957	TTAGCGGCCCTTATATTC AAGGAACAGCTTTAGGAGATTTTAAACGCTAGATATTAAA	41898
Query	121	CACITTCARTTATTCCTCCCGTTTATGCATTTTTTCGCAGCGGCCTTGCCCGTTTGGCTGC	180
Sbjct	41897	CACITTCARTTATTCCTCCCGTTTATGCATTTTTTCGCAGCGGCCTTGCCCGTTTGGCTGC	41838
Query	181	TTTTAGCACCTCGAGATTATTTAAGCAGCTTTATGAAAATTTGGTGTCTTTATCGCCGTGA	240
Sbjct	41837	TTTTAGCACCTCGAGATTACTTAAGCAGCTTTATGAAAATTTGGTGTCTTTATCGCCGTGA	41778
Query	241	TTGTAGGCGTGTITTTTCGIAAAATCCAGCAATTCATTTCCTGCAGTTACTGAAITTTATTC	300
Sbjct	41777	TTGTAGGCGTGTITTTTCGIAAAATCCAGCAATTCATTTCCTGCAGTTACTGAAITTTATTC	41718
Query	301	ACGGAGGCGGCCCTAICTTAGCAGGACCTGTGTGGCCGTTTCAATTTCCATTACGATCGCCT	360
Sbjct	41717	ACGGAGGCGGCCCTAICTTAGCAGGACCTGTGTGGCCGTTTCAATTTCCATTACGATCGCCT	41658
Query	361	GCGGCGCTATTTCCGGCTTCCATGCATTTGTTGGTTTCAGGACAAACCCCTAAGATGCTCG	420
Sbjct	41657	GCGGTGCTATTTCTGGCTTCCATGCATTTGTTGGTTTCAGGACAAACCCCTAAGATGCTCG	41598
Query	421	ACCGTTGGAGTGACATTAAGTTGTAGGCTTCGGGGCGATGTTAGTCGAATGCTTGGTAG	480
Sbjct	41597	ATCGTTGGAGTGACATTAAGTTGTAGGCTTCGGGGCGATGTTAGTCGAATGCTTGGTAG	41538
Query	481	GAATTATGCCATTAATTGCCCAACAGCTTTACATCCTCGAGACTATTTTCCAATCAACT	540
Sbjct	41537	GAATTATGCCATTAATTGCCCAACAGCTTTACATCCTCGAGACTATTTTCCAATCAACT	41478
Query	541	CTACACCTGAAGTGTITAAAACGCTCGGCATGACGTCAGCTCTTCCCTCAGCTTAGCC	600
Sbjct	41477	CTACACCTGAAGTGTITAAAACGCTCGGCATGACGTCAGCTCTTCCCTCAGCTTAGCC	41418
Query	601	AAGAGATTGCTCTAAACTTAGAAGGCCGTACAGGCGGCGCTGTTACACTGGCTGTAGGA-	659
Sbjct	41417	AAGAAATTTGGCCTAAACTTAGAAGGCCGTACAGGCGGCGCTGTTACACTGGCTGTAGGA	41358
Query	660	TGACGTATACTTCACGGAAATTCCTTGATTTCAGCCACCTGTCTTCTTAttttttCCAT	719
Sbjct	41357	TGACGTATACTTCACGGAAATTCCTTGATTTCAGCCACCTGTCTTCTTCTTACTTTTTTCAAT	41298
Query	720	-CGTCATTATGTTTGA-GCAGTATTTATTTT-ACTGCTATCG 758	
Sbjct	41297	TCGTTATTATGTTTGAAGCAGTGTTTATTTTGACTGCTATCG 41256	

**Şekil 4.19.** P1-4 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. *Bacillus megaterium* WSH-002 tüm genom

P2-2 rekombinant plazmitinin taşıdığı ilgili DNA fragmanı 473 nükleotitten oluşmaktadır (Çizelge 4.11). P2-2 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu Şekil 4.20-4.23'de verilmiştir.

**Çizelge 4.11.** P2-2 plazmitinin taşıdığı 473 nükleotitten oluşan DNA fragmanının sekansı

```

TTGATTTTTATTGAGGCTAAGCTCAACAAGCATGTTTCAATTTTTCTTCAAGC
TG TGATAAGCGATCTTGAAGAGTTTGATTTTCTTCTTTTAACTCGTCGTACT
CTTGAACGTTATCGTCTTCTGTTTCGCTACTAGAAGAATTTACGTTTTCTTCA
TCCTCTTTTGATTATCTTTATCTTTTTTAAACAAGCTTCCCGCAGATGTTTT
CAGGCTGGCCACACTGCTTTTTGATTTTTCTTTTACCTTTGTTCCCTAAATCCG
ATGCTTTGCTTTTTAATTCGTCTGTATCAATGCGGTCAAGAAGACTTTTTTCG
ATTTTCAGGGGTAGATACATATCCAATCGTTGCACCGATGATACCTCCTGCT
ACCGCTCGTTTGATTGGCCCGCTGCTTGTGTTTTGCTTGTCTTTGAACCGT
TATTTTCTTTTGAACCGTTTTCCGTATTTTTATTTCCCGGTTTTTTGACTGTG

```

Bacillus megaterium AraC (araC) gene <sup>1</sup>

Sequence ID: [gbJAF053765.1JAF053765](#) Length: 8142 Number of Matches: 1

Range 1: 999 to 1471		<a href="#">GenBank</a>	<a href="#">Graphics</a>	▼ Next Match ▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
791 bits(428)	0.0	458/473(97%)	0/473(0%)	Plus/Plus
Query	1	TTGATTTTATTGAGGCTAAGCTCAACAAGCATGTTTCATTTTTCTTCAAGCTGTGATAA	60	
Sbjct	999	TTGATTTTATTGAGGCTAAGCTCAACAAGCATGTTTCATTTTTCTTCAAGCTGTGATAA	1058	
Query	61	GCGATCTTGAAGAGTTTGATTTTCTTCTTTTAACTCGTCTACTCTTGAACGTTATCGTC	120	
Sbjct	1059	GCGATCTTGAAGAGTTTGATTTTCTTCTTTTAACTCGTCTACTCTTGAACGTTATCGTC	1118	
Query	121	TTCTGTTTCGCTACTAGAAGAATTTACGTTTCTTCATCCTCTTTTGATTTATCTTTATC	180	
Sbjct	1119	TTCTGTTTCGCTACTAGAAGAATTTACGTTTCTTCATCCTCTTTTGATTTATCTTTATC	1178	
Query	181	TTTTTTAAACAAGCTTCCCAGCATGTTTTTTCAGGCTGGCCACACTGcttttttgatttttc	240	
Sbjct	1179	TTTTTTAAACAAGCTTCCCAGCATGTTTTTTCAGGCTGGCCACACTGCTTTTGTGATTTTC	1238	
Query	241	ttttacctttgttctctaaatccgatgcttttgcttttttAATTCGTCTGTATCAATGCGGTC	300	
Sbjct	1239	TTTTACCTTTGTTCTCTAAATCAGATGCTTTGCTTTTTAATTCGTCTGTATCAATGCGGTC	1298	
Query	301	AAGAAGACTTTTTTCGATTTTTCAGGGGTAGATACATATCCAATCGTTGCACCGATGATACC	360	
Sbjct	1299	AAGGAGACTTTTTTCGATTTTTCAGGAGTCGATACATATCCAATCGTTGCACCGATGATGCC	1358	
Query	361	TCCTGCTACCGCTCGTTTGATTGGCCCGCTGctttgtttgttttgcttgccttttgaaccggtt	420	
Sbjct	1359	TCCTGCTACCGCTCGTTTGATTGGCCCGCTGCTTGTGTTTGTGCTTCTTTGAACCGTT	1418	
Query	421	attttcttttgaaccggttttccgatatttttattttcccggttttttGACTGTG	473	
Sbjct	1419	CTTTTCTTTTGAACCGTTTTTCCGATTTTTTATTTTCCTTGTTTTCTGCCTGTG	1471	

**Şekil 4.20.** P2-2 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. *Bacillus megaterium* AraC (araC) gene<sup>1</sup>  
*Bacillus megaterium* AraC (araC) gene<sup>1</sup>: *Bacillus megaterium* AraC (araC) gene, partial cds; gas vesicle proteins GvpU (gvpU), GvpT (gvpT), GvpJ (gvpJ), GvpK (gvpK), GvpS (gvpS), GvpL (gvpL), GvpG (gvpG), GvpF (gvpF), GvpN (gvpN), GvpR (gvpR), GvpB (gvpB), GvpQ (gvpQ), GvpP (gvpP), and GvpA (gvpA) genes, complete cds; and unknown gene.

Bacillus megaterium QM B1551, complete genome  
 Sequence ID: [gbJCP001983.1](#) Length: 5097129 Number of Matches: 1

Range 1: 3217844 to 3218316		<a href="#">GenBank</a>	<a href="#">Graphics</a>	▼ Next Match ▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
802 bits(434)	0.0	460/473(97%)	0/473(0%)	Plus/Plus
<b>Features:</b> <a href="#">gas vesicle protein GvpT</a>				
Query	1	TTGATTTTTATTGAGGCTAAGCTCAACAAGCATGTTTCATTTTTCTTCAAGCTGTGATAA	60	
Sbjct	3217844	TTGATTTTTATTGAGGCTAAGCTCAACAAGCATGTTTCATTTTTCTTCAAGCTGTGATAA	3217903	
Query	61	GCGATCTTGAAGAGTTTGATTTTCTTCTTTTAACTCGTCTACTCTTGAACGTTATCGTC	120	
Sbjct	3217904	GCGATCTTGAAGAGTTTGATTTTCTTCTTTTAACTCGTCTACTCTTGAACGTTATCGTC	3217963	
Query	121	TTCTGTTTCGCTACTAGAAGAATTTACGTTTCTTCATCCTCTTTTGATTTATCTTTATC	180	
Sbjct	3217964	TTCTGTTTCGCTACTAGAAGAATTTACGTTTCTTCATCCTCTTTTGATTTATCTTTATC	3218023	
Query	181	TTTTTTAAACAAGCTTCCCAGCATGTTTTTTCAGGCTGGCCACACTGcttttttgatttttc	240	
Sbjct	3218024	TTTTTTAAACAAGCTTCCCAGCATGTTTTTTCAGGCTGGCCACACTGCTTTTGTGATTTTC	3218083	
Query	241	ttttacctttgttctctaaatccgatgcttttgcttttttAATTCGTCTGTATCAATGCGGTC	300	
Sbjct	3218084	TTTTACCTTTGTTCTCTAAATCAGATGCTTTGCTTTTTAATTCGTCTGTATCAATGCGGTC	3218143	
Query	301	AAGAAGACTTTTTTCGATTTTTCAGGGGTAGATACATATCCAATCGTTGCACCGATGATACC	360	
Sbjct	3218144	AAGGAGACTTTTTTCGATTTTTCAGGAGTCGATACATATCCAATCGTTGCACCGATGATGCC	3218203	
Query	361	TCCTGCTACCGCTCGTTTGATTGGCCCGCTGctttgtttgttttgcttgccttttgaaccggtt	420	
Sbjct	3218204	TCCTGCTACCGCTCGTTTGATTGGCCCGCTGCTTGTGTTTGTGCTTCTTTGAACCGTT	3218263	
Query	421	attttcttttgaaccggttttccgatatttttattttcccggttttttGACTGTG	473	
Sbjct	3218264	CTTTTCTTTTGAACCGTTTTTCCGATTTTTTATTTTCCTTGTTTTCTGCCTGTG	3218316	

**Şekil 4.21.** P2-2 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. *Bacillus megaterium* QM B1551 tüm genom

Bacillus megaterium DSM319, complete genome  
 Sequence ID: [gb|CP001982.1](#) Length: 5097447 Number of Matches: 1

Range 1: 3217081 to 3217559 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
774 bits(419)	0.0	460/479(96%)	6/479(1%)	Plus/Plus

Features: [gas vesicle protein GvpI](#)

Query	1	TTGATTTTTATTGAGGCTAAGCTCAACAAGCATGTTTCATTTTTCTTCAAGCTGTGATAA	60
Sbjct	3217081	TTGATTTTTATTGAGGCTAAGCTCAACAAGCATGTTTCATTTTTCTTCAAGCTGTGATAA	3217140
Query	61	GCGATCTTGAAGAGTTTGATTTTCTTCTTTAACTCGTCTGACTCTTGAACGTTATCGTC	120
Sbjct	3217141	GCGATCTTGAAGAGTTTGATTTTCTTCTTTAACTCGTCTGACTCTTGAACGTTATCGTC	3217200
Query	121	TTCTGTTTCGCTACTAGAAGAATTTACGTTTCTTTCATCCTCTTTTGA-----TTTATC	174
Sbjct	3217201	TTCTGTTTCGCTACTAGAAGAATTTACGTTTCTTTCATCATCTTTTGATTTATCTTTATC	3217260
Query	175	TTTATCTTTTTTAAACAAGCTTCCCGCAGATGTTTTCAGGCTGGCCACACTGcttttttga	234
Sbjct	3217261	TTTATCTTTTTTAAACAAGCTTCCCGCAGATGTTTTCAGGCTGGCCACACTGCTTTTTTGA	3217320
Query	235	tttttcttttaacctttgtttcctaaatccgatgcttttgctttttAAATCGTCTGTATCAAT	294
Sbjct	3217321	TTTTTCTTTTACCTTTGTTTCTAAATCAGATGCTTTGCTTTTAAATTCGTCTGTATCAAT	3217380
Query	295	GCGGTCAAGAAGACTTTTTTCGATTTTTCAGGGGTAGATACATATCCAATCGTTGCACCGAT	354
Sbjct	3217381	GCGGTCAAGGAGACTTTTTTCGATTTTTCAGGAGTCGATACATATCCAATCGTTGCACCGAT	3217440
Query	355	GATACCTCCTGCTACCGCTCGTTTGATTTGGCCCGCTGcttggttgttttgccttttga	414
Sbjct	3217441	GATGCCTCCTGCTACCGCTCGTTTGATTTGGCCCGCTGCTTGTGTTTGGCTTGCTTTTGA	3217500
Query	415	accgttattttcttttgaaccggttttccgtatttttattttcccggttttttGACTGTG	473
Sbjct	3217501	ACCATTCTTTTCTTTTGAACCGTTTTCCGTATTTTTATTTTCTTGTTTTCTGCCTGTG	3217559

Şekil 4.22. P2-2 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. *Bacillus megaterium* DSM319 tüm genom

Bacillus megaterium WSH-002, complete genome  
 Sequence ID: [gb|CP003017.1](#) Length: 4983975 Number of Matches: 1

Range 1: 1824038 to 1824510 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
785 bits(425)	0.0	457/473(97%)	0/473(0%)	Plus/Minus

Features: [Gas vesicle protein GvpI](#)

Query	1	TTGATTTTTATTGAGGCTAAGCTCAACAAGCATGTTTCATTTTTCTTCAAGCTGTGATAA	60
Sbjct	1824510	TTGATTTTTATTGAGGCTAAGCTCAACAAGCATGTTTCATTTTTCTTCAAGCTGTGATAA	1824451
Query	61	GCGATCTTGAAGAGTTTGATTTTCTTCTTTAACTCGTCTGACTCTTGAACGTTATCGTC	120
Sbjct	1824450	GCGATCTTGAAGAGTTTGATTTTCTTCTTTAACTCGTCTGACTCTTGAACGTTATCGTC	1824391
Query	121	TTCTGTTTCGCTACTAGAAGAATTTACGTTTCTTTCATCCTCTTTTGATTTATCTTTATC	180
Sbjct	1824390	TTCTGTTTCGCTACTAGAAGAATTTACGTTTCTTTCATCATCTTTTGATTTATCTTTATC	1824331
Query	181	TTTTTTAAACAAGCTTCCCGCAGATGTTTTTCAGGCTGGCCACACTGcttttttgattttt	240
Sbjct	1824330	TTTTTTAAACAAGCTTCCCGCAGATGTTTTTCAGGCTGGCCACACTGCTTTTTTGATTTTTT	1824271
Query	241	ttttacctttgttctctaaatccgatgcttttgctttttAAATTCGTCTGTATCAATGCGGTC	300
Sbjct	1824270	TTTTACCTTTGTTCTAAATCAGATGCTTTGCTTTTTAATTCATCTGTATCAATACGGTC	1824211
Query	301	AAGAAGACTTTTTTCGATTTTCAGGGGTAGATACATATCCAATCGTTGCACCGATGATACC	360
Sbjct	1824210	AAGGAGACTTTTTTCGATTTTCAGGAGTCGATACATATCCAATCGTTGCACCGATGATGCC	1824151
Query	361	TCCTGCTACCGCTCGTTTGATTTGGCCCGCTGcttggttgttttgccttttgaaccggt	420
Sbjct	1824150	TCCTGCTACCGCTCGTTTGATTTGGCCCGCTGCTTGTGTTTGGCTTTTGAACCGTT	1824091
Query	421	attttcttttgaaccggttttccgtatttttattttcccggttttttGACTGTG	473
Sbjct	1824090	CTTTTCTTTTGAACCGTTTTCCGCTTTTTTATTTTCCGTGTTTTCTGCCTGTG	1824038

Şekil 4.23. P2-2 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. *Bacillus megaterium* WSH-002 tüm genom

P3-1 rekombinant plazmitinin taşıdığı ilgili DNA fragmanı 473 nükleotitten oluşmaktadır (Çizelge 4.12). P3-1 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu Şekil 4.24-4.27'de verilmiştir.

**Çizelge 4.12.** P3-1 plazmitinin taşıdığı 473 nükleotitten oluşan DNA fragmanının sekansı

```

TTGATTTTTATTGAGGCTAAGCTCAACAAGCATGTTTCATTTTTTCTTCAAGC
TGTGATAAGCGATCTTGAAGAGTTTGATTTTCTTCTTTAACTCGTCGTACT
CTTGAACGTTATCGTCTTCTGTTTCGCTACTAGAAGAATTTACGTTTTCTTCA
TCCTCTTTTGATTTATCTTTATCTTTTTTAAACAAGCTTCCCGCAGATGTTTT
CAGGCTGGCCACACTGCTTTTTTGATTTTTCTTTTACCTTTGTTCCATAAATCCG
ATGCTTTGCTTTTTAATTCGTCTGTATCAATGCGGTCAAGAAGACTTTTTTCG
ATTTTCAGGGGTAGATACATATCCAATCGTTGCACCGATGATACCTCCTGCT
ACCGCTCGTTTGATTGGCCCGCTGCTTGTGTTTTGCTTGCTTTTGAACCGT
TATTTTCTTTTGAACCGTTTTCCGTATTTTTATTTCCCGGTTTTTTGACTGTG

```

*Bacillus megaterium* AraC (araC) gene<sup>2</sup>

Sequence ID: [gb|AF053765.1|AF053765](#) Length: 8142 Number of Matches: 1

Range 1: 999 to 1471		<a href="#">GenBank</a>	<a href="#">Graphics</a>	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
791 bits(428)	0.0	458/473(97%)	0/473(0%)	Plus/Plus	
Query	1	TTGATTTTTATTGAGGCTAAGCTCAACAAGCATGTTTCATTTTTTCTTCAAGCTGTGATAA			60
Sbjct	999	TTGATTTTTATTGAGGCTAAGCTCAACAAGCATGTTTCATTTTTTCTTCAAGCTGTGATAA			1058
Query	61	GCGATCTTGAAGAGTTTGATTTTCTTCTTTAACTCGTCGTACTCTTGAACGTTATCGTC			120
Sbjct	1059	GCGATCTTGAAGAGTTTGATTTTCTTCTTTAACTCGTCGTACTCTTGAACGTCATCGTC			1118
Query	121	TTCTGTTTCGCTACTAGAAGAATTTACGTTTTCTTTCATCCCTCTTTTGATTTATCTTTATC			180
Sbjct	1119	TTCTGTTTCGCTACTAGAAGAATTTACGTTTTCTTTCATCACTTTTGATTTATCTTTCATC			1178
Query	181	TTTTTTAAACAAGCTTCCCGCAGATGTTTTTCAGGCTGGCCACACTGcttttttgatttttc			240
Sbjct	1179	TTTTTTAAACAAGCTTCCCGCAGATGTTTTTCAGGCTGGCCACGCTGCTTTTTGATTTTTTC			1238
Query	241	ttttacctttggttcctaaatccgatgcttttgctttttAATTCGTCTGTATCAATGCGGTC			300
Sbjct	1239	TTTTACCTTTGTTTCCTAATCAGATGCTTTTGCTTTTTAATTCGTCTGTATCAATGCGGTC			1298
Query	301	AAGAAGACTTTTTCGATTTTCAGGGGTAGATACATATCCAATCGTTGCACCGATGATACC			360
Sbjct	1299	AAGGAGACTTTTTCGATTTTCAGGAGTCGATACATATCCAATCGTTGCACCGATGATGCC			1358
Query	361	TCCTGCTACCGCTCGTTTGATTGGCCCGCTGcttggttggttttgcttgcttttgaaccggtt			420
Sbjct	1359	TCCTGCTACCGCTCGTTTGATTGGCCCGCTGCTTGTGTTTTGCTTGCTTTTGAACCGTT			1418
Query	421	attttcttttgaaccggttttccgctatttttattttcccggttttttGACTGTG 473			
Sbjct	1419	CTTTTCTTTTGAACCGTTTTCCGCATTTTTTATTTTCCCTTGTGTTTTCTGCCTGTG 1471			

**Şekil 4.24.** P3-1 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. *Bacillus megaterium* AraC (araC) gene<sup>2</sup> *Bacillus megaterium* AraC (araC) gene<sup>2</sup>: *Bacillus megaterium* AraC (araC) gene, partial cds; gas vesicle proteins GvpU (gvpU), GvpT (gvpT), GvpJ (gvpJ), GvpK (gvpK), GvpS (gvpS), GvpL (gvpL), GvpG (gvpG), GvpF (gvpF), GvpN (gvpN), GvpR (gvpR), GvpB (gvpB), GvpQ (gvpQ), GvpP (gvpP), and GvpA (gvpA) genes, complete cds; and unknown gene.

Bacillus megaterium WSH-002, complete genome  
 Sequence ID: [gb|CP003017.1](#) Length: 4983975 Number of Matches: 1

Range 1: 1824038 to 1824510 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
785 bits(425)	0.0	457/473(97%)	0/473(0%)	Plus/Minus

Features: [gas vesicle protein GvpI](#)

Query	1	TTGATTTTTATTGAGGCTAAGCTCAACAAGCATGTTTCATTTTTCTTCAAGCTGTGATAA	60
Sbjct	1824510	TTGATTTTTATTGAGGCTAAGCTCAACAAGCATGTTTCATTTTTCTTCAAGCTGTGATAA	1824451
Query	61	GCGATCTTGAAGAGTTTGATTTTCTTCTTTTAACTCGTCGACTCTTGAACGTTATCGTC	120
Sbjct	1824450	GCGATCTTGAAGAGTTTGATTTTCTTCTTTTAACTCGTCGACTCTTGAACGTTATCGTC	1824391
Query	121	TTCTGTTTCGCTACTAGAAGAATTTACGTTTCTTTCATCCTCTTTTGATTATCTTTATC	180
Sbjct	1824390	TTCTGTTTCGCTACTAGAAGAATTTACGTTTCTTTCATCCTCTTTTGATTATCTTTATC	1824331
Query	181	TTTTTTAAACAAGCTTCCCGCAGATGTTTTCAGGCTGGCCACACTGcttttttgatttttc	240
Sbjct	1824330	TTTTTTAAACAAGCTTCCCGCAGATGTTTTCAGGCTGGCCACACTGCTTTTTGATTTTTC	1824271
Query	241	ttttacctttgttcctaaaatccgatgcttttgctttttAATTCGTCGTATCAATGCGGTC	300
Sbjct	1824270	TTTTACCTTTGTTCTAAATCAGATGCTTTTGCTTTTAAATTCATCTGTATCAATGCGGTC	1824211
Query	301	AAGAAGACTTTTTTCGATTTTCAGGGGTAGATACATATCCAATCGTTGCACCGATGATACC	360
Sbjct	1824210	AAGGAGACTTTTTTCGATTTTCAGGAGTCGATACATATCCAATCGTTGCACCGATGATGCC	1824151
Query	361	TCCTGCTACCGCTCGTTTGATTGGCCCGCTGcttggtggttttgcttgcttttgaaccggt	420
Sbjct	1824150	TCCTGCTACCGCTCGTTTGATTGGCCCGCTGCTTGTGTTTTGCTTGCTTTTGAACCGTT	1824091
Query	421	attttcttttgaaccggttttccgctatttttattttcccggttttttGACTGTG 473	
Sbjct	1824090	CTTTTCCTTTGAACCGTTTCCGCTTTTTATTTCCTGTTTTTCGCCTGTG 1824038	

Şekil 4.25. P3-1 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. *Bacillus megaterium* WSH-002 tüm genom

Bacillus megaterium QM B1551, complete genome  
 Sequence ID: [gb|CP001983.1](#) Length: 5097129 Number of Matches: 1

Range 1: 3217844 to 3218316 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
802 bits(434)	0.0	460/473(97%)	0/473(0%)	Plus/Plus

Features: [gas vesicle protein GvpI](#)

Query	1	TTGATTTTTATTGAGGCTAAGCTCAACAAGCATGTTTCATTTTTCTTCAAGCTGTGATAA	60
Sbjct	3217844	TTGATTTTTATTGAGGCTAAGCTCAACAAGCATGTTTCATTTTTCTTCAAGCTGTGATAA	3217903
Query	61	GCGATCTTGAAGAGTTTGATTTTCTTCTTTTAACTCGTCGACTCTTGAACGTTATCGTC	120
Sbjct	3217904	GCGATCTTGAAGAGTTTGATTTTCTTCTTTTAACTCGTCGACTCTTGAACGTTATCGTC	3217963
Query	121	TTCTGTTTCGCTACTAGAAGAATTTACGTTTCTTTCATCCTCTTTTGATTATCTTTATC	180
Sbjct	3217964	TTCTGTTTCGCTACTAGAAGAATTTACGTTTCTTTCATCCTCTTTTGATTATCTTTATC	3218023
Query	181	TTTTTTAAACAAGCTTCCCGCAGATGTTTTCAGGCTGGCCACACTGctttttgatttttc	240
Sbjct	3218024	TTTTTTAAACAAGCTTCCCGCAGATGTTTTCAGGCTGGCCACGCTGCTTTTTGATTTTTC	3218083
Query	241	ttttacctttgttcctaaaatccgatgcttttgctttttAATTCGTCGTATCAATGCGGTC	300
Sbjct	3218084	TTTTACCTTTGTTCTAAATCAGATGCTTTTGCTTTTAAATTCGTCGTATCAATGCGGTC	3218143
Query	301	AAGAAGACTTTTTTCGATTTTCAGGGGTAGATACATATCCAATCGTTGCACCGATGATACC	360
Sbjct	3218144	AAGGAGACTTTTTTCGATTTTCAGGAGTCGATACATATCCAATCGTTGCACCGATGATGCC	3218203
Query	361	TCCTGCTACCGCTCGTTTGATTGGCCCGCTGcttggtggttttgcttgcttttgaaccggt	420
Sbjct	3218204	TCCTGCTACCGCTCGTTTGATTGGCCCGCTGCTTGTGTTTTGCTTGCTTTTGAACCGTT	3218263
Query	421	attttcttttgaaccggttttccgctatttttattttcccggttttttGACTGTG 473	
Sbjct	3218264	CTTTTCCTTTGAACCGTTTCCGCTTTTTATTTCCTGTTTTTCGCCTGTG 3218316	

Şekil 4.26. P3-1 plazmitinin taşıdığı DNA fragmanının benzerlik gösterdiği gen dizilimlerinin BLAST hızlı tarama sonucu. *Bacillus megaterium* QM B1551 tüm genom





## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enzimler, canlıların doğal ürünleri olması nedeniyle, çevre ile uyumludur. Modern endüstride doğanın kendisine ait teknolojisinin kullanımı, geleneksel işlemlere oranla daha az miktarda atık oluşturarak daha az çevre kirliliğine yol açması, uygun ve ekonomik şartlarda gerçekleştirilebilmesi, enzim kullanımını daha cazip hale getirmektedir (Gümüşel 2002, Bull ve ark. 2000, Van Beilen ve Li 2002). Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmalardan üretilmektedir (Wolfgang 2004). Bunun en önemli nedeni nedeni mikrobiyal enzimlerin ekstrem sıcaklık ve pH değerlerinde, çok yüksek düzeyde aktivite göstermeleridir. Ayrıca mikrobiyal kaynaklı enzimlerin bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri (Zeman ve McCrea 1985, Wiseman 1987), yenilenebilir kaynaklardan üretilmeleri ve biyolojik olarak bozulabilmeleri de bu nedenlerin arasındadır. Bununla birlikte mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir (Demain ve Solomon 1981).

Dünyadaki tarım alanlarının %90'ında tahıllar, baklagil ve yağlı tohumlar yetiştirilmekte olup, bunlar hayvanların beslenmesinde en büyük kaynağı oluşturmaktadırlar. Bu ürünlerin önemli bir içeriği fitik asit (myo-inositol hexakisphosphate, tuz formu fitat)'tir. Hayvan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan fitatın iki olumsuz durumu bulunmaktadır. Fitat, besinlerdeki proteinler, amino asitler, kalsiyum, magnezyum, demir ve çinko gibi metal iyonlar ile suda çözünmez kompleksler oluşturur ve anti besinsel faktör olarak hareket eder. Fitat bağırsakta bazı proteazlara bağlanmakta ve oluşturduğu kompleks ile protein ve amino asitlerin sindirilebilirliğini azaltmaktadır (Hartman 1979, Erdman 1979). Ayrıca, yem hammaddelerindeki fitin fosforundan monogastrik hayvanlar etkin bir şekilde yararlanamadıklarından fosfor gübre ile dışarıya atılmaktadır. Bu durum ise çevreyi özellikle yeraltı ve üstü su kaynaklarını fosfor yönünden tehlikeli bir duruma getirerek çevresel fosfat kirlenmesine yol açmaktadır. Bu iki önemli durumdan dolayı fitatın hidrolizi kesinlikle gereklidir.

Fitatı hidrolizlemek için kimyasal ve fiziksel metodlar kullanılmasına rağmen, bunlar pahalıdır ve gıdanın besin değerini düşürmektedir. Bunlara alternatif olarak kullanılan ve endüstride önemli bir pazar payına sahip olan fitaz enzimini üreten yeni bir *Bacillus* suşu aramak ve bu suştan fitaz geninin klonlama çalışmaları yapmak üzere, Türkiye topraklarından toplam 300 adet bakteri izole edilmiştir. Bakterilerin *Bacillus* sp. olup olmadığı *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*'e göre morfolojik ve biyokimyasal testler ile tespit edilmiştir. Testler sonucunda 236 adet bakteri *Bacillus* sp. olarak saptanmıştır. Çalışmamızda bakterilerin fitaz üretilip üretilmediğini belirlemek için fitat içerikli ortamda yayma metodu kullanılmıştır. 236 bakteri içerisinde yüksek fitaz aktiviteli 19 adet *Bacillus* sp. seçilmiştir. Bu suşlardan 11 mm çevresel hidrolitik zon çapına sahip olan *Bacillus* sp. EBD 9-1 olarak adlandırılmıştır. Daha sonra en yüksek fitaz aktivitesi görülen *Bacillus* sp. EBD 9-1'in 16S rRNA analizi yapılmış ve tür *Bacillus megaterium* olarak tespit edilmiş ve yeni izolat *Bacillus megaterium* EBD 9-1 olarak adlandırılmıştır.

Mikrobiyal yolla enzim üretiminin ilk aşaması uygun mikroorganizmanın seçimidir. Bununla birlikte kültür ortamı ve fermantasyon koşulları da enzim üretimini etkilemektedir. Üretimi arttırmak için kültür ortamı ve fermantasyon koşullarının optimize edilmesinin yanında modifiye edilmiş mikroorganizmalar da kullanılması yoluna gidilmiştir. Bu amaçla rekombinant suşlar geliştirilmiştir ve enzim üretiminde kullanılmaya başlanmıştır. Bu şekilde fitaz enzimini üreten mikroorganizmalardan da fitaz geni klonlanarak ifade edilmiş ve üretim koşulları optimize edilmiştir. *Bacillus* sp. fitazı *E.coli*'de (Kim ve ark. 1998b), *B. amyloliquefaciens* fitazı *B. subtilis*'de (Kim ve ark. 1999), *Schwanniomyces occidentalis* fitazı *Candida boidinii*'de (Nakamura ve ark. 1999), *A. ficuum* fitazı *Nicotiana tabacum*'da (Ullah ve ark. 1999), *A.niger* fitazı *E.coli*'de (Phillippy ve Mullaney 1997) klonlanmış ve ifade edilmiştir. Çalışmamızda da yeni izolat *Bacillus megaterium* EBD 9-1'e ait kromozomal DNA üzerinde kodlanmış olan fitaz enziminin üretiminden sorumlu olan PhyC gen bölgesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmaya çalışılmıştır. Fakat *Bacillus megaterium* EBD 9-1'e ait 3 farklı suşun (*Bacillus megaterium* DSM319, *Bacillus megaterium* QM B1551 ve *Bacillus megaterium* WSH-002) bütün genom sekansı NCBI veri bankasında bulunmasına rağmen bu sekanslar arasında fitaza ait bir sekans bulunamamıştır.

Dolayısı ile izole ettiğimiz *Bacillus megaterium* EBD 9-1 fitaz aktivitesi gösteren bir organizma olup, literatürde bu türe ait fitaz enzimi sekansına rastlanmamıştır. Bu sebeple farklı *Bacillus* türlerinden elde edilen sekanslar hizalanarak bir korunmuş bölge yakalanmaya ve çoğaltılmaya çalışılmıştır. Klonlamanın yapılabilmesi için bir çifti dejenere olmak üzere 2 primer çifti hazırlanmıştır. Bu primer çiftleri ileri (forward) primer-a, geri (reverse) primer-a ve ileri (forward) primer-dejenere, geri (reverse) primer-dejenere olarak isimlendirilmiştir. İleri (forward) primer-a ve geri (reverse) primer-a primer çifti kullanılarak yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) sonucunda herhangi bir bant oluşumu gözlenmemiştir. İleri (forward) primer-dejenere ve geri (reverse) primer-dejenere primer çiftinin kullanıldığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) sonucunda amplifikasyon gerçekleşmiş olup, ~900 bp büyüklüğünde bir bant ve ~500 bp büyüklüğünde iki bant görülmüştür. Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Taq DNA polimeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve çoğaltılan DNA fragmentleri pürifikasyon amacı ile agaroz jelde 8 çukurda koşulmuş ve ethidium bromide ile boyama gerçekleştirilmiştir. Ardından UV ışık altında DNA bantları çıkarılmıştır.

Çoğaltılan bu DNA fragmanları pGEM<sup>®</sup>-T Easy vektörüne ligasyon ile aktararak, rekombinant plazmidler elde edilmiştir. Oluşturulan ve L1, L2, L3 olarak isimlendirilen rekombinant plazmidlerin CaCl<sub>2</sub> yöntemi kullanılarak konukçu bakteri *E.coli* DH5α suşuna transformasyonu sağlanmıştır. Transformasyon sonrasında bir çok koloni oluşmuş ve insert içeren kolonilerin ayrımı pGEM<sup>®</sup>-T Easy vektörünün hem ampisillin antibiyotikine direnç geni hem de β-galaktosidazın α-peptidini kodlayan dizilime sahip olması sayesinde sağlanmıştır. Bu dizilim ampisilin ve IPTG içeren katı besi yerlerinde mavi koloniler (rekombinant plazmit içermeyen koloniler) ve beyaz koloniler (rekombinant plazmit içeren koloniler) oluşturmakta ve rekombinant plazmitlerin seçimini kolaylaştırmaktadır. Transformasyonun gerçekleştirildiği bakterilerin bölünmesiyle rekombinant DNA'da replike olan klonlar elde edilmiştir. Rekombinant plazmidi içeren *E.coli* DH5α suşunun oluşturduğu saf kolonilerden plazmid izole edilmiştir. Klonlamanın doğrulamasını kesinleştirmek için rekombinant plazmitler izole edilerek *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmiştir. İlgili plazmidler agaroz jelde yürütülmüş ve ethidium bromide ile boyama gerçekleştirilmiştir. Ardından UV

ışık altında ~900 bp büyüklüğünde bir bant ve ~500 bp büyüklüğünde iki bant görülmüştür. Dolayısı ile plazmitlerin *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimi kesimine uğratılması sonucu beklenen büyüklükte bantlar elde edilmiştir.

Daha sonra pGEM<sup>®</sup>-T Easy vektörüne klonlanmış gen parçaları hizmet alımı ile sekanslatılmış ve okuma işlemi T7 primerleri ile yapılmıştır. Klonlanan 3 gen parçasının okunan nükleotit dizisi BLAST hızlı tarama programı kullanılarak NCBI veri tabanlarındaki bilinen diğer gen dizilimleri ile karşılaştırılmıştır. BLAST veri tabanında yapılan karşılaştırma sonuçlarına göre her 3 gen parçasının nükleotit dizisinin fitaz enzimi sekansı ile benzerlik göstermediği belirlenmiştir. Sonuç olarak, dejenere primerler ile amplifikasyon sonucunda fitaz geni çoğaltılamamıştır. Ancak bu yeni izolat fitaz aktivitesine sahip olduğundan dolayı (Demirkan ve ark. 2014) literatürde önemli bir durum oluşturmaktadır. Yapılan literatür çalışmasında başka *Bacillus megaterium*'a ait fitaz üretimini gösteren herhangi bir çalışma mevcut olmadığından, bu çalışmada fitaz üretimine sahip yeni izolat olan *Bacillus megaterium* EBD 9-1 suşu ilk olarak literatüre rapor edilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Adeyeye, E.I., Arogundade, L.A., Akintoya, E.T., Aisida, O.A. and Aloa, P.A. 2000.** Calcium, zinc and phytate interrelationships in some foods of major consumption in Nigeria. *Food Chem.* 71: 435-441.
- Ahmad T, Rasool S, Sarwar M, Haq A, Zia-ul H. 2000.** Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens, *Animal Feed Science and Technology*, 83, 103–114.
- Alçiçek A, Ayhan V, Özdoğan M. 1995.** Kanatlı karmalarında mikrobiyal fitaz enziminin kullanım imkanı, Uluslararası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı, 24–27 Mayıs, s:173–182, İstanbul.
- Anderson, P.A. 1985.** Interactions between proteins and constituents that affect protein quality. In: *Digestibility and amino acid availability in cereals and oilseeds* (Finley, J.W., and Hopkins, D.T.). American Association of Cereal Chemists, p. 31-45, St Paul, Minnesota.
- Angel R, Tamim NM, Applegate TJ, Dhandu AS, Ellestad LE. 2002.** Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy, *Journal of Applied Poultry Research*, 11: 471–480.
- Angel, R., Saylor, W. W., Dhandu, A. S., Powers, W., Applegate, T. J. 2005.** Effects of dietary phosphorus, phytase, and 25-hydroxycholecalciferol on performance of broiler chicks grown in floor pens. *Poult. Sci.* 84:1031-1044.
- Annamalai, N., Thavası, R., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T. 2011.** Extraction, purification and characterization of thermostable, alkaline tolerant  $\alpha$ -amylase from *Bacillus cereus*. *Indian J Microbiol*, 51:424-429.
- Anonim, 1980.** Mineral tolerance of domestic animals. National Academy of Science. Washington D.C.
- Anonim, 1994.** National Research Council. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th ed. Nat. Acad. Press, Washington, DC.
- Anonim, 2012.** [http://www.bccresearch.com/pressroom/bio/global-market-industrial-enzymes-surpass-\\$6-billion-2016](http://www.bccresearch.com/pressroom/bio/global-market-industrial-enzymes-surpass-$6-billion-2016)
- Anonim, 2014.** <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030h.html>
- Aşan, M. 2007.** Mikrobiyal fitazlar, uygulama alanları ve biyoteknoloji. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 13(2) 147-155. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi.

**Aygan, A., 2008.** Haloalkalofil Bacillus sp. izolasyonu, amilaz, selüloz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. Ç.Ü. FBE. Doktora Tezi.

**Baldi, B.G., Scott, J.J., Everard, J.D., Loewus, F.A. 1988.** Localization of constitutive phytases in lily pollen and properties of the pH 8 form. *Plant Science*, 56: 137-147.

**Baruah, K., Sahu, N.P., Pal, A.K., Jam, K.K., Debnath, D., Yengkokpam, S., Mukherjee, S.C. 2007.** Interactions of dietary microbial phytase, citric acid and crude protein level on mineral utilization by Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), Juveniles. *Journal of World Aquaculture Society*, 38(2), 238–249.

**Bassiri A. Nahapetian A. 1977.** Differences in concentrations and interrelationships of phytate phosphorus, magnesium, calcium, zinc and iron in wheat varieties grown under dryland and irrigated conditions. *J. Agric. Food. Chem.* 25:1118-1130.

**Bedford, M. R. 2000.** Exogenous enzymes in monogastric nutrition-their current value and future benefits. *Anim. Feed Sci. Tech.* 86:1-13.

**Bhat, M.K.. 2000.** Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18, 355-383.

**Billington, D.C. 1993.** The inositol phosphates. Chemical synthesis and biological significance. Verlag Chemie, Weinheim.

**Bitar, K., Reinhold, J.G. 1972.** Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf, and man. *Biochimica Biophysica Acta*, 268: 442-452.

**Bohn, L., Meyer, A.S., 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.

**Boling, S. D. 1999.** Evaluation of methods for improving phosphorus utilization in poultry and swine. PhD thesis. University of Illinois, Urbana, IL.

**Brinch-pedersen, H., Olesen, A., Rasmussen, S.K., Holm, P.B., 2000.** Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) for constitutive accumulation of an *Aspergillus* phytase. *Molecular Breeding*, 6, 195–206.

**Brocades, G. 1991.** DNA sequence encoding phytase. Pat. EP 420 358.

**Buchanan, R.E. Gibbons, N.E. 1974.** “Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, 8th Edition”, the Williams Company, Baltimore, 12146.

**Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M. 2000.** Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *microbiology and molecular biology, Reviews* 64: 573-606.

- Buxbaum, E. 2007.** Fundamentals of Protein Structure and Function. Springer, pp. 59-63, West Indies.
- Cao L., Wang W., Yang C., Yang Y., Diana J., Yakupitiyage A., Luo Z. Li D.2007.** Application of Microbial Phytase in Fish Feed. *Enzyme Microbiology and Technology*, 40 (4): 497-507.
- Choi, Y.M., Suh, H.J., Kim, J.M. 2001.** Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *Journal of Protein Chemistry*, 20: 287-292.
- Claus, D. Berkeley, C. W. 1986.** The genus *Bacillus* In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2. Sneath pHA (Ed.). Williams, Wilkins, Baltimore, 34; 1105-1139, ISBN: 0-683-07893-9.
- Cokmuş. C., Dönmez, G., Saçılık, S.C. Berber, İ. 1995.** Temel Mikrobiyoloji Laboratuvarı Klavuzu. Ankara.
- Cosgrove D.J. 1966.** The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates Review. *Pure and Applied Chemistry*, 16: 209-224.
- Costello A.J.R., Glonek T., Myers T.C. 1976.** <sup>31</sup>P-nuclear magnetic resonance-pH titrations of myo-inositol hexaphosphate, *Carbohydrate Resource*, 46: 159–171.
- Çotuk, A., 2003.** Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri. Nobel Tıp Kitapevleri, Nobel Matbaacılık, İstanbul, 138s., 2007. Mikrobiyoloji Ders Notu.
- Daniels, M.J. 1992.** Paper technology, 33(6): 14.
- Daniel T.C., Sharpley A.N., Lemunyon J.L. 1998.** Agricultural phosphorus and eutrophication: a symposium overview, *Journal of Environmental Quality*, 27: 251–257.
- Dassa J., Marck C. Boquet P. L. 1990.** The complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gene *appA* reveals significant homology between pH 2.5 acid phosphatase and glucose-1-phosphatase. *J. Bacteriol.* 172(9), 5497-5500.
- Day, P.R. 1996.** Genetic modification of plants: significant issues and hurdles to success. *Am. J. Clin. Nutr.*, 63: 651S-656S.
- Demain, A.L., Solomon, N.A. 1981.** In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*, pp. 3-14. Scientific American, Freeman & Comp., San Francisco.
- Demirkan E., Baygın E., Usta A. 2014.** Screening of phytate hydrolysis *Bacillus* sp. isolated from soil and optimization of the certain nutritional and physical parameters on the production of phytase. *Turkish Journal of Biochem*, 39 (2); 206–214
- Dvorakova, J. 1998.** Phytase, sources, preparation and exploitation. *Folia Microbiologica*, 43: 323-338.

**Ediz, N., ve Beyath, Y., 2005.** Bacillus Cinsi Bakteriler Tarafından Biyoplastik Üretimi. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 5:1-22.

**Eeckhout W, De Paepe M. 1994.** Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs, *Animal Feed Science and Technology*, 47: 19–29.

**Ehrlich, K. C., Montalbano, B. G., Mullaney, E. J., Dischinger, H. C. Jr Ullah, A. H. 1993.** Identification and cloning of a second phytase gene (phyB) from *Aspergillus niger* (ficusum). *Biochem Biophys Res Commun.* 195(1), 53-57.

**Ellestad, L.E., Angel, R., Soares Jr, J.H. 2002.** Intestinal phytase II: A comparison of activity and in vivo phytate hydrolysis in three teleost species with differing digestive strategies. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26: 259-273.

**Enzyme Technical Association, 2001.** Enzymes a primer on use and benefits today and tomorrow. 1800 Massachusetts Avenue, N.W. Second Flor Washington, DC 20036. s.1-34.

**Erdman, J.W. Forbes, R.M. 1977.** Mineral bioavailability from phytate containing foods. *Food Prod. Dev.* 11: 46-52.

**Erdman, J.R. Jr. 1979.** Oil seed phytates: nutritional implications. *Journal of the American Oil Chemists Society* 56, 736–741.

**Erkek, R., Ünlü, H.B. 2003.** Fitaz Enziminin Etlik Piliçlerin Beslenmesinde Kullanımı. *Hayvansal Üretim* 44(2): 10-19.

**Feil, B., 2001.** Phytic Acid. *Journal of New Seeds.* Vol. 3(3).

**Findenegg, G.R., Nelemans, J.A. 1993.** The effect of phytase on the availability of P from myo-inositol hexaphosphate (phytate) for maize roots. *Plant Soil*, 154: 189-196.

**Forbes, R. M., Erdman, J. W., Jr., Parker, H. M., Kondo, H. & Ketelson, S. M. 1983.** Bioavail ability of zinc in coagulated soy protein (tofu) to rats and effect of dietary calcium at a constant phytate:zinc ratio. *J. Nutr.* 113, 205-210.

**Fredrick, K.L., Helmann, J.D. 1994.** “Dual chemotaxis signaling pathways in *Bacillus subtilis*: a  $\alpha$ -dependent gene encodes a novel protein with both CheW and CheY homologous domains” *J. Bacteriol.* 176: 2727-2735.

**Fredrikson, M., Biot, P., Larsson Alminger, M., Carlsson, N.G., Sandberg, A.S., 2001.** Production process for high-quality pea- protein isolate with low content of oligosaccharides and phytate. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 1208-1212.

**Freund, W.D., Mayr, G.W., Tietz, C., Schultz, J.E. 1992.** Metabolism of inositol phosphates in the protozoan *Paramecium*. Characterization of a novel inositol-hexakisphosphate-dephosphorylating enzyme. *Eur. J. Biochem.* 207: 359-367.



**Ghorbel, R. E., Maktouf, S., Massoud, E. B., Bejar, S., Chaabouni, S. E., 2009.** New thermostable amylase from *Bacillus cohnii* US147 with a broad pH applicability. *Appl Biochem Biotechnol*, 157:50-60.

**Gibson, D.M., Ullah, A.H. 1988.** Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 260: 503-513.

**Golovan, S.P., Wang, G., Zhang, J., Forsberg, C.W. 2000.** Characterization and overproduction of the *Escherichia coli* appA encoded bifunctional enzyme that inhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Canadian Journal Microbiology*, 46: 59-71.

**Golovan, S. P., Hayes, M. A., Phillips, J. P. Forsberg, C. W. 2001a.** Transgenic mice expressing bacterial phytase as a model for phosphorus pollution control. *Nat. Biotechnol.* 19(5), 429-433.

**Golovan, S. P., Meidinger, R. G., Ajakaiye, A., Cottrill, M., Wiederkehr, M. Z., Barney, D. J., Plante, C., Pollard, J. W., Fan, M. Z., Hayes, M. A., Laursen, J., Hjorth, J. P., Hacker, R. R., Phillips, J. P. Forsberg, C. W. 2001b.** Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nat. Biotech.* 19(8), 741-745.

**Graf, E. 1986.** Chemistry and applications of phytic acid: An overview. Pages 173-174 in *Phytic Acid: Chemistry and Applications*. E. Graf, ed. Pilatus Press, Minneapolis, MN.

**Greaves, M.P., Anderson, G., Webley, D.M. 1967.** The Hydrolysis of Inositolphosphates by *Aerobacter aerogenes*. *Biochim. Biophys. Acta*, 132: 412-418.

**Greiner, R., Konietzny, U., Jany, K.D. 1993.** Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303: 107-113.

**Greiner, R., KONIETZNY, U. 1996.** Construction of a bioreactor to produce special breakdown products of phytate. *Journal of Biotechnology*, 48: 153- 159.

**Greiner, R., Haller, E., Konietzny, U., Jany, K.D. 1997.** Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Archives Biochemistry Biophysics*, 341: 201-206.

**Greiner, R., Konietzny, U. 1999.** Improving enzymatic reduction of myo- inositol phosphates with inhibitory effects on mineral absorbtion in black beans (*Phaseolus vulgaris* var.preto). *Journal of Food Processing and Preservation* 23:249-261.

**Greiner, R., Larsson Alminger, M., 1999.** Purification and characterization of a phytate-degrading enzyme from germinated oat (*Avena sativa*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79: 1453–1460.

- Greiner, R., Carlsson, N.G., Larsson Alminger, M., 2000a.** Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 84: 53–62.
- Greiner, R., Jany, K-D, Larsson Alminger, M., 2000b.** Identification and properties of myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases (phytases) from Barley (*Hordeum vulgare*). *Journal of Cereal Science* 31: 127–139.
- Greiner, R., Larsson Alminger, M., Carlsson, N.G., Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., Pedrosa, M.M., Goyoaga, C., 2002.** Pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytases of legume seeds. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6865–6870.
- Greiner, R., Konietzny, U. 2006.** Phytase for food application. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 125–140.
- Guo B., Bi, Y. 2002.** “Cloning PCR Products”, in: Chen, B.Y. and Janes, H.W, Editors, “PCR Cloning Protocols”, Humana.
- Gümüşel, F. 2002.** Biyoteknoloji, genetik ve sağlık sektörü. Kocaeli Sanayii için teknolojik uzgörü ortak projesi, s. 73-135.
- Ha, N.C., Oh, B.C., Shin, S., Kim, H.J., Oh, T.K., Kim, Y.O., Choi, K.Y., Oh, B.H. 2000.** Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states. *Nature Structural Biology* 7: 147-153.
- Haefner, S., Knietsch, A., Scholten, E., Braun, J., Lohscheidt, M., Zelder, O. 2005.** Biotechnological production and applications of phytases. *Appl. Microbial Biotechnol.* 68:588-597.
- Ham, A., Ebina, S., Kondo, A., Funagurna, T. 1985.** A new type of phytase from pollen of *Typh lufijolia* L. *Agric. Biol. Chem.* 49: 3539-3544.
- Hamada, J.S., 1996.** Isolation and identification of the multiple forms of soybean phytases. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 73, 1143–1151.
- Hamada, A., Yamaguchi, K.I., Ohnishi, N., Harada, M., Nikumaru, S., Honda, H., 2005.** High-level production of yeast (*Schwanniomyces occidentalis*) phytase in transgenic rice plants by combination of signal sequence and codon modification of the phytase gene. *Journal of Plant Biotechnology*, 3, 43–55.
- Han, Y., Lei, X. G. 1999.** Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus* phytase (phyA) in *Pichia pastoris*. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 364:83-90.
- Han, Y., Wilson, D. B., Lei, X. G. 1999.** Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (phyA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *App. Environ. Microbiol.* 65: 1915-1918.

- Hara, A., Ebina, S., Kondo, A. 1985.** A new type of phytase from pollen of *Typha latifolia* L. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49: 3539-3544.
- Harland, B.F., Harland, J. 1980.** Fermentative reduction of phytate in rye, white and whole wheat breads. *Cereal Chem.* 57(3) : 226-229.
- Harland, B.F., Morris, E.R. 1995.** Phytate: A good or bad food component. *Nutr. Res.* 15 (5): 733-754.
- Haros, M., Rosell, C.M., Benedito, C. 2001.** Use of Fungal Phytase to Improve Breadmaking Performance of Whole Wheat Bread. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (11), pp 5450–5454.
- Hartman, G.H. Jr. 1979.** Removal of phytate from soy protein. *Journal of the American Oil Chemists Society* 56, 731–735.
- Harwood, C.R.. 1992.** *Bacillus subtilis* and Its Relatives: Molecular Biological and Industrial Workhorses. Elsevier Science Publishers Ltd (U.K.), 10:247-256.
- Hayakawa, T., Toma, Y., Igaue, I. 1989.** Purification and characterisation of acid phosphatases with or without phytase activity from rice bran. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 1475–1483.
- Hirimuthugoda, N.Y., Chi, Z., Li, X., Wang, L., Wu, L., 2006.** Diversity of phytase-producing marine yeasts. *Ciencias Marinas*, 32, 673–682.
- Honke, J., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, C., Frias, J., Gorecky, R., 1998.** Changes in quantities of inositol phosphates during maturation and germination of legume seeds. *Z. Lebensm Unters Forsch. A* 206: 279-283.
- Houde, R.L., Alli, I., Kermasha, S. 1990.** Purification and characterisation of canola seed (*Brassica sp.*) phytase. *Journal of Food Biochemistry*, 114: 331-351.
- Howson, S. J. Davis, R. J. 1983.** Production of phytate-hydrolising enzyme by fungi. *Enzyme Microbiol. Technol.* 5, 377-382.
- Hu, H.L., Wise, A., Henderson, C. 1996.** Hydrolysis of phytate and inositol tri-, tetra-, and penta-phosphates by the intestinal mucosa of the pig. *Nutrition Research*, 16, 781–787.
- Hughes KP, Soares Jr J.H. 1998.** Efficacy of phytase on phosphorus utilization in practical diets fed to striped bass, *Morone saxatilis*, *Aquaculture Nutrition*, 4: 133–140.
- Idriss, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T. Borriss, R. 2002.** Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plantgrowth- promoting effect. *Microbiology*, 148: 2097–2109.

**Igbasan, F.A., Manner, K., Miksch, G., Borriss, R., Farouk, A., Simon, O. 2000.** Comparative studies on the in vitro properties of phytases from various microbial origins. *Arch. Anim. Nutr.* 53: 353–373.

**Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. 1990.** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96: 23-28.

**Iqbal, T.H., Lewis, K.O., Cooper, B.T. 1994.** Phytase activity in the human and rat small intestine. *Gut*, 35, 1233–1236.

**Irving, G.C.J., Cosgrove, J. 1971.** Inositolphosphate Phosphatase of Microbial Origin. Observation on the Nature of the Active Center of Bacterial (*Pseudomonas* sp.) Phytase. *Austral. J. Biol.*, 24: 1559-1564.

**Jackson, J.F., Linskens, H.F. 1982.** Phytic acid in *petunia hybrida* pollen is hydrolysed during germination by a phytase. *Acta Botanica Neerlandica*, 315: 441–447.

**Jin, U.H., Chun, J.A., Lee, J.W., Yi, Y.B., Lee, S.W., Chung, C.H. 2004.** Expression and characterisation of extracellular fungal phytase transformed sesame hairy root cultures. *Protein Expression and Purification*, 37, 486–492.

**Kahn, M., House B. 2004.** “Method for cloning PCR products without restriction or ligation enzymes”, United States Patent Application, 20040166512.

**Karademir, A., Akgül, M., Tutuş, A., 2002.** Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı (Bölüm 1). *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 5(1).

**Karapınar, E., 2002.** Pamuklu Mamullerin Hidrofilileştirilmesinde Enzim Kullanımı, İzmir, s 23-36.

**Karimi, A. 2006.** Responses of broiler chicks to non-phytate phosphorus levels and phytase supplementation, *International Journal of Poultry Science*, 5: 251–254.

**Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., Apajalahti, J. 1998.** Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied Environmental Microbiology*, 64: 2079–2085.

**Kerovuo, J., 2000.** A Novel Phytase from *Bacillus*. Characterization and Production of the Enzyme. Academic Dissertation, 68 p., Helsinki.

**Kerovuo, J., Rouvimen, J., Hatzack, F., 2000.** Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a novel reaction mechanism. *Biochem. J.* 352: 623–628.

**Kerovuo, J., Tynkkynen, S. 2000.** Expression of *Bacillus subtilis* phytase in *Lactobacillus plantarum* 755 Letters in *Applied Microbiology*, 30: 325-329.

**Ketola, H.G., Harland, B.F. 1993.** Influence of phosphorus in Rainbow trout diets on phosphorus discharge in effluent water. *Trans. Am. Fish Soc.* 122:1120-1126.

**Kim, Y.O., Kim, H.K., Bae, K.S., Yu, J.H., Oh, T.K. 1998a.** Purification and Properties of a Thermostable Phytase From *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microb. Technol.*, 22: 2-7.

**Kim, Y.O., Lee, J.K., Kim, H.Y., Yu J.H., Oh, T.K. 1998b.** Cloning of the Thermostable Phytase Gene (phy) from *Bacillus* sp. DS11 and its Overexpression in *E. coli*. *FEMS Microbiol. Letters*, 162: 185-191.

**Kim, Y.O., Lee, J.K., Oh, B.C., Oh, T.K. 1999.** High Level Expression of a Recombinant Thermostable Phytase in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63(12): 2205-2207.

**Kim, J. Y., Hur S. H., Hong J. H., 2005.** Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. *Biotechnology Letters*, 27:313–316.

**Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., 2002.** Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 345-351.

**Knuckles, B. E., Kuzmicky, D. D., Betschart, A. A. 1985.** Effect of phytate and Partially hydrolyzed phytate on in vitro protein digestibility. *J. Food Sci.* 50:1081- 1082.

**Konietzny, U., Greiner, R., Jany, K.D. 1995.** Purification and characterization of a phytase from spelt. *Journal of Food Biochemistry*, 18: 165-183.

**Konietzny, U., Greiner, R., 2003.** Phytic acid: Nutritional Impact. In: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, B. Caballero, L. Trugo, P. Finglas (Eds.), Elsevier, London, UK, 4555-4563.

**Konietzyn, U., R. Greiner. 2004.** Bacterial phytase: Potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 11-18.

**Kornegay, E.T. 2001.** Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytates and factors influencing their activity, Bedford MR, Partridge GG (eds), *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, CABI Publishing, pp: 237–272, New York.

**Kotak, B.G., Kenefick, S.L., Fritz, D.L., Rousseaux, C.G., Prepas, E.E., Hruday, S.E. 1993.** Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta lakes and farm dugouts. *Water Res.* 27:495-506.

**Kumar V., Sinha A.K. , Makkar H.P.S., Becker K. 2010.** Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chemistry*, 120: 945-959.

**Kvist, S., Carlsson, T., Lawther, J.M., Decastro, F.B. 2005.** Process for the fractionation of cereal brans. US patent application US 20050089602.

**Laboure A.M., Gagnon J., Lescure A.M. 1993.** Purification and characterization of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. *Biochemical Journal*, 295: 413-419.

**Lassen, S. F., Breinholt, J., Ostergaard, P. R., Brugger, R., Bischoff, A., Wyss, M. Fuglsang, C. C. 2001.** Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. *Appl Environ Microbiol.* 67(10), 4701-4707.

**Lasztity, R. Lasztity, L. 1990.** Phytic acid in cereal technology. *Advances in Cereal Science and Technology*. Pomeranz , Y. (ed). pp 309-371. American Association of Cereal Chemists, USA.

**Laumen, K., Ghisalba, O., 1994.** Preparative-scale chemo-enzymatic synthesis of optically pure D-myo-inositol-1-phosphate. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 2046-2049.

**Lei, X.G., Porres, J.M., 2003.** Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnology Letters*, 25: 1787-1794.

**Lei, X.G., Porres, J.M., Mullaney, E.J. Brinch-Pedersen, H. 2007.** Phytase: source, structure and application. In: *Industrial Enzymes (Section E)* (Polaina, J. And MacCabe, A. P.), Springer, pp. 505–529, The Netherlands.

**Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, J.W.JR., Shadomy, J.H. 1985.** *Manual of clinical microbiology*. USA, 1149 pp.

**Li, J., Hegeman, C.E., Hanlon, R.W., Lacy, G.H., Denbow, M.D., Grabau, E.A., 1997.** Secretion of active recombinant phytase from soybean cell-suspension cultures. *Plant Physiology*, 114, 1103–1111.

**Lim, P.E., Tate, M.E. 1973.** The phytases. II. Properties of phytase fractions F 1 and F 2 from wheat bran and the myoinositol phosphates. *Biochimica et Biophysica Acta*, 302(2): 316-28.

**Lim, D., Golovan, S., Forsberg, C.W., Jia, Z. 2000.** Crystal structure of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate. *Nature Structure Biology*, 7: 108–113.

**Lin, S. 1997.** Identification of Contamination Sources of *B. cereus* in Pasteurized Milk. A Thesis Presented to Faculty of Graduate Studies of University of Guelph., Canada, 109 p.

**Liu, B.L., Rafiq, A, Tzeng Y., Rob, A. 1998.** Induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 415-424.

**Lopez, G., Leeson, S. 1995.** Response of broiler breeders to low-protein diets. 1. Adult breeder performance. *Poultry Science* 74, 685–695.

**Lopez, H.W., Leenhardt, F., Coudray, C., Remesy, C. 2002.** Minerals and phytic acid interactions: Is it a real problem for human nutrition? *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 727– 739.

**Lowe, D.A. 2001.** *Basic Biotechnology*. (Ed: Ratledge C. and Kristionsen B.), Second Edition, Cambridge University Pres.

**Lucas, M. 1983.** Determination of acid surface pH in vivo in rat proximal jejunum, *Gut*, 24: 734–739.

**Lucca, P., Hurrell, R., Potrykus, I., 2001.** Approaches to improve the bioavailability and level of iron in rice seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 828–834.

**Maenz, D.D., Classen, H.L. 1998.** Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poultry Science*, 77: 557–563.

**Maenz, D.D., Engele-Schaan C.M., Newkirk R.M., Classen H.L. 1999.** The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal, *Animal Feed Science and Technology*, 81: 177–192.

**Maenz, D.D. 2001.** Enzymatic characteristics of phytases as they relate to their use in animal feeds, Bedford MR, Partridge GG (eds), *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, CABI Publishing, pp: 61–84, New York.

**Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. 1982.** Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory.

**Maugenest, S., Martinez, I., Lescure, A., 1997.** Cloning and characterization of a cDNA encoding a maize seedling phytase. *Biochem. J.* 322: 511–517.

**Maugenest, S., Martinez, I., Godin, B., Perez, P., Lescure, A.M., 1999.** Structure of two maize phytase genes and their spatio-temporal expression during seedling development. *Plant Molecular Biology*, 39, 503– 514.

**Mccollum, E.V., Hart, E.B., 1908.** On the occurrence of a phytin-splitting enzyme in animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 4(6), 497–500.

**Mcdonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D. 1987.** Animal Nutrition. Minerals. Longman Scientific & Technical. 4th Edition. England.

**McKnight, W.F. 1997.** A review of the use of natuphos in broiler, layer and turkey diets. 58 th Minnesota Nutr. Conf. And BASF Tech. Symp. September 22-24, Bloomington, Minnesota, 61-76.

**MEGEP, 2007.** Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Geliştirilmesi Projesi, Gıda Teknolojisi, Enzimlerin Özellikleri.

**Mroz, Z., Jongbloed, A.W., Kemme, P.A. 1994.** Apparent digestibility and retention of nutrients bound to phytate complexes as influenced by microbial phytase and feeding regimen in pigs. *Journal of Animal Science*. 72: 126-132.

**Mudge, S.R., Smith, F.W., Richardson, A.E., 2003.** Root-specific and phosphate regulated expression of phytase under the control of a phosphate transporter promoter enables *Arabidopsis* to grow on phytate as a sole P source. *Plant Science*, 165, 871–878.

**Mullaney, E.J., Daly, C.B., Ullah, A.H.J. 2000.** Advances in phytase research. *Advances in Applied Microbiology*, 47: 157–199.

**Mwachireya, S.A., Beames, R.M., Higgs, D.A., Dosanjh, B.S., 1999.** Digestibility of canola protein products derived from the physical, enzymatic and chemical processing of commercial canola meal in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) held in fresh water. *Aquacul. Nutr.*, 5: 73- 82.

**Nakamura, T., Suzuki, T., Tokuda, J., Kato, N., Sakai, Y., Mochizuki, D., Takahashi, H. 1999.** Secretory Manufacture of *Schwanniomyces occidentalis* Phytase Using a *Candida boidinii* host. *Eur. Patent Appl.* EP 931, July 28, 837pp.

**Nakano, T., Joh, T., Tokumoto, E., Hayakawa, T., 1999.** Purification and characterisation of phytase from bran of *Triticum aestivum* L. cv. Nourin #61. *Food Science and Technology Research*, 5(1), 18–23.



**Nelson, T.S. 1967.** The utilization of phytate phosphorus by poultry. *Poult. Sci.* 46:862- 871.

**Nelson, T. S., Shieh, T.R., Wodzinski, R.J., ware, J.H. 1968.** The availability of phytate phosphorus in soya bean meal before and after treatment with a mold phytase. *Poult. Sci.* 47:1842-1848.

**Nelson, D.L., Cox, M.M., 2004.** Enzymes Lehninger Principles of Biochemistry, Chapter 6. W. H. FREEMAN, Fourth Edition. p. 190-249, Madison.

**Newman, K., 1991.** Phytase: The enzyme, its origin and characteristics, impact on potential for increasing phosphorus availability. *Biotechnology in the Feed Industry. Proc. of Alltech Seventh Annual Symposium.*

**Oberleas, D. 1973.** Phytates, in *Toxicants Occurring Naturally in Foods*, National Academy of Sciences, Washington, DC, p 363-371.

**O'Dell, B. L., Borland, A. 1976.** Complexation of phytase with proteins and cations in corn germ and oilseed meals. *J. Agric. Food Chem.* 24:804-808.

**Officer, D.I., Batterham, E.S. 1992.** Enzyme supplementation of Linola meal for growing pigs. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production.* 9: 288-296.

**Oh, B.C., Chang, B.S., Park, K.H., Ha, N.C., Kim, H.K., Oh, B.H., Oh, T.K. 2001.** Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloloquefaciens* DS11. *Biochemistry*, 40: 9669–9676.

**Oh, B.C., Choi, W.C., Park, S., Kim, Y.O., Oh, T.K. 2004.** Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phosphatase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63: 362-372.

**Onyango, E.M., Bedford, M.R., Adeola, O. 2005.** Efficacy of an evolved *Escherichia coli* phytase in diets of broiler chicks, *Poultry Science*, 84: 248–255.

**Paik, I. 2003.** Application of phytase, microbial or plant origin, to reduce phosphorus excretion in poultry production, *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 16: 124–135.

**Pallauf, J., Rimbach, G., Pippig, S., Schindler, B. Most., E.1994.** Effect of phytase supplementation to a phytate-rich diet based on wheat, barley and soya on the bioavailability of dietary phosphorus, calcium, magnesium, zinc and protein in piglets. *Agrobiol. Res.*, 47, 39–48.

**Pallauf, J., Rimbach, G. 1997a.** Effect of supplemental phytase on mineral and trace element bioavailability and heavy metal accumulation in pigs with different type diets. In: *Phytase in animal nutrition and waste management*. M. B. Coehlbo and E.T. Kornegay, Ed. BASF publication DC 9601.

**Pallauf J., Rimbach, G. 1997b.** Nutritional significance of phytic acid and phytase, *Archives of Animal Nutrition*, 50: 301–319.

**Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M., Van Loon, A.P.G.M. 1997a.** Gene cloning, purification and characterization of a heat-stable phytase from fungus *Aspergillus fumigatus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1696–1700.

**Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M., Loon A. P. G. 1997b.** Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(5), 1696-1700.

**Phillippy, B.Q., Mullaney, E.J. 1997.** Expression of an *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *E.coli*. *J. Agricult. Food Chem.*, 45(8): 3337-3342.

**Phillippy, B.Q. 1999.** Susceptibility of wheat and *Aspergillus niger* phytases to inactivation by gastrointestinal enzymes, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47: 1385–1388.

**Phillippy, B.Q., Wyatt, C.J. 2001.** Degradation of phytate in foods by phytases in fruits and vegetable extracts. *Journal of Food Science*, 66: 535-539.

**Pointillart, A. 1994.** The importance of cereal phytases, *Feed Mix*, 2: 12–15.

**Ponstein, A.S., Bade, J.B., Verwoerd, T.C., Molendijk, L., Storms, J., Beudeker, R.F., Pen, J. 2002.** Stable expression of phytase (phyA) in canola (*Brassica napus*) seeds: Towards a commercial product. *Molecular Breeding*, 10, 31–44.

**Powar, V.K., Jagannathan, V. 1982.** Purification and Properties of Phytate-specific Phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 151: 1102-1108.

**Puminn, O. 2003.** Broiler performance and mineral utilization of enzyme-supplemented defatted rice bran diet during heat stress, PhD Thesis, The University of Tennessee, Knoxville.

**Quan, C., Zhang, L., Wang, Y., 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., Kikuchi, Y. 2004.** Purification and properties of a low-molecularweight phytase from *Cladosporium* sp. FP-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94: 260-266.

**Raboy, V. 2001.** Seeds for a better future: Low phytate grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. *Trends in Plant Science*, 6: 458-462.

**Rao, M.B., Tanksale, A.M. Gathe, M.S., Deshpande, W., 1998.** Molecular and Biotechnological Aspect of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*62(3): 597-635.

**Rao, S.V.R., Reddy V.R. 2007.** Phytin phosphorus for eco-friendly products, Erişim: [<http://www.wattnet.com/Archives/Docs/901pi46.pdf?CFID=25710&CFTOKEN=74030876>], Erişim Tarihi: 15.02.2007.

**Ravidran, V., Bryden, W.L., Kornegay, E.T. 1995.** Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult. Avian Biol. Rev.* 6:125-143.

**Reddy, N.R., Sahe, S.K., Salunkhe, D.K. 1982.** Phytases in legumes and cereals. *Advances in Food Research*, 28: 1-92.

**Reddy, N. R., Pierson, M. D., Sahe, S., Salunkhe, D. K. 1989.** Phytates in cereals and legumes. CRC Pres, Inc., Boca Raton, Fla.

**Reddy, N.R. 2002.** Occurrence, distribution, content, and dietary intake of phytate, Reddy NR, Sahe SK, (eds), *Food Phytates*, CRC Press LLC, pp: 25–51, Boca Raton, FL.

**Rickard, E.S., Thompson, L.U. 1997.** Interactions and effects of phytic acid. *Antinutrients and Phytochemicals in Food*. Shahidi, F. (ed). pp 294-313 American Chemical Society. Washington D.C.

**Robinson, E.H., Jackson, S., Li, M.H. 1996.** Supplemental phytase in catfish diets. *Aquacul. Mag.*, 22: 80-82.

**Rodriguez, E., Mullaney, E., 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.

**Rodriguez, E., Wood, Z.A., Karplus, P.A., Lei, X.G. 2000b.** Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.* 382: 105–112.

**Rosovitz, M.J., Voskuil, M.I., Chambliss, G.H. 1998.** “*Bacillus*, Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology, Ninth Edition, Volume 2”, By Edited L. Collier, A. Balows And M. Susman, Oxford University Pres, New York, 1152-1162.

**Saeki, K., Oazki, K., Kobayashi T., Ito, S. 2007.** Detergent alkaline proteases: Enzymatic properties, genes, and crystal structures. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 103(6):501-508.

**Sandberg, A.S., Larsen, T., Sandstrom, B. 1993.** High dietary calcium level decreases colonic phytate degradation in pigs fed a rapeseed diet. *Journal of Nutrition*, 123, 559–566.

**Sandberg, A.N., Andlid, T. 2002.** Phytogetic and microbial phytases in human nutrition. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 823–833.

**Santosa, D.A., Hendroko, R., Farouk, A., Greiner, R., 2004.** A rapid and highly efficient method for transformation of sugarcane callus. *Molecular Biotechnology*, 28, 113–118.

**Sarıfakıoğulları, K., Önel, A. G. 1998.** Fitik asit ve fitaz enziminin kanatlı beslenmesindeki önemi. *Yem Magazin*, Ağustos. 60-67.

**Sarıkaya, E., 1995.**  $\alpha$ -amilaz Üreten Bazı Bacillus Suşlarının Gelişme Parametreleri, Enzim Özellik ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.

**Sathe, S.K., Reddy, N.R. 2002.** Introduction, Reddy NR, Sathe SK (eds), *Food Pyhtates*, pp: 1–5, Boca Raton.

**Scott, M. C., Neisheim, M. C., Young, R. S. 1982.** *Nutrition of the Chicken*. 3th. Edition, M. C. Scott and Associates, Ithaca , New York, USA.

**Scott, J.J., Loewus, F.A. 1986.** A calcium-activated phytase from pollen of *Lilium longiflorum*. *Plant Physiology*, 82: 333-335.

**Sebastian, S., Touchburn, S. P., Chavez, E.R., Lague, P.C. 1997.** Apparent digestibility of protein and amino acids in broiler chickens fed corn-soybean diet supplemented with microbial phytase. *Poult. Sci.* 76:1760-1769.

**Segueilha, L., Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G., Galzy, P. 1992.** Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces costellii*. *J. Ferment. Bioengin.*74:7-1 1.

**Selle, P.H., Ravindran, V., Caldwell, R.A., Bryden, W.L. 2000.** Phytate and phytase: Consequences for protein utilisation. *Nutrition Research Reviews*, 13: 255-278.

**Selle, P.H., Ravindran, V. 2007.** Microbial phytase in poultry nutrition, *Animal Feed Science and Technology*, 135: 1–41.

**Selle, P. H., Ravindran, V. Ravindran, G., Bryden, W. L. 2007a.** Effects of dietary lysine and microbial phytase on growth performance and nutrient utilization of broiler chickens. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, 20, 1100-1108.

**Selle, P.H., Gill, R.J., Scott, T.A. 2007b.** Effects of pre-pelleted wheat and phytase supplementation on broiler growth performance and nutrient utilisation. *Proceedings of Australian Poultry Science Symposium*, 19: 182-185.

**Shah, V., Parekh, L.J. 1990.** Phytase from *Klebsiella* sp. No. PG-2: Purification and Properties. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 27: 98-102.

**Shamsuddin, A.M. 1999.** Metabolism and cellular functions of IP6: a review. *Anticancer Research*, 19: 3733-3736.

**Sharpley, A.N., Chapra, S.C., Wedepohl, R., Sims, J.T., Danel, T.C., Reddy, K.R. 1994.** Managing agricultural phosphorus for protection of surface waters: Issues and options. *J. Environ. Qual.* 23:437-451.

**Sharpley, A. 1999.** Reducing the environmental impact of poultry production Focus on phosphorus. *Poult. Science*, 78:660-673.

**Shieh, T. R., Ware, J. H. 1998.** Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Appl. Microbiol.* 16, 1348-1351.

**Shimizu, M. 1992.** Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (nato) N-77. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56: 1266-1269.

**Shin, S., Ha, N.C., Oh, B.C., Oh, T.K., Oh, B.H. 2001.** Enzyme mechanism and catalytic property of  $\beta$ -propeller phytase. *Structure*, 9: 851-858.

**Simell, M., Turunen, M., Pironen, J., Vaara, T. 1989.** Feed and food applications of phytase. Lecture-3rd Meet. *Industrial Applications of Enzymes*, Barcelona (Spain).

**Siren, M., 1995.** Method of treating pain using inositol triphosphate. U.S. Patent 5407924.

**Siren, M., 1986a.** Stabilized pharmaceutical and biological material composition. Pat. SE 003 165.

**Siren, M., 1986b.** New myo-inositol triphosphoric acid isomer. Pat. SW 052950.

**Siren, M., Lofkvist, B., Edvinsson, L., 1992.** Method of treating cardiovascular diseases using inositoltrisphosphate. U.S. Patent 5128332.

**Siren, M., 1998.** Use of an ester of inositoltriphosphate for the preparing of medicaments. U.S. Patent 5846957.

**Simons, P.C.M., Versteegh, H.A.J., Jongbloed, A.W., Kemme, P.A., Slump, P., Bos, K.D., Wolters, M.G.E., Beudeker, R.F., Verschoor, G.J. 1990.** Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *Br. J. Nutr.* 64:525-540.

**Singh, M., Krikorian, A. D. 1982.** Inhibition of trypsin activity in vitro by phytate. *J. Agric.Food Chem.* 30:799-800.

**Skowronski, T. 1978.** Some properties of partially purified phytase from *Aspergillus niger*. *Acta Microbiologica Polonica*, 27: 41-48.

**Smith, J.E., 2004.** *Biotechnology*. Cambridge University Press, New York, p.271.

**Sneath, P.H.A., 1986.** "Endospore-Forming Gram-Positive Rods and Cocci, *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2*", Edited by P. H. A Sneath, N. S., Mair, M. E., Sharpe, J. G. Holt, Williams and Wilkins, Baltimore, 1104-1139, Baltimore.

**Sutardi, Buckle, K.A. 1988.** Characterization of extra- and intracellular phytases from *Rhizopus oligosporus* used in tempeh production. *Int. J. Food Microbiol.* 6: 67- 79.

**Suzuki, U., Yoshimura, K., Takaishi, M. 1907.** About the enzyme 'phytase', which splits 'anhydro-oxy-methylene diphosphoric acid". *Bulletin of the College of Agriculture, Tokyo Imperial University*, 7, 503–512 (in German).

**Swick, R. A., Ivey, F. T., 1992.** Phytase: The value of improving phosphorus retention. *Feed Management*, reprinted from, January, 1992.

**Szczurek, W., Pisulewski, P. 1996.** Performance indices and nitrogen load in the manure of chicken broilers fed on low-protein feed mixtures enriched with pure amino-acid supplements. *Zeszyty Naukowe Zootechniki AR Kraków*, in 23 (3), 189-197.

**Şenköylü. N., 2002.** Fitaz enzimi ve protein küspelerine yönelik enzimler. 6. Uluslar arası Yem Kongresi ve Yem Sergisi.141-151.

**Tarnbe, S.M., Kaklij, G.S., Kelkar, S.M., Parekh, L.J. 1994.** Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: Evidence for unusually small active enzyme peptide. *J. Ferment. Bioeng.* 77: 23-27.

**Temiz, A. 1994.** Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri. Ankara, s. 26-120.

**Thompson, L.U., Button, C.L., Jenkins, D. J. A. 1987.** Phytic acid and calcium affect the in vitro rate of navy bean starch digestion and blood glucose response in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 46:467-473.

**Tillett D., Neilan, B. A. 1999.** “ Enzyme-free cloning: a rapid method to clone PCR products independent of vector restriction enzyme sites”, *Nucleic Acids Research.*, 27, e26.

**Tolay, İ., Aytacı, Z., Gülmezoğlu, N., Budak, Z., Kınacı, G., Kınacı, E. 2005.** Tahıllarda Fitik Asit İçeriği ve Beslenme Açısından Önemi. Türkiye 6. Tarla Bitkileri Kongresi, 5-9 Eylül, Antalya (Derleme Sunusu Cilt 2, Sayfa 1187-1192).

**Türk Tabipleri Birliği, 2002.** “Ankara’da Satılan Sütlerin Değerlendirilmesi” [www.ttb.org/STED/sted0202/sut.pdf](http://www.ttb.org/STED/sted0202/sut.pdf) = (2002).

**Tye, A. J. 2002.** Characterization of two novel bacillus phytases and their foreseeable applications in transgenic plants. p:1-107. Master of Philosophy. The University of Hong Kong (Pokfulam, Hong Kong).

**Uhlir, H. 1998.** Industrial enzymes and their applications. New York : John Wiley and Sons. pp.37-202.

**Ullah, A.H.J., Gibson, D.M. 1987.** Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization, *Preparative Biochemistry*, 17: 63–91.

**Ullah, A.H.J., Phillippy, B.Q. 1994.** Substrate selectivity in *Aspergillus ficuum* phytase and acid phosphatase using myo-inositol phosphates, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 423–425.

**Ullah, A.H.J., Sethumadhavan, K., Mullaney, E.J., Ziegelhoffer, T., Austii-Phillips, S. 1999.** Characterization of Recombinant Fungal Phytase (phyA) Expressed in Tobacco Leaves. *Biochem. Res. Commun.*, 246(1):201-206.

**Ullah, A.H.J., Sethumadhavan, K., Lei, X.G., Mullaney, E.J. 2000.** Bio-chemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* phytase (phyA). *Biochemical and Biophysical Reserach Communications*, 275: 279-285.

**Ullah, A. H., Sethumadhavan, K., Mullaney, E. J., Ziegelhoffer, T., Austin-Phillips, S. 2002.** Cloned and expressed fungal phyA gene in alfalfa produces a stable phytase. *Biochem Biophys Res Commun.* 290(4), 1343-1348.

**Ullah, A.H.J., Sethumadhavan, K., Mullaney, E.J., Ziegelhoffer, T., Austin-Phillips, S. 2003.** Fungal phyA gene expressed in potato leaves produces active and stable phytase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 306, 603–609.

**Van Beilen, J.B., Li, Z. 2002.** Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 338-344.

**Van Etten, R.L. 1982.** Human prostatic acid phosphatase: a histidine phosphatase. *Annals of the New York Academy of Science*, 390: 27-51.

**Van Etten, R.L., Davidson, R., Stevis, P.E., MacArthur, H., Moore, D.L. 1991.** Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 266: 2313-2319.

**Van Hartingsveldt, W., C.M.J., Van Zeijl, M. Harteveld, R.J., Gouka, M.E.G., Suykerbuyk, R.G.M., Luiten, P.A., Van Paridon, G.C.M., Selten, A.E., Veenstra, R.F.M., Van Gorcom, C.A.M.J.J. Van den Hondel. 1993.** Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (phyA) of *Aspergillus niger*. *Gene*, 127: 87-94.

**Vats, P., Banerjee, U.C., 2004.** Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 3–14.

**Viveros, A., Centeno, C., Brenes, A., Canales, R., Lozano, A. 2000.** Phytase and acid phosphatase activities in plant feedstuffs, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 4009–4013.

**Vohra, A., 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.

**Vohra, A., Satyanarayana, T. 2003.** Phytases: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23: 29-60.

**Volfova, O., Dvorakova, J., Hanzlikova, A., Jandera, A. 1994.** Phytase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol.* 39, 481-484.

**Walker, A.R.P., Fox, F.W., Irving, J.T., 1948.** Studies in human mineral metabolism. 1. The effect of bread rich in phytate-phosphorus on the metabolism of certain mineral salts with special reference to calcium. *Biochemical Journal*, 42, 452–462.

**Wang, M., Hettiarachchy, N.S., Qi, M., Burks, W., Siebenmorgen, T., 1999.** Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 411-416.

**Weremko, D., Fandrejewski, H., Zebrowska, T., Han, K., Kim, J.H., Cho, W. T. 1997.** Bioavailability of phosphorus in feeds of plant origin for pigs Review. *Asian-Australians Journal of Animal Sciences*, 10: 551-566.

**Whitehurst, R.J., Van Oort, M. 2010.** *Enzymes in Food Technology*. Wiley- Blackwell, pp. 388, USA.



**William, A.S., Rouse, H., Champe, P., Harvey, A.R. 2001.** Lippincott's Illustrated Reviews Microbiology. Lippincott Williams&Wilkins.

**Wise, A., Gilbert, D. J. 1982.** Phytate hydrolysis in germfree and conventional rats. *Applied Environmental Microbiology*, 43: 753–756.

**Wiseman, A., 1987.** Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry p. 274-373.

**Wodzinski, R.J., Ullah, A.H.J. 1996.** Phytase, advances in applied microbiology, 42:263-302.

**Woese, C. R., Wolfe, R. S., 1985.** The bacteria, Volume VII, Academic Press, USA, ISBN: 0-12-307208-5.

**Woese, C. R. 1999.** Prokaryote systematics. The evolution of a science in: The prokaryotes. A handbook on the biology of Bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, applications, 3rd. Edt., (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. and Stackebrandt, E., Eds). Springer-Verlag, New York (electronic publication).

**Wolfgang, A. 2004.** Enzymes in industry: Production and applications. Wileyvch Verlag GmbH&Co. KgaA, pp 485, Weinheim.

**Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Remy, R., Fimbel, R., Oesterheld, G., Lehmann, M., Loon, A.P.G.M., 1999a.** Biochemical characterisation of fungal phytases ( myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase): Catalytic properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 367–373.

**Wyss, M., Pasamontes, L., Friedlein, A., Remy, R., Tessier, M., Kronenberger, A., Middendorf, A., Lehmann, M., Schnoebelen, L., Rothlisberger, U., Kuszniir, E., Wahl, G., Muller, F., Lahrn, H.W., Vogel, K., van Loon, A.P. 1999b.** Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 359-366.

**Yang, W.J., Matsuda, Y ., Inornata, M., Nakagawa, H. 1991a.** Developmental and dietary induction of the 90K subunit of rat intestinal phytase. *Biochim. Biophys. Acta* 1075: 83-87.

**Yang, W .J., Matsuda, Y ., Sano, S., Masutani, H., Nakagawa, H. 1991b.** Purification and characterization of phytase from rat intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* 1075: 75-82.

**Yanke, L. J., Bae, H.D., Selinger, L. B. Cheng, K. J. 1998.** Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology*, 144: 1565-1573.

**Yazgan, O., 1990.** Çiftlik hayvanlarının mineral beslenmesi. Doktora dersi , Basılmamış ders , notu.

**Yi, Z., Kornegay, E.T., Ravidran, V., Denbow, D.M. 1996.** Improving phosphorus availability in corn and soybean meal for broilers using microbial phytase and calculation of phosphorus equivalency values for phytase. *Poult. Sci.* 75:240-249.

**Yoon, S.J., Choi, Y.J., Min, H.K., Cho, K.K., Kim, J.W., Lee, S.C., Jung, Y.H. 1996.** Isolation and Identification of Phytase-producing Bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and Enzymatic Properties of Phytase Enzyme. *Enzyme and Microbial Technol.*, 18: 449-454.

**Zeman, N.W., Mccrea, J.M., 1985.** Alpha-amylase Production Using a Recombinant DNA Organism. *Cereal Foods World.* 30(1) : 777-780.

**Zemek J., Augustin J., Borris R., Kuniak L., Šváboá M., Páćová Z., 1981.** Polysaccharide-hydrolyzing enzymes in the genus *Bacillus*. *Folia Microbiol.* 26:403-407.

**Zhang, J., Madden, T.L. 1997.** “PowerBLAST: a newnetwork BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation” *Genome Res.*7:649-656.

**Zhang, W., Aggrey, S.E., Pesti, G.M., Bakalli, R.I., Edwards, H.M., 2005.** Correlated responses to divergent selection for phytate phosphorus bioavailability in a randombred chicken population. *Poultry Science*, 84, 536–542.

**Zhou M. Y, Gomez-Sanchez C. E. 2000.** “Universal TA cloning”, *Current Issues in Molecular Biology*, 2 (1), 1-7.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Behice ZEREN  
Doğum Tarihi ve Yeri : 1 Temmuz 1988 – İstanbul, Türkiye  
Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu

Lise :2002-2005, Yedikule Lisesi, İstanbul  
Lisans :2007-2012, Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Bursa  
Yüksek Lisans :2013-2015, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa

İletişim (e-posta) :zerenbehicezeren@gmail.com  
behicezeren@hotmail.com