

**TOPRAKTAN FİTAZ ENZİMİ ÜRETEN *BACILLUS SP.*
SUŞLARININ TARANMASI VE BESİNSEL
FAKTÖRLERİN FİTAZ ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Eren BAYGIN



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TOPRAKTAN FİTAZ ENZİMİ ÜRETEEN *BACILLUS* SP. SUŞLARININ
TARANMASI VE BESİNSEL FAKTÖRLERİN FİTAZ ÜRETİMİ ÜZERİNE
ETKİSİ**

Eren BAYGIN

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA - 2015

TEZ ONAYI

Eren BAYGIN tarafından hazırlanan ‘Topraktan fitaz enzimi üreten *Bacillus* sp. suşlarının taranması ve besinsel faktörlerin fitaz üretimi üzerine etkisi’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği 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 İmza
Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Sibel TAŞ İmza
Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ayşegül KUMRAL İmza
Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi,
Gıda Mühendisliği 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 çalışmasında;

- 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.

20/01/2015

İmza

Eren BAYGIN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TOPRAKTAN FİTAZ ENZİMİ ÜRETEN *Bacillus* sp. SUŞLARININ TARANMASI
VE BESİNSEL FAKTÖRLERİN FİTAZ ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Eren BAYGIN

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 20 *Bacillus* sp. suşu ekstraselüler fitaz üreticisi olarak bulunmuştur. Bu suşlar arasında, en geniş zona (11 mm) sahip *Bacillus* sp. suşu seçilmiş ve bu suş *Bacillus* sp. EBD 9-1 olarak isimlendirilmiştir. Bu yeni izolat 6 farklı içerikli sıvı ortamda enzim üretim kapasitesi için test edilmiştir. Bu sıvı ortamlar arasında, en yüksek enzim aktivitesi (210 U/mL) TS ortamında tespit edilmiştir. *Bacillus* sp. EBD 9-1 suşunun 48. saate maksimum seviyede fitaz ürettiği bulunmuştur. Besinsel faktörler enzim üretimi üzerinde etkilidirler. Bu amaçla, enzim üretimi üzerine farklı karbon, nitrojen kaynakları ve metal iyonları gibi ana ortam maddelerinin etkileri araştırılmıştır. Kullanılan karbon kaynakları arasında, laktoz (408 U/mL) ve buğday kepeği (408 U/mL) enzim üretimi üzerinde çok yüksek bir potansiyel göstermiştir. En iyi organik azot kaynağı et özütü (365 U/mL) olarak bulunmuştur. İnorganik azot kaynakları organik kaynaklar kadar etkili değildiler. En iyi metal iyonu olarak CaCl₂ (282 U/mL) bulunmuştur. Enzim üretimi, sırasıyla laktoz ve buğday kepeği, et özütü, CaCl₂ varlığında % 94,% 74 ve% 34 oranında artmıştır.

Fitaz üretimini artırmak amacıyla, yeni ortam en iyi karbon, nitrojen kaynakları ve metal iyonlarının birleştirilmesi ile elde edilmiştir. Bu ortamda, enzim verimi (311 U/mL), bazal ortamına kıyasla % 48 artırılmıştır.

Bu yeni izole edilen suşun endüstriyel ölçekte fitaz üretimi, büyük bir potansiyele sahip olabilir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, Fitaz, Taranma, Besinsel Faktörler

2015, xiv + 88

ABSTRACT

MSc Thesis

SCREENING OF PHYTASE ENZYME PRODUCING *Bacillus* sp. STRAINS FROM SOIL AND EFFECT OF NUTRITIONAL FACTORS ON THE PRODUCTION OF PHYTASE

Eren BAYGIN

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

Supervisor: Prof. Dr. Elif DEMIRKAN

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 determined 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 20 *Bacillus* sp. strains were found as extracellular phytase producer. The bacteria which has the most largest zone (11 mm) selected, and strain is named as *Bacillus* sp. EBD 9-1. This new isolate was tested for enzyme production capacity in the six different liquid media. Among of these liquid media, the highest enzymatic activity (210 U/mL) was determined in TS medium. It was found out that *Bacillus* sp. EBD 9-1 strain produced phytase on maximum level at 48th hour. The nutritional factors are affecting on the production of enzymes. For this purpose, the effects of major medium ingredients, such as different carbon, nitrogen sources and metal ions, on the production of the enzyme were investigated. Among the carbon sources used, lactose (408 U/mL) and wheat bran (408 U/mL) showed the highest potential on the enzyme production. The best organic nitrogen source was meat extract (365 U/mL). Inorganic nitrogen sources were not as effective as organic sources. CaCl₂ (282 U/mL) was found as the best metal ions. The enzyme production was increased by 94% , 74% and 34% in the presence of lactose and wheat bran, meat extract CaCl₂, respectively.

In order to enhance the production of phytase, a new medium was obtained by combining the best carbon and nitrogen sources, and metal ions. In this medium, enzyme yield (311 U/mL) was enhanced 48% compared to basal medium.

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

Key words: *Bacillus*, Phytase, Screening, Nutritional Factors

2015, xiv + 88

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana araştırma olanağı sağlayan ve çalışmamın her aşamasında yakın ilgi gösteren, yardım ve önerileri ile beni yönlendiren danışmanım Sayın Prof. Dr. Elif DEMİRKAN' a,

OUAP(F)-2012/11 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi Başkanlığı'na,

Çalışmamda kullandığım toprak örneklerini getiren bölümümüz öğrencilerine,

Akademik çalışmalarım ve yaşantımda yanımda olan ve desteğini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Behice ZEREN, Dilara AKÇAKOCA ve Alev USTA'ya,

Üniversite hayatım boyunca her zaman desteklerini hissettiğim, bağlarımızı hiç koparmayacağıma inandığım değerli arkadaşlarıma ve Ceren OKUMUŞOĞLU'na

Hayatımın her anında yanımda olup beni destekleyen, maddi manevi yardımlarını esirgemeyen başta sevgili anneannem ve dedem Samiye KORKMAZ ve Halit KORKMAZ'a; annem Ayla BAYGIN ve babam Mustafa BAYGIN'a; Ali Osman KORKMAZ'a, Birsen KORKMAZ'a ve tüm aileme en içten dileklerle teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Eren BAYGIN

20/01/2015

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	6
2.1. Fitik Asitlerin Tarihçesi ve Kimyasal Yapısı.....	6
2.2. Fitik Asitlerin Bitkilerdeki Dağılımı ve Fizyolojik Fonksiyonları	9
2.3. Fitik Asitlerin Anti Besinsel Etkisi	10
2.4. Fitik Asitlerin Çevresel Etkileri	12
2.5. Fitaz Enzimi (<i>Myo</i> -inositol-hegzafosfat fosfohidrolaz) ve Genel Özellikleri.....	13
2.6. Fitazların Sınıflandırılması.....	16
2.7. Fitaz Enziminin Kaynakları	18
2.7.1. Bitkisel fitazlar	18
2.7.2. Hayvansal fitazlar.....	20
2.7.3. Mikrobiyal fitazlar	20
2.7.3.1. Fungal fitazlar	23
2.7.3.2. Bakteriyel fitazlar.....	23
2.8. <i>Bacillus</i> Hakkında Genel Bilgiler	24
2.9. <i>Bacillus</i> Fitazlarının Özellikleri	27
2.10. Fitazların Endüstride Kullanım Alanları.....	30
2.10.1. Yem katkı maddesi.....	30
2.10.2. Gıda endüstrisi	31
2.10.3. Kâğıt endüstrisi	33
2.10.4. Toprak iyileştirme çalışmaları.....	33
2.10.5. Biyoteknoloji.....	33
2.10.6. <i>Myo</i> -inositol fosfatların hazırlanması	33

3. MATERYAL VE YÖNTEM	35
3.1. Materyal	35
3.2. Yöntem.....	35
3.2.1. Fitaz pozitif bakterilerin izolasyonu.....	35
3.2.2. <i>Bacillus</i> 'un taksonomik sınıflandırması için morfolojik ve fizyolojik özelliklerin belirlenmesi	36
3.2.2.1. Hareketlilik testi.....	37
3.2.2.2. Katalaz testi	37
3.2.2.3. Nişastanın hidrolizi testi.....	37
3.2.2.4. Gram boyama	38
3.2.2.5. Spor boyama	38
3.2.3. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri.....	38
3.2.4. Enzim üretim ortamının belirlenmesi	39
3.2.5. Bakteri üretim koşulları.....	40
3.2.6. Bakteri üremesinin ölçülmesi.....	41
3.2.7. Enzim aktivitesinin ölçülmesi	41
3.2.8. İnorganik fosfat standart grafiği ve hazırlanışı	42
3.2.9. Enzim aktivitesinin ölçümünde kullanılan solüsyonlar	42
3.2.9.1. 0,1 M Tris-HCl tamponunun (pH 7) hazırlanması.....	42
3.2.9.2. % 5'lik TCA (Trikloroasetik asit) çözeltisinin hazırlanması	43
3.2.9.3. Substrat çözeltisinin hazırlanması.....	43
3.2.9.4. Renk ayırıcı çözeltisinin hazırlanması.....	43
3.2.9.5. KH_2PO_4 çözeltisinin hazırlanması.....	43
3.3. Bakteri Gelişimi ve Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Faktörler	43
3.3.1. Karbon (C) kaynaklarının etkisi.....	43
3.3.2. Azot (N) kaynaklarının etkisi.....	44
3.3.3. Metal iyonlarının etkisi	44
3.3.4. Maksimum fitaz üretimi için modifiye ortamın hazırlanması	44
4. BULGULAR	45
4.1. Fitaz Pozitif Bakterilerin Belirlenmesi	45
4.2. Biyokimyasal ve Morfolojik Testler	46
4.2.1. Biyokimyasal testler.....	47

4.2.1.1. Katalaz testi	47
4.2.1.2. Nişasta hidroliz testi	48
4.2.2. Morfolojik testler	48
4.2.2.1. Koloni yapısı ve bakterilerin şekli	48
4.2.2.2. Hareketlilik testi	49
4.2.2.3. Gram boyama	50
4.2.2.4. Spor boyama	50
4.3. Fitaz Üretim Ortamının Belirlenmesi	51
4.4. İnorganik Fosfat Standart Grafiği ve Hazırlanışı	54
4.5. Bakteri Gelişimi ve Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Faktörler	55
4.5.1. Karbon kaynaklarının etkisi	55
4.5.2. Azot kaynaklarının etkisi	56
4.5.3. Metal kaynaklarının etkisi	59
4.5.4. Maksimum fitaz üretimi için modifiye ortamın oluşturulması	60
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	62
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	88

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde Orantı
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum Sülfat
°C	Santigrat Derece
Å	Angström
Ba ²⁺	Baryum İyonu
C	Sitozin
Ca ²⁺	Kalsiyum İyonu
CaCl ₂ .2H ₂ O	Kalsiyum Klorür Dihidrat
Cd ²⁺	Kadmiyum İyonu
cm	Santimetre
CO ₂	Karbondioksit
Co ²⁺	Kobalt İyonu
Cr ²⁺	Krom İyonu
Cu ²⁺	Bakır İyonu
CuSO ₄	Bakır Sülfat
dk	Dakika
Fe ²⁺ / Fe ³⁺	Demir İyonu
FeSO ₄ .7H ₂ O	Demir Sülfat Heptahidrat
G	Guanin
g	Gram
g/mol	Mol Kütlesi
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HCl	Hidroklorik Asit
Hg ²⁺	Gümüş İyonu
I	İyot
IU	Uluslararası Enzim Ünitesi

K^{2+}	Potasyum İyonu
kb	Kilobaz
KCl	Potasyum Klorür
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
KH_2PO_4	Potasyum Dihidrojen Fosfat
KI	Potasyum İyodür
Km	Michaelis-Menten Sabitesi
KNO_3	Potasyum Nitrat
$LiSO_4$	Lityum Sülfat
Log	Logaritmik
M	Molar
mg	Miligram
Mg^{2+}	Magnezyum İyonu
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Magnezyum Sülfat
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
Mn^{2+}	Mangan İyonu
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	Mangan Sülfat Heptahidrat
N	Normal
Na	Sodyum
Na^{2+}	Sodyum İyonu
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	Disodyum Hidrojen Fosfat Heptahidrat
NaCl	Sodyum Klorür
$NaDPH_2 \cdot Na_4$	Dihyronicotinamide Adenin Dinucleotide
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	Sodyum Dihidrojen Fosfat Dehidrat

NaHPO_4	Sodyum Fosfat
NaNO_3	Sodyum Nitrat
NH_4Cl	Amonyum Klorür
NH_4NO_3	Amonyum Nitrat
nm	Nanometre
P	Fosfor
pKa	Asidik iyonlaşma sabitesinin negatif logaritması
R^2	Regresyon Katsayısı
Zn^{2+}	Çinko İyonu
ZnCl_2	Çinko Klorür
ZnSO_4	Çinko Sülfat
α	Alfa
β	Beta
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol

Kısaltmalar	Açıklama
¹³ C-NMR	Karbon-13 Nükleer Manyetik Rezonans
³¹ P-NMR	Fosfor-31 Nükleer Manyetik Rezonans
AMP	Adenozin Monofosfat
ATP	Adenozin Trifosfat
BPP	β-Propellar fosfataz
cDNA	Complementary Deoksiribonükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTT	1,4-dithiothreitol
EC	Enzim Komisyonu
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
Ex	Ekstrasellüler
HAP	Histidin asit fosfataz
HIV	Human Immunodeficiency Virus
In	İntrasellüler
Ins	İnositol
IP	İnositol Fosfat
IUBMB	Uluslar Arası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
IUPAC	Uluslar Arası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
LB	Luria broth
MIPP	Sıçan İnositol Polifosfat Fosfatazı
mRNA	Messenger Ribonükleik Asit
MW	Moleküler ağırlık
O.D.	Optik Densite
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PAP	Purple asit fosfataz
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PSM	Phytase Screening Medium (Fitaz tarama ortamı)

rpm	Revolutions Per Minute
s	Saniye
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
sp.	Tür
TCA	Trikloro asetik asit
Tris	2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
Vmax	Maksimum enzim aktivitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Küresel endüstriyel enzim pazarı 2009-2016	4
Şekil 2.1. Suzuki ve arkadaşları (1907) tarafından önerilen fitin yapısı.....	6
Şekil 2.2. (A) Neuberg (1908) ve (B) Anderson (1914) tarafından önerilen fitat (fitik asit) yapısı.....	7
Şekil 2.3. Fitik asit (<i>myo</i> -inositol-1,2,3,4,5,6-hexafosfat)	8
Şekil 2.4. Fitik asitteki fosfor grupları ile nişasta, protein ve metal iyonu komplekslerinin farklı bağlanma yolları.....	9
Şekil 2.5. Fitatın, fitaz enzimi ile inositole hidrolizi.....	13
Şekil 2.6. Fitik asit defosforilasyonunun başladığı konuma göre fitazların çeşitleri.....	17
Şekil 2.7. Biyokimyasal özellikleri ve sekans analizlerine göre fitazların sınıflandırılması	18
Şekil 3.1. Kullanılan toprak örneklerinin alındığı iller	35
Şekil 4.1. Fitaz üreten <i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1' in PSM ortamındaki görüntüsü.....	45
Şekil 4.2. <i>Bacillus</i> sp. izolatların taksonomik özellikleri.....	47
Şekil 4.3. Belirlenen kolonilerde serbest oksijenin kabarcıklar halinde görünümü (<i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1).....	47
Şekil 4.4. Nişasta hidrolizi sonucunda iyotla boyanmış ve boyanmamış bölgeler (<i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1).....	48
Şekil 4.5. Bakteriyal koloni tipleri.....	48
Şekil 4.6. EBD 9-1 bakterisinin dalgalı koloni yapısı	49
Şekil 4.7. Petri kutusundaki yumuşak agarlı besiyerinde hareketlilik kontrolü (<i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1)	49
Şekil 4.8. <i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1'in ışık mikroskobunda görünümü (100X)	50
Şekil 4.9. <i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1'in spor boyama sonrası görünümü (100X)	51
Şekil 4.10. <i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1'in Çizelge 3.4'te verilen besiyerlerindeki fitaz üretim kapasitelerinin karşılaştırılması	52
Şekil 4.11. <i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1'in Çizelge 3.4'te verilen besiyerlerindeki üreme değerleri	53

Şekil 4.12. <i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1'in Besiyeri 2'de fitaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri.....	54
Şekil 4.13. İnorganik fosfat standart grafiği	54
Şekil 4.14. Farklı karbon kaynaklarının 48. saatte, <i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1'in enzim aktivitesi üzerine etkileri	56
Şekil 4.15. Organik ve inorganik azot kaynaklarının 48. saatte <i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1'in fitaz üretim kapasitesi üzerine etkileri.....	58
Şekil 4.16. Organik ve inorganik azot kaynaklarının 48. saatte <i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1'in fitaz üretim kapasitesi üzerine etkileri.....	60
Şekil 4.17. Besiyeri 2 ve Modifiye ortamda <i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1'in zamana karşı enzim aktivitelerinin ve üreme değerlerinin karşılaştırılması	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Bazı mikrobiyal fitaz kaynakları ve özellikleri	22
Çizelge 3.1. Fitaz pozitif bakterilerin seçiminde kullanılan katı besiyeri (PSM).....	36
Çizelge 3.2. Biyokimyasal ve morfolojik testlerde kullanılan besiyerleri.....	37
Çizelge 3.3. Bakteri saklanması ve geliştirmesinde kullanılan besiyerleri.....	39
Çizelge 3.4. Fitaz üretim ortamının tespitinde kullanılan sıvı besiyerleri Besiyeri 1, Besiyeri 2 (TS) ve 3 (PSM), Besiyeri 4, Besiyeri 5 ve 6.....	40
Çizelge 3.5. Fitaz aktivite tayini reaksiyon bileşenleri	42
Çizelge 4.1. Fitaz pozitif bakterilerin 96. saatteki zon çapları.....	46
Çizelge 4.2. <i>Bacillus</i> cinsinin belirlenmesinde kullanılan morfolojik testler ve test sonuçları.....	51
Çizelge 4.3. Farklı besiyerlerinin 24-96. saatte, <i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1'in enzim üretimi ve üremesi üzerine etkileri.....	52
Çizelge 4.4. 2. Besiyerinin 8-96. saatte, <i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1'in enzim üretimi ve üremesi üzerine etkileri	53
Çizelge 4.5. Farklı karbon kaynaklarının 48. saatte, <i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1'in enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri.....	56
Çizelge 4.6. Organik ve inorganik azot kaynaklarının 48. saatte <i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1'in fitaz aktivitesi ve üreme miktarı üzerine etkileri.....	58
Çizelge 4.7. Metal kaynaklarının 48. saatte <i>Bacillus</i> sp. EBD 9-1'in fitaz aktivitesi ve üreme miktarı üzerine etkileri.....	59
Çizelge 4.8. Kontrol olarak kullanılan besiyeri ve yeni modifiye besiyerinin içerikleri	60
Çizelge 4.9. Modifiye ortamdaki fitaz aktivitesinin ve bakteri üremesinin Besiyeri 2 ile karşılaştırılması.....	61

1. GİRİŞ

Günümüz modern hayatında kaynak ve enerji tasarrufu çok önemli bir hale gelmiştir. Bunu yapmanın yollarından bir tanesi de gıda tüketimindeki alışkanlıklarımızı değiştirerek çevre dostu bir yaşam tarzını benimsememizden geçmektedir.

Ekolojik sistem çok karmaşık yapıdaki besin zincirlerinden oluşmaktadır. İnsanlar ise besin zincirinin en üstündeki organizmalardan biridir. Bu uzun besin zinciri boyunca, aradaki basamaklarda çok fazla enerji kaybı olur ve bol miktarda CO₂ salınımı gerçekleşir. Bitkiler ve diğer ototrofik canlılar bir besin zincirinin ilk halkasını oluştururken; besin zincirinin üst basamaklarında hayvanlar aleminin çeşitli üyeleri bulunmaktadır. Son olarak, mikroorganizmalar (ayrıştırıcılar) besin zincirini sonlandıran ve her basamakta görev alan organizmalardır. İnsan, akıllı bir etobur olarak gıda zincirinin en üst basamağındadır ve bu yolu çeşitli yöntemlerle kısaltabilme potansiyeline sahiptir. Dolayısıyla bu durum enerji tasarrufu sağlayacak ve çevre kirliliğinin azaltılabilmesine olanak tanıyacaktır. İklim değişiklikleri, yenilenemeyen kaynakların tükenmesi, asitleme potansiyeli gibi çevresel problemler besin ve yem üretimini olumsuz yönde etkileyen etmenlerdir ve bunların önüne geçebilmek insanların elindedir (National Environmental Outlook 4 1997-2000, Chris ve Klaas 2000).

Sanayinin gelişmesi sonucu makineleşmenin artışından bu yana insanların fiziksel aktiviteleri azalmıştır. Bu duruma paralel olarak gıda tüketimi yani kalori ihtiyacıda azalmıştır fakat mikronütrient ihtiyacımızda herhangi bir değişiklik olmamıştır. Bu da demek oluyor ki beslenmemizde daha az kalori alırken gıdalarda bulunan mikronütrientlerden daha fazla yararlanmamız gerekmektedir (Harland ve Oberleas 1987). Günümüzde yapılan çalışmalar sonucunda hayvansal ve işlenmiş gıdalardan kaçınmamız, bunların yerine doğal lifli (ham kepekli tahıllar) ve bitkisel ürünlerle beslenmemiz önerilmektedir. Hayvan yetiştiriciliğinde de çevreyi daha az kirleten, kaynak ve maliyetleri azaltan yöntemlerin geliştirilmesi için çaba harcanmaktadır. Örneğin; 1972 ve 1992 yıllarında kümes hayvanlarının beslenmesi için balık unu yerine ucuz bitkisel besin kaynağı olan soya küspesi kullanılmaya başlanmıştır. Balık yemleride benzer şekilde geliştirilmektedir (Rumsey 1993).

Bitkisel ürünlerin fazla tüketimindeki sorun, vejetaryen diyetlerinde bulunan antibesinsel bileşiklerin varlığıdır. Sebze ürünlerinde düşük konsantrasyonlarda mevcut

olan ya da hiç bulunmayan bazı özel besinlerin (vitaminler, aminoasitler, mineraller), gıda ve yemlerin besin değerini dengelemek için takviye edilmesi gerekir. Örneğin fitat, proteaz inhibitörleri, tanenler, lektinler, anti-vitaminler, saponinler, fitoöstrojenler, lysinolaminler, oksalatlar, glikosionatlar ve antijenik proteinler gibi bazı antibesinsel faktörlerin inaktive ya da yok edilmesi gerekir (Liener 1981, Francis ve ark 2001). Bunu yapabilmek için çeşitli fiziksel ve kimyasal yollar kullanılmasına rağmen, özellikle çevre kirliliğine yol açmamaları, yan ürünlerin az olması, besin değerini düşürmemesi, kimyasal süreçleri daha ılımlı koşullarda ve ekonomik olarak gerçekleştirmesi sebebi enzimler tercih edilmektedir.

Enzimler, canlı organizmalarda oluşan tüm reaksiyonların ılımlı koşullarda, hızlı şekilde gerçekleşmesini sağlayan ve bu reaksiyonları koordine eden protein ana yapısındaki spesifik biyokatalizatörlerdir. Organik kimyada kullanılan metotlar ile gerçekleştirilmesi çok güç olan ya da gerçekleştirilmesi mümkün olmayan birçok reaksiyonun uygun ve spesifik enzimlerle kolaylıkla gerçekleşmesi, enzimlerin canlı hücrelerden izole edilerek çeşitli amaçlar için kullanılması fikrini doğurmuştur. Enzimler günümüzde hücreden çıkmış ve artık çeşitli bakımlardan günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Bugün ekmek, bira ve peynir üretimi gibi ekonomik sahalarda, temizlik alanları gibi günlük yaşamda ve bir sağlık alanı olan tıpta teşhis ve tedavide enzimler büyük rol oynamaktadır. Ayrıca, tekstil endüstrisinde, kimya endüstrisinde, gıda endüstrisinde, ziraatta, hayvan beslenmesinde, biyolojik savaşta, atık giderme işlemleri gibi birçok kullanım alanları bulunmaktadır. Bu sebepler günümüz araştırmacıların dikkatlerinin bu konu üzerine yoğunlaşmasına yol açmış ve enzim teknolojisi çok hızlı ilerleyen bir konuma gelmiştir (Gümüşel 2002, Van Beilen ve Li 2002).

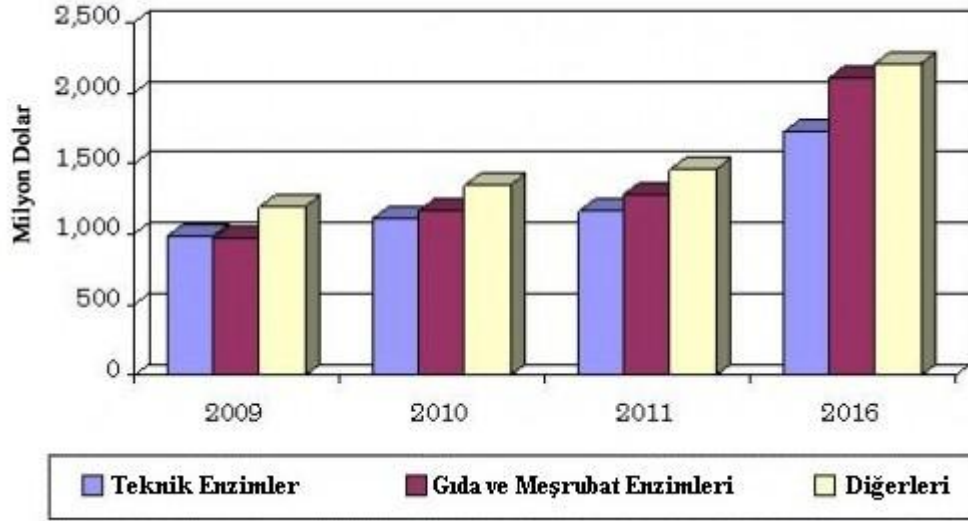
Endüstriyel alanda kullanılan enzimler günümüzde bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan elde edilebilmelerine karşın genellikle mikroorganizmalardan elde edilen enzimler yoğun olarak kullanılmaktadır. Hayvansal kaynaklı enzimler ise pahalı olması ve arz talep gibi faktörlerden olumsuz etkilenmektedir. Bunun aksine bitkisel kaynaklı enzimler hayvansal kaynaklı enzimlere göre nispeten daha kolay elde edilebilse de bunların endüstriyel ham madde olarak kullanılabilmeleri gıda ihtiyaçlarına bağlıdır.

Mikrobiyal enzimler yenilenebilir kaynaklardan üretilebilme ve biyolojik olarak bozulabilme potansiyeline sahiplerdir. Enzimlerin üretiminden elde edilen atıklar, toprak verimini arttırmada gübre olarak kullanılabilir. Çeşitli sektörlerde aletlere insana ve doğaya zarar veren kimyasalların kullanıldığı eski metotların yerini, enzimlerin kullanıldığı biyolojik olarak yıkıma uğratılabilen yeni işlemler almaktadır. Enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların tercih edilmesinin diğer nedenleri ise, oluşturdukları yan ürünlerin az olması, fazla miktarda elde edilebilmesi, aktivitelerinin yüksek ve daha stabil olması, ekonomik ve yüksek oranlarda saf olarak üretilebilmeleridir. Örneğin, mikrobiyal enzimlerin ekstrem sıcaklık ve pH değerlerinde, çok yüksek düzeyde aktivite göstermeleri endüstri açısından oldukça önemlidir (Wiseman, 1987; Horikoshi, 1999, Kirk ve ark. 2002). Günümüzde endüstriyel amaçlı kullanılan enzimlerin yaklaşık % 90'ı mikroorganizmalardan üretilmektedir (Wolfgang 2004).

Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin tüm dünya genelinde yıllık kullanım oranlarına bakıldığında % 25 alkalın proteaz, % 21 diğer proteazlar, % 18 amilaz, % 10 renin, % 3 tripsin, % 3 lipaz, % 10 diğer karbohidrat parçalayan enzimler (selülaz ve ksilenaz gibi) ve % 10 kadar ise analitik ve farmasötik enzimlerdir (Rao ve ark. 1998). Bu enzimlerin endüstriyel kullanım alanlarına göre dağılımına bakıldığında, % 29'unun gıda sektöründe, % 15'inin hayvan yemi sektöründe, % 56'sının ise genel teknik alanlarda kullanıldığı görülmektedir (Kirk ve ark. 2002, Schallmey ve ark. 2004). 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). Enzim üretiminin % 60'ı Avrupa'da, % 15'i ABD'de ve % 15'i Japonya'da olmaktadır (Lowe 2001).

Endüstriyel enzimlerin 2012 yılında dünya piyasasındaki payı tahminen 4,5 milyar ve 2013 yılında 4,8 milyar dolar civarındadır. Bu pazarın 2013-2018 yılları arasında yaklaşık olarak %8.2'lik büyüme oranı ile 7,1 milyar dolara ulaşması beklenmektedir (Anonim 2012b ve 2014). Teknik enzimler 2010 yılında sadece 1 milyar dolar değerinde iken bu sektör 2016 yılında % 8,2 yıllık bileşik büyüme oranı ile 1,7 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir. Teknik enzimlerin en yüksek satışı, deri pazarının

ardından biyoetanol pazarında meydana gelmiştir. Gıda ve içecek enzimleri segmentinin dünya piyasasındaki payı 2011 yılında 1,3 milyar dolarken bu rakam % 10,4 yıllık bileşik büyüme oranı ile 2016 yılında 2,1 milyar dolara yükseleceği öngörülmektedir. Diğer enzimler ise 2011 yılında 1,5 milyar dolarlık pazar payına sahipken 2016 yılında bu payın % 8,7 büyüerek 2,2 milyar dolara yükselmesi beklenmektedir (Şekil 1.1).



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

Yem enzimleri pazarı 2013 yılında 275 milyon dolar değerindeyken, bu pazarın 2017 yılında 1 milyar doların üzerine çıkacağı düşünülmektedir. Mevcut küresel fitaz pazarının ise yılda yaklaşık 350 milyon dolar olduğu tahmin edilmektedir. Domuz için tüm diyetler genelinde fitazın ortalama oranı yaklaşık % 70 olup, tavukçuluk sektöründe bu oran yaklaşık % 90 civarındadır (Anonim 2011).

Dünyadaki tarım alanlarının % 90'ında tahıllar, baklagiller ve yağlı tohumlar yetiştirilmekte olup, bunlar hayvanların beslenmesinde en büyük kaynağı oluşturmaktadırlar. Bu ürünlerin önemli bir içeriği fitik asit (myo-inositol hexakisphosphate)'tir. Tuz formu olan fitat, besinlerdeki protein, kalsiyum, çinko, magnezyum, demir gibi elementler ile suda çözünmez kompleksler oluşturur ve anti besinsel faktör olarak hareket eder. Bundan dolayı protein ve metallerin biyolojik mevcudiyeti azalmaktadır (Hartman 1979, Erdman 1979). Fitat, fosfatın en büyük depo formu olup, tahıl ve baklagillerdeki toplam fosforun % 80'den fazlasını oluşturur (Reddy ve ark. 1989). Fosfor ise, kemik ve iskelet gelişimi ile birlikte başta enerji

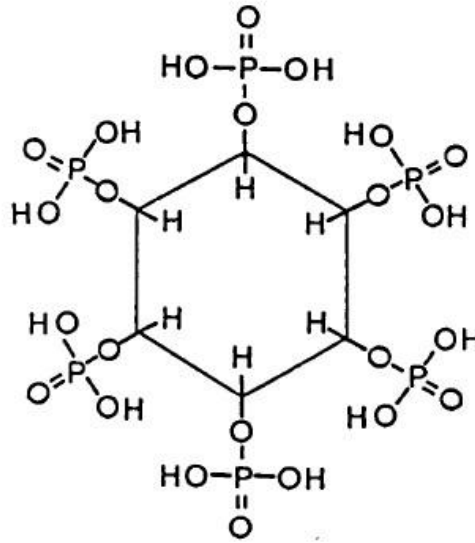
metabolizması olmak üzere birçok enzim sisteminin de yapısına katılır. Oysaki yem hammaddelerindeki fitin fosforundan monogastrik hayvanlar etkin bir şekilde yararlanamadıklarından fosfor gübre ile dışarıya atılmaktadır. Bu durum ise çevreyi özellikle yeraltı ve üstü su kaynaklarını fosfor yönünden tehlikeli bir duruma getirerek çevresel fosfat kirlenmesine yol açmaktadır. Bu iki önemli durumdan dolayı fitatın hidrolizi mutlak suretle gereklidir. Fitatı hidrolizlemek için kimyasal ve fiziksel metotlar kullanılmasına rağmen, bunlar pahalı ve gıdanın besin değerini düşürmektedir. Bunlara alternatif olarak kullanılan fitazlar (*myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase*), fitatı hidrolize eden enzim olup, fitik asit'i inorganik monofosfat, myo-inositol fosfat ve serbest myo-inositol'e hidrolize etmektedir (Kerovuo ve Tynkkynen 2000). Endüstriyel enzimler arasında önemi gittikçe artan fitaz enzimi yem endüstrisinde hayvan beslenmesinde kullanılan önemli bir ekstraselüler enzimdir.

Çevresel açıdan ve diğer yararları nedeniyle kanatlı beslemede fitaz enzimi önemli bir yere sahip olduğundan bu çalışmada, Türkiye topraklarından (30 farklı şehir) izole edilecek olan *Bacillus* sp. suşları denemeye alınacaktır. Enzim verimi arttırmak için üretim ortamında farklı karbon, azot ve metal iyon kaynakları denenecek ve üretim ortamı modifiye edilecektir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Fitik Asitlerin Tarihçesi ve Kimyasal Yapısı

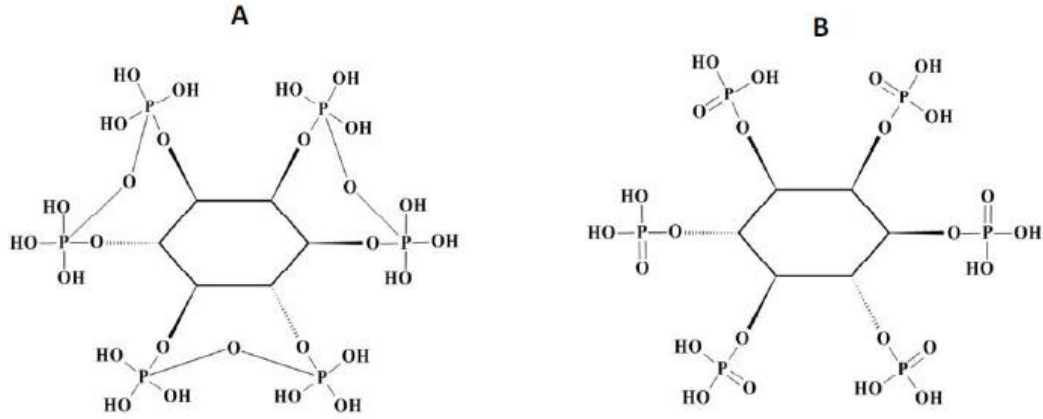
T. Hartig, 1855-1856 yıllarında birçok bitki tohumundan nişastasız küçük tanecikleri izole etmiştir; bu taneciklerin tohumun çimlenmesi ve bitkinin büyümesi için gerekli olan maddelerin kaynağı olarak düşünmüştür (Scott ve Loewus 1986, Kim ve ark. 1999). Pfeffer (1872), T. Hartig tarafından izole edilen bu taneciklerin kalsiyum, magnezyum ve fosfor içerdiğini bulmuştur. Ayrıca partiküller içinde organik maddelerin de bulunduğu gözlemlenmiş ve fosfatın karbohidrat ile birleştiği tahmin edilmiştir. Bu nedenle inosite-fosforik asit (fitin) olarak adlandırılması önerilmiştir; çünkü fosforik asit ile hidroliz edildiğinde inositol açığa çıktığı gözlemlenmiştir (Schulze ve Winterstein, 1896). Posternak (1903) bu bileşik üzerinde fiziksel ve kimyasal olarak yaptığı detaylı çalışmalar sonucunda bileşiğin 'fitin' olarak isimlendirilmesine karşı çıkmıştır. Pirinç kepeğinden elde edilen fitinden inositolün ayrıştırılabilmesi ile Suzuki ve arkadaşları (1907) fitinin yapısını çizebilmişlerdir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Suzuki ve arkadaşları (1907) tarafından önerilen fitin yapısı

Fitik asit'in kimyasal yapısı hakkında çeşitli bilim adamları farklı önerilerde bulunmuş olsa da en çok C. Neuberck ve R.J. Anderson'nın önerileri ön plana çıkmış ve tartışma konusu olmuştur. C. Neuberck üç adet su molekülünün fosforlar arasında güçlü bağlar oluşturduğunu önerirken R.J. Anderson fosforlar arasında bağ bulunmadığını önermiştir.

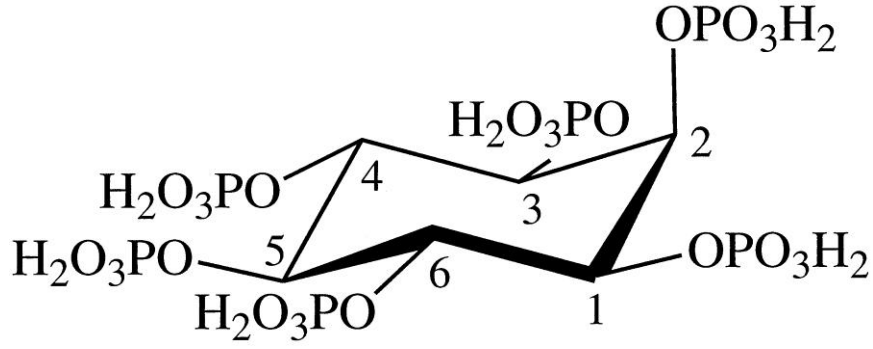
(Lehmann ve ark. 2000, Rodriguez ve ark. 2000, Mullaney ve ark. 2002) (Şekil.2.2). Fitik asidin konformasyonel yapısı X-ışını kristalografisi ve nükleer manyetik rezonans spektrofotometri (^{31}P -NMR) gibi modern analiz yöntemleriyle günümüzde tam olarak belirlenmiştir (Reddy 1982) ve sonuçlar R.J. Anderson'un önerisinin doğru olduğunu desteklemiştir (Purva 2004).



Şekil 2.2. (A) Neuberg (1908) ve (B) Anderson (1914) tarafından önerilen fitat (fitik asit) yapısı (Tran 2010)

Fitik asidin konformasyonel yapısı X-ışını (Truter 1970, Blank ve ark. 1971) ve ^{31}P -NMR (Johnson ve Tate 1969, Isbrandt 1980) ile incelenmiştir. Johnson ve Tate (1969) C-2 pozisyonundaki fosfatın ekvatorial konumda, diğer fosfatların (C-1, C-3, C-4, C-5, C-6) ise ekvatorial konumda olduğunu öne sürmüştür. Bunun aksine Blank ve arkadaşları (1971) C-1, C-3, C-4, C-5 ve C-6 konumundaki fosfatların ekvatorial pozisyonda, C-2 konumundaki fosforun ise ekvatorial pozisyonda olduğunu ileri sürmüştür. Isbrandt ve Oertel ^{13}C -NMR, ^{31}P -NMR ve Raman spektroskopik analizleri kullanılarak myo-insitol heksakisfosfat'ın sulu çözeltilerinin pH ya bağlı olarak iki formda da bulunabileceğini kanıtlamıştır. Asidik çözeltilerde 1-ekvatorial/5-ekvatorial yapı oluşurken güçlü alkali durumlarda 5-ekvatorial/1-ekvatorial durum olduğu sonucuna varılmıştır (Isbrandt ve Oertel 1980).

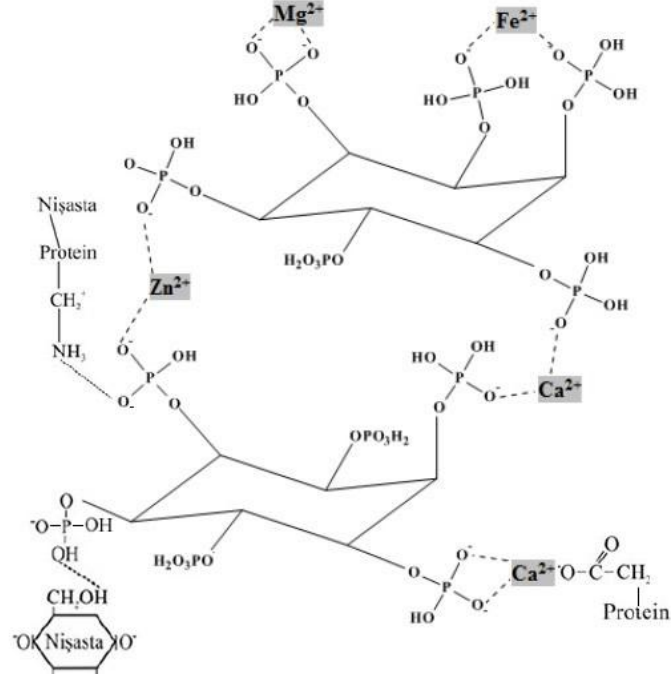
Fitik asit, myoinositol halkası ve buna bağlı inorganik fosfattan ibaret serbest bir ester asididir (Wyss 1999), (Şekil 2.3). Fitik asit günümüzde Myo-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakis fosfat olarak isimlendirilmiştir (IUPAC-IUB 1977). Moleküler formülü, $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$ ve moleküler ağırlığı $660.04 \text{ g mol}^{-1}$ 'dir (Kumar ve ark 2010).



Şekil 2.3. Fitik asit (*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexafosfat) (Wyss 1999)

Fitik asit geniş bir pH aralığında farklı negatif yüklere sahiptir ve çeşitli ayrışma derecelerinde on iki iyonize hidrojen atomu bulunmaktadır (Reddy 1982, 1989). Costello ve arkadaşları (1976) ^{31}P -NMR ve pH titrasyon metotlarını kullanarak fitik asit için pKa değerini tespit etmişlerdir. Güçlü asit (pKa 1.1 ile 2.1) aralığında altı grup, zayıf asit aralığında (pKa 5.70) bir grup, pKa 6.80 ile 7.60 arasında iki grup, çok zayıf asitlikte ise (pKa 10.0 ile 12.0) üç grubun ayrışma gösterdiğini belirlemişlerdir (Costello ve ark. 1976). Reddy ve arkadaşlarının (1982, 1989) yaptığı çalışmada bu sonuçları destekler niteliktedir; pKa 1.84 iken altı (güçlü asidik ortam), pKa 6.3 iken iki (zayıf asidik ortam), pKa 9.7 iken dört (çok zayıf asidik ortam) hidrojen atomu ayrışma göstermektedir.

Bu sonuçlar fitik asitlerin multivalent katyonlar ve pozitif yüklü proteinleri kompleks hale getirmek için güçlü bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Cheryan 1980, Reddy 1982, 1989, Thompson 1986). Yani fitat molekülü yapısı nedeniyle pH'nın bazik veya nötr olduğu ortamlarda ve sindirim kanalında güçlü bir şekilde negatif yük ile yüklüdür (Costello ve ark 1976). Bu nedenle negatif yüklü fitik asit birçok pozitif yüklü metal iyonları, peptidler, proteinler ve nişasta ile kompleks oluşturabilmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Fitik asitteki fosfor grupları ile nişasta, protein ve metal iyonu komplekslerinin farklı bağlanma yolları (Kornegay 2001 ve Tran 2010 'dan değiştirilerek alınmıştır)

2.2. Fitik Asitlerin Bitkilerdeki Dağılımı ve Fizyolojik Fonksiyonları

Fitat ilk olarak tohumlarda bulunmuştur (Hartig 1855 ve 1856, Ravindran ve ark. 1995) ancak tohum içerisindeki konumu bitkilere göre farklıdır. Örneğin mısırdaki fitatın %90'ı germ tabakasında bulunurken buğday ve pirinçte çoğunluğu alöron tabakası ve dış kepekte bulunmaktadır (O'Dell ve ark. 1972, 1976). Yağlı tohum ve baklagillerde ise proteinle ilişkili olarak çekirdek boyunca dağılırlar. Buna karşın soya fasulyesi tohumunda özel olarak yoğunlaştığı bir bölge yoktur (Ravindran ve ark. 1995). Fitat ayrıca kök ve yumrulara (Rose 1912, Harland 1987, Ravindran ve ark. 1994), meyve ve sebzelerde, kabuklu yemişlerde (Harland 1987, Ravindran ve ark. 1994), çeşitli bitkilerin polenlerinde bulunmaktadır (Jackson ve ark. 1982, Scott ve ark. 1986, Baldi ve ark. 1987). Bazı bitkisel besinler (susam, kabak, keten, keten tohumu gibi) kuru ağırlık olarak % 3,7-4,7 arasında fitat içerirken (Lott ve ark. 2002) diğer bitkisel besinler % 1-3 arasında fitat içermektedir (Cheryan 1980).

Fitat molekülü % 28,2 fosfor (P) içerir (Angel ve ark. 2002). Bu fosfor pirinç (Ogawa ve ark. 1975, Tanaka ve ark. 1981), buğday (Tanaka ve ark. 1974), bakla (*Vicia faba*)

(O'Dell ve ark. 1972, Lott ve ark. 1978) ve susam tohumunda (O'Dell ve ark. 1972) potasyum-magnezyum tuzları şeklinde bulunurken soya fasulyesi (*Glycine max*) (Lott ve ark. 1978, Pratley ve ark. 1982) ve fasulyede (*Phaseolus vulgaris*) (Reddy ve ark. 1987) kalsiyum-magnezyum-potasyum tuzları olarak bulunur. Fitat tohum ve tanelerin olgunlaşma dönemlerinde aynı protein, lipit ve nişastaların depolandığı gibi tohumda depolanmaktadır (Ogawa ve ark. 1979, Raboy ve ark. 1987, Honke ve ark. 1998). Cosgrove ve Irving (1980) fitatın tohumdaki rollerini şu şekilde sıralamışlardır; 1) fosfor deposu, 2) enerji kaynağı, 3) dormansiyi uyarır veya inhibe eder, 4) hücrel süreçlerin kontrolü için gerekli olan divalent katyonları tutar ve germinasyon esnasında serbest bırakır, 5) tohumdaki fosfor seviyesini düzenler. Soya fasulyesi tohumundaki çinkoyu kullanılmaz hale getirerek aflatoksin oluşumunu engellemiştir; bu nedenle antifungal rolü olduğu ileri sürülmüştür (Gupta ve ark. 1975).

Fitat kuş eritrositlerinde, tatlı su balıkları ve kaplumbağalarında (Rapoport 1940, Rapoport ve ark. 1941, Isaacks ve ark. 1977), organik topraklarda da bulunmuştur (Dyer ve ark. 1940, Caldwell ve ark. 1958).

Düşük derecede fosforlanmış inositoller (IP2, IP3, IP4, IP5) ve fitat (IP6) tüm bitki ve hayvan hücrelerinde hücrel sinyal iletiminde ve fosfat transfer sistemlerinde rol aldığı kabul edilmiştir (Glennon ve ark. 1993, Menniti ve ark. 1993, Stephens ve ark. 1993). Özellikle inositol trifosfat'ın sinyal iletiminde, bitki ve hayvan hücrelerinde hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde rolü olduğu belirlenmiştir (Wodzinski ve ark. 1996). İnositol (1,4,5)-trifosfat ve inositol (1,3,4,5)-tetrafosfatın karşıt uyarılmasında bir artış meydana gelmesiyle stoplazmada serbest hale geçen Ca^{2+} iyonlarında artış olması arasında sıkı bir ilişki bulunduğu belirlenmiştir. Bunun sonucunda da çeşitli fizyolojik olaylar meydana geldiği gözlenmiştir (Billington 1993, Ashcroft 1997). Bitkiler IP6'ı normal olarak sentezleyebilmektedirler. İnsanlarda ise fitat sentezinin glukoz-6-fosfat döngüsünde oluştuğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Çeşitli memeli dokularında (testis, meme bezleri, beyin, karaciğer ve böbrek gibi) günde yaklaşık 4 gr fitat sentezi olabileceği açıklanmıştır (Harland ve ark. 1995, Reddy ve ark. 2002).

2.3. Fitik Asitlerin Anti Besinsel Etkisi

Fitik asit güçlü bir anti besinsel maddedir (Pallauf ve Rimbach,1996). Bu etki fitik asit'in moleküler yapısından kaynaklanmaktadır. Fitik asit'in 6 fosfat grubu tamamı

çözünebilen on iki pozitif yüklü iyon taşımaktadırlar. Bu nedenle fitik asitler bir, iki, üç değerlikli ve bunların karışımından oluşan katyonlara (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} vb.) bağlanarak çözünmez kompleksler oluştururlar (Richardson ve ark. 1985, Reddy ve ark. 1989). Oluşan bu kompleksler bağırsaklardan bu minerallerin emilimine engel olur. Bu durumda gerekli minerallerin biyolojik olarak kullanılabilirliğini azaltmaktadır (Davies, 1982). Rimbach ve Pallauf (1992) sıçanların besinlerine fitik asit ilavesinin canlı ağırlıklarında olumsuz etki yaptığını ve Zn^{2+} emilimini azalttığını göstermişlerdir.

Fitatlar aynı zamanda proteinler ve nişasta ile de bileşikler oluşturabilmektedir. Fitik asit geniş bir pH aralığında proteinlerle etkileşime girerek fitat-protein kompleksleri oluştururlar. Oluşan bu kompleks neticesinde protein ve amino asitlerin sindirilebilirliklerini azaltırlar. Fitik asit; tripsin, kemotripsin, pepsin, α -amilaz ve β -galaktosidaz gibi çeşitli enzimlerle de etkileşime girebilmektedir; bunun sonucunda sindirim enzimlerinin aktivitelerinde de önemli kayıplar meydana getirirler (Singh ve Krikorian 1982, Deshpande ve Cheryan 1984, Inagawa ve ark. 1987, Midilli ve ark. 2003). Nişasta ise fitat molekülüne hidrojen bağları ile bağlanmaktadır (Puminn 2003). Fitat ile oluşan bu bileşikler protein ve nişasta sindirimi üzerine olumsuz etki yapmaktadır (Sathe ve Reddy 2002).

Fitin fosforunun yeterince değerlendirilememesi önemli miktarda fosforun dışkı ile atılmasına yol açmaktadır. Fitin fosforunun değerlendirilebilmesi için fitik asit molekülünün hidrolize olması gerekmektedir. Fitin fosforunun hidrolizi; ıslatma, çimlendirme, bitkisel endojen fitaz enziminin zengin gıdaları kullanma, depolama, pişirme ve otoklavlama gibi yöntemlerle gerçekleşmektedir (Pekşen ve Artık, 2005). Ayrıca, dış kabuğun soyulması için öğütme işlemi yapılması ve fermantasyon işlemiyle maya ve laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan fitaz enzimi de yemdeki fitat miktarını düşürmektedir. (Midilli ve ark. 2003). Bu sayede sindirilemeden atılan fosfor miktarı azaltmakta, fitik asit'in enerji ve besin maddesi sindirimi üzerindeki olumsuz etkileri ortadan kalkmaktadır (Ergün ve ark. 2002).

Başlangıçta fitik asit mide-bağırsak sistemindeki çeşitli maddeleri bağlayıcı ve yararışılığını azaltıcı özelliklerinden dolayı besin değerini azaltan bileşikler olarak düşünülmekteydi, fakat son zamanlarda yayınlanan veriler kan serumundaki kolesterol ve trigliserit seviyesini düşürmesi ve fitatların bağlayıcı özelliklerinin demir kaynaklı

bağırsak kanserine karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermiştir. Fitatlar lipit peroksidasyonunu azaltma gibi faydaları ile doğal antioksidan özelliği de göstermektedir (Zhou ve Erdman, 1995). Ayrıca yemeklik tane baklagiller önemli derecede kalsiyum, bakır, demir, magnezyum, fosfor, potasyum ve çinko kaynağıdır (Geil ve Anderson, 1994). Bu minerallerin içeriği ve biyolojik olarak yararlılığı büyük oranda bunların işleme (pişirme) sürecinin derecesine bağlılık göstermekte olup, emilimleri üründe bulunan fitat seviyesine bağlı olarak etkilenmektedir (Liener, 1994).

2.4. Fitik Asitlerin Çevresel Etkileri

Bitkilerin ihtiyacı olan inorganik fosforların bitkilerin gelişimi ve olgunlaşması sırasında tohumlarında, köklerinde ve diğer dokularında fitat olarak biriktiği bilinmektedir. Bitkisel fosfor kaynaklarındaki kullanılmayan fitat fosforu zaman içerisinde toprakta birikmektedir. Suda ve toprakta bulunan mikroorganizmalar biriken bu fitatları hidrolitik enzimleri yardımıyla hidrolize etmektedirler. Entansif olarak hayvan yetiştiriciliği yapılan alanlarda aşırı derecede biriken fosfor deniz ve göllere akarak buralarda ötrefikasyona neden olabilmektedir. Alglerin çok fazla çoğalması sucul bitkilerin azalmasına ve bunun sonucunda da sudaki oksijen düzeyinin düşmesine sebep olmaktadır. Ayrıca burada yaşayan canlılarda biriken fosfor insanlarda nerotoksik etki oluşturmaktadır (Lei ve Porres 2003). Hollanda'da azot(N), fosfor (P) ve potasyum (K) kirliliklerinin oluşmasının temel nedeninin (en az %80) hayvancılık olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle Hollanda'da hayvan dışkısının gübre olarak kullanılmasına yasal olarak sınırlamalar getirilmiştir (De Boer ve ark 1997). Birçok Avrupa ülkesinde ise fitaz enzimi kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır ve hatta bazı Avrupa ülkelerinde bu zorunlu hale getirilmiştir (Kutlu 2000).

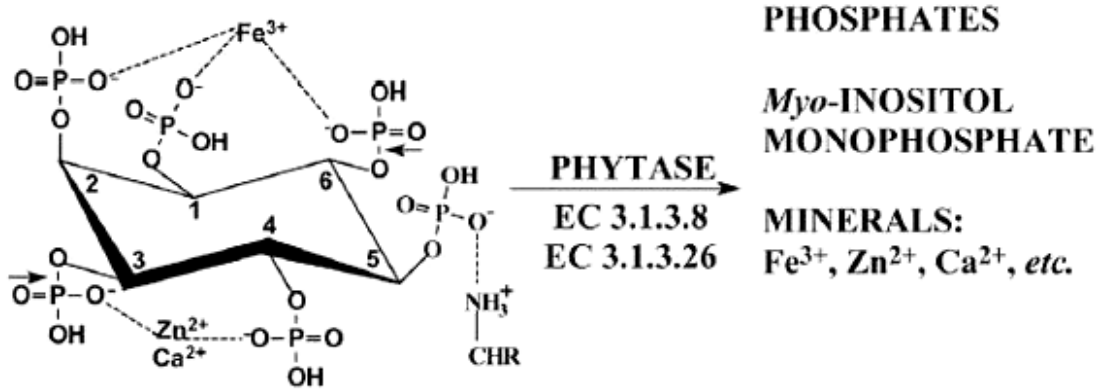
Sindirilmeyen fitat dışkıdaki birincil P kaynağıdır. Yapılan çalışmalar, rasyonlarda bulunan fitat düzeyinin azaltılmasının hayvansal atıklar yolu ile toprak ve su kaynaklarındaki P birikimini azaltmada etkili olabileceğini göstermektedir (Maenz 2001). Bosch ve ark. (1998) dışkıdaki P düzeyinin azaltılması ve tarımsal ürünlerin gereksinim duyduğu P düzeyinde tarım alanlarında hayvansal gübre uygulanmasının ürün maliyetlerini düşürdüğünü belirtmiştir. Fitazın gübreyle atılan fosfor miktarında meydana getirmiş olduğu azalma %20 ile 50 arasında değişmektedir (Kornegay 2001). Örneğin domuz diyetleri, aktivitesi 500 ünite olan fitaz enzimi ile desteklendiğinde

domuzların dışkısı ile atılan fitat miktarında % 21,5 azalma gerçekleştiği belirtilmiştir (Harper ve ark. 1997).

Fitik asitlerin antibesinsel ve çevresel etkilerini ortadan kaldırmak için son yıllarda fitaz enzimi kullanılmaktadır.

2.5. Fitaz Enzimi (*Myo*-inositol-hegzafosfat fosfohidrolaz) ve Genel Özellikleri

Fitaz (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase), fitatı (fitik asiti, *myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis dihidrojen fosfat), inorganik monofosfat, *myo*-inositol fosfat ve serbest *myo*-inositol'e hidrolize eden enzimdir (Kerovuo 2000) (Şekil 2.5). Fitaz aktivitesin ilk olarak Suzuki ve ark. (1907) tarafından buğday kepeğinde, McCollum ve Hart (1908) tarafından buzağuların kanında bulunduğu bildirilmiştir. Daha sonra bitki, maya, bakteri ve funguslarda varlığı belirlenmiştir. Ayrıca insan ve hayvanlarda ince bağırsak mukozası ve kalın bağırsaklarda bulunan mikroflora tarafından endojen olarak üretildiği tespit edilmiştir. Fakat insan ve hayvanlarda bulunan endojen fitazın aktivitesinin bitki ve mikrobiyal fitaz aktivitesine göre daha önemsiz olduğu saptanmıştır (Weremko ve ark. 1997, Kumar ve ark. 2010).



Şekil 2.5. Fitatın, fitaz enzimi ile inositole hidrolizi (Yu ve ark. 2012)

Fitazlar, genellikle 40-100 kDa moleküler ağırlığa sahip olan monomerik protein olarak değerlendirilmektedir. Geniş substrat spesifikliğı göstermektedir. Fitazın kristal yapısı, 2.5 Å çözünürlükte tespit edilmiştir (Pandey ve ark. 2001).

Bilinen fitazların çoğu yaygın olarak 45-80 °C arasında optimum aktivite gösterir. En yüksek optimum sıcaklık *Schwanniomyces castellii*'den elde edilen fitazda (77 °C)

gözlenmiştir (Segueilha ve ark. 1992). *Bacillus* sp. MD2 suşunda 73 °C ve *Bacillus amyloliquefaciens* DS11 suşunda ise 70 °C sıcaklıkta optimum fitaz aktivitesi görülmektedir (Kim ve ark. 1998, Oh ve ark. 2001). Kümes hayvanları ve domuzların mide sıcaklıkları 37-40 °C civarındadır, balıklarda ise daha da düşüktür (Lei ve Porres 2003). Bu nedende yüksek derecelerde optimum aktiviteye sahip fitaz enzimlerinin performansı bu hayvanlarda düşük olacaktır. Fitaz aktivitesinin termostabilitesi optimum sıcaklıkla ilişkilidir. Çoğu fitaz ve *S. Castellii* fitazı 40-65 °C arasında inaktive olmaktadır (Oh ve ark. 2004). *A. fumigatus*'dan elde edilen fitaz 10 dakika süresince 100 °C sıcaklığa maruz bırakıldığında aktivitesinin %10 unu kaybetmiş olmasına rağmen (Pasamontes ve ark. 1997) 60 °C'de fitaz enziminin inaktive olduğu gözlenmiştir (Ullah ve ark. 2000). Ticari yemler yüksek sıcaklıklarda (60-80 °C) pelet haline getirildiğinden *Bacillus amyloliquefaciens* DS11, *Bacillus* sp. MD2 ve *A. fumigatus* gibi β-pervane fitazı üretebilen bakteriler önemli avantajlara sahiptir (Lei ve Porres 2003).

Fitaz enziminin optimum pH'sı 2.2 ile 8.0 arasında değişmektedir. Birçok mikrobiyal fitazın, özellikle fungal orijinli olanların optimum pH'sı 4.5 ile 5.6 arasındadır. Buna karşın *A. fumigatus* fitazı geniş pH aralığında (4.0-7.3), maksimum aktivitesini % 80 düzeyinde koruyabilmektedir. Bazı bakteriyel fitazların, özellikle *Bacillus* cinslerinin optimum pH aralığı 6.5 ile 7.5 arasındadır. Bitki tohumundaki fitazların pH'sı 4.0 ile 7.5 arasında olmasına rağmen optimum pH genellikle 4.0 ile 5.6 arasındadır. Tane tohumlularda ve zambak poleninde olmak üzere optimum pH sı 8.0 civarında olan iki adet bitkisel fitaz tanımlanmıştır (Hara ve ark. 1985, Dvorakova 1998).

Klebsiella aerogenes haricindeki bakterilerden elde edilen fitazların molekül ağırlıkları genellikle 35-50 kDa arasındadır. *Klebsiella aerogenes*'in iki farklı formda fitaz enzimine sahip olduğu belirtilmiştir; bunlardan birisi 700 kDa moleküler ağırlığa sahipken diğerinin moleküler ağırlığının 10-13 kDa arasında olduğu belirtilmiştir (Tambe ve ark. 1994). Ökaryotik organizma fitazları ise glikozillenmiş durumda olduklarından daha yüksek (fungal fitazlar 85-150 kDa arasında, maya fitazları 500 kDa civarında, bitki ve hayvan dokusu fitazları 50-150 kDa arasında) moleküler ağırlığa sahiptir.

Etkili bir fitazın, sindirim sisteminde proteinazlar tarafından hidrolitik parçalanmalara karşı güçlü dirence sahip olması gerekmektedir. Fungal ve bakteriyel fitazlar, pepsin ve tripsine farklı hassasiyet göstermektedirler (Kerovuo ve ark, 1998; Rodriguez ve ark, 1999). Bakteriyel fitazlar fungal fitazlara nazaran proteolitik parçalanmalara karşı daha fazla direnç göstermektedirler (Igbasan ve ark, 2000).

Shieh ve ark. (1969) fungusların üreme ortamındaki inorganik fosfat konsantrasyonlarının, fungal ekstraselüler fitaz üretimi için uyarıcı yönde etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir. Bunun aksine *B. subtilis* fitazının üretiminin ortamdaki fitat tarafından indüklendiği belirtilmiştir (Powar ve Jagannathan 1982). *Klebsiella* fitazı' da fitat tarafından indüklenmektedir (Shah ve Parekh 1990, Tambe ve ark. 1994 Greiner ve ark. 1997). Bu durum *E. coli*'de farklılık göstermektedir; *E. coli*'de fitaz enzimi üretiminin uyarılmasının fosfat açlığına ve anaerobiyozise bağlı olduğu gözlenmiştir (Greiner ve ark. 1993 ve 1997).

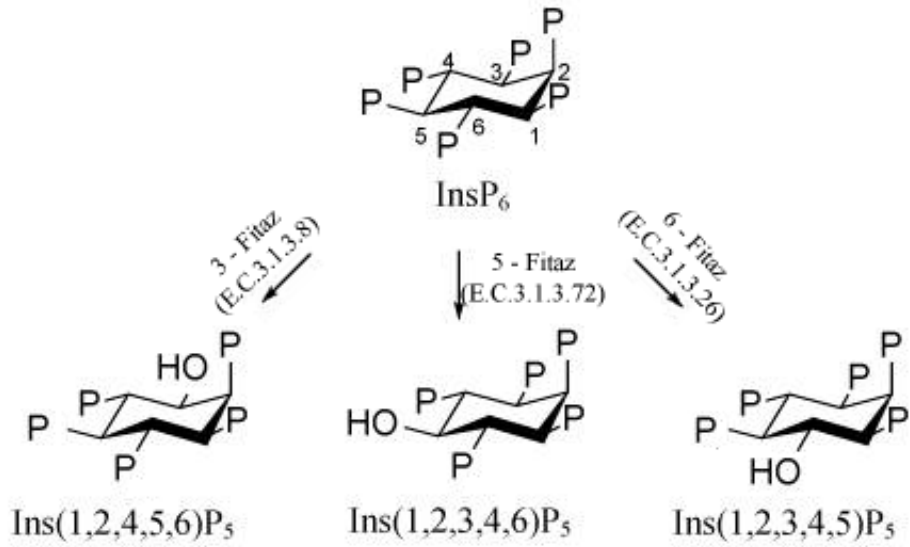
Fitaz enzimi Shieh ve Ware (1968) tarafından, fitatın hidrolizi sonucu serbest kalan inorganik fosfattan dolayı, bitki orijinli hayvan yemlerinin besinsel değerini arttırmak için, hayvan yemi katkısı olarak önerilmiştir (Mitchell ve ark. 1997).

İlk ticari fitaz enzimi olan Natuphos, *Aspergillus niger*'den izole edilmiş, 10 N-glikolizasyon bölgeleri ile 80 kDa moleküler ağırlığa sahip ve 1.4 kb DNA fragmenti tarafından kodlanmış *Aspergillus niger* PhyA'dır (Van Hartingsveldt ve ark. 1993, Han ve Lei 1999) ve 1991'de piyasaya çıkmıştır (Cromwell ve ark. 1995a, b, Yi ve ark. 1996, O'Quinn ve ark. 1997). Finase fitazı mısır-soya içerikli domuz diyetlerine eklenmiş, kullanılamaz durumdaki fosfatın yaklaşık üçte birini kullanılabilir duruma dönüştürmüştür (Cromwell ve ark. 1993). Benzer şekilde Allzyme Phytase ve Natuphos fitazları domuz ve kanatlı diyetlerine eklenmiş ve fitatın bu canlılardaki biyoyararışlılığının arttığı gözlenmiştir. Domuz ve kanatlılar üzerinde yapılan birçok çalışma sonucunda mikrobiyal fitazların, zengin fitat içeren diyetlerde kullanımının, besinlere inorganik fosfor ilavesinin yerine kullanılabileceğini göstermiştir. Hollanda da besinlere ilave edilen *A. niger* fitazı sayesinde fosfat kirliliğinin %30-40 civarında azaltıldığı bildirilmiştir (Jongbloed ve ark. 1992).

Günümüzde ticari olarak üretimde toprak fungusu olan *Aspergillus* üzerinde durulmaktadır. Ancak 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 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. 1998) gibi bakterilerde fitaz aktivitesi varlığı saptanmıştır. *Bacillus* suşları patojen olmamaları ve sentezledikleri fitazı hücre dışına salgılama yeteneğinde olduklarından endüstride önemli bir yere sahiptir. (Polaina ve MacCabe 2007).

2.6. Fitazların Sınıflandırılması

Fitaz iki temele dayandırılarak kategorize edilmiştir. Bunlardan birincisi; fitat molekülünün hidrolizinin başlangıç bölgesine göre ikincisi ise; pH aktivitesine göre yapılmıştır. Fitatı parçalayan enzimler Enzim Sınıflandırmasında Hidrolazlar grubunda olup; International Union of Pure and Applied Chemistry ve International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUPAC-IUBMB)'e göre inositol karbon halkasında, farklı pozisyonlarda fitik asidin defosforilasyonunun başladığı bölgeye ve alt inositol fosfatların farklı izomerlerini üretmelerine bağlı olarak 3 ana gruba ayrılmaktadır. Mikrobiyal fitazlar (E.C. 3.1.3.8), 3-fitaz olarak adlandırılır ve özellikle mantar kökenli olanlar, inositol halkasındaki C1 veya C3 karbondaki fosfat grubunu parçalamaktadır. Bitkisel fitazlar (E.C. 3.1.3.26), 6-fitaz olarak adlandırılır ve tercihen C6 karbondaki etki göstermektedir (Lei ve Porres 2003, Selle ve Ravindran, 2007). Bu genel bir kural değildir. Son zamanlarda *Aspergillus niger*'den izole edilen fitaz, 3-fitaz aktivitesi gösterirken, *Peniophora lycii* ve *E.coli*'nin 6-fitaz aktivitesine, soya fasulyesinin de 3-fitaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Sandberg ve Andlid, 2002; Selle ve ark, 2007). Zambak poleninden elde edilen fitazlar ise (E.C.3.1.3.72), 5-fitaz olarak adlandırılır ve inositol halkasındaki C5 karbondaki etki etmektedir (Bohn ve ark, 2008) (Şekil 2.6). Fitazlar optimum pH değerlerine göre 2 ana gruba ayrılmaktadır. Histidin asit fosfatlar; pH 5.0 değeri civarında optimum aktivite gösterirken, alkalik fitazlar; pH 8.0'e yakın değerlerde optimum aktivite göstermektedir (Baruah ve ark, 2007).

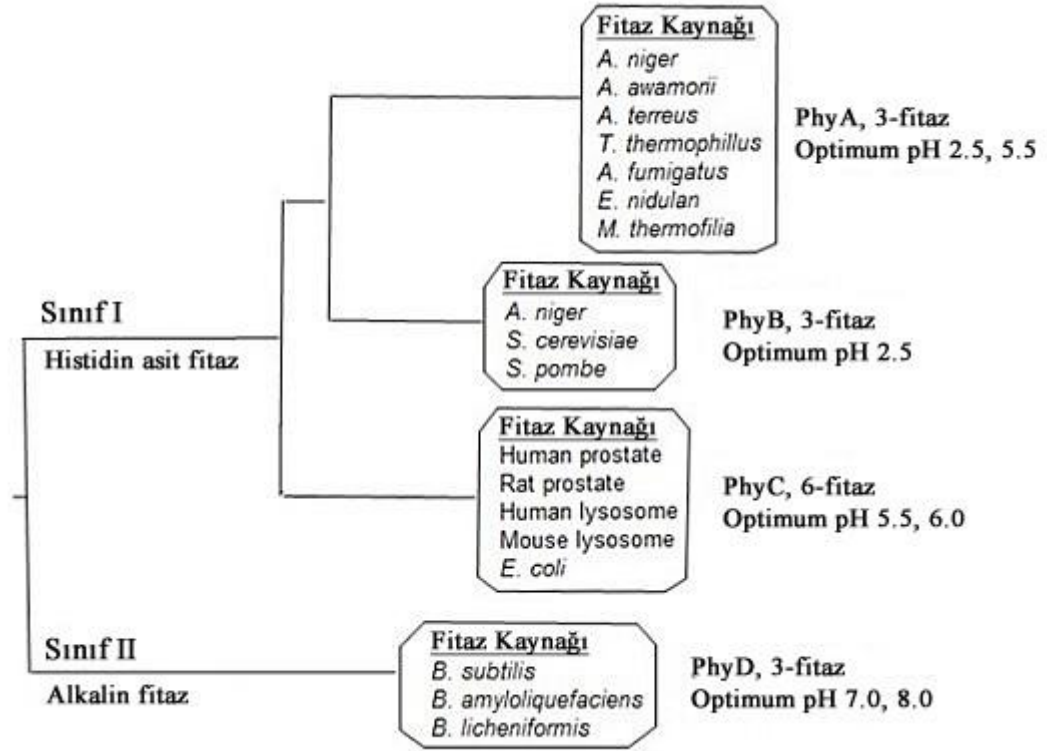


Şekil 2.6. Fitik asit defosforilasyonunun başladığı konuma göre fitazların çeşitleri (Dvorakova 1998 ve Bohn ve ark. 2008 'dan değiştirilerek alınmıştır)

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).

Fitazlar histidin asit fosfataz ailesine ait olup, fosforil transfer reaksiyonunda, fosfohistidin ara ürünlerini kullanan fosfotazların alt sınıfıdır (Van Etten 1982, Pasamontes ve ark. 1997, Lei ve ark. 2007).

Fitazlar aktif merkezlerinin geometrisi ve katalitik mekanizmalarına göre histidin asit fosfataz (histidine acid phosphatase, HAP) fitazı, β -pervane fitazı (β -propeller phytase, BPP), mor asit fosfataz (purple acid phosphatase, PAP) fitazı olarak sınıflandırılmıştır. Kataliz için optimum pH değerine göre de, fitazlar asit, nötr ya da alkalın gibi isimlendirilebilir (Mullaney ve Ullah 2003). Histidin asit fitazı I. sınıfta yer alırken, alkalın fitaz II. sınıfta yer almaktadır. Oh ve arkadaşları (2004) aminoasit sekansları ve biyokimyasal özelliklerine göre 2 büyük grup içerisine almışlardır (HAP'lar ve alkalın fitazlar). Bunları da 4 alt gruba ayırmışlardır (Fitaz A, B, C, D) (Şekil 2.7). Ancak bitki fitazları bu sınıflandırma içine alınmamaktadır. *Bacillus* sp. fitazları alkalın β -pervane fitazı (BPP) içinde yer almaktadır (Kerovuo ve ark. 1998, Kim ve ark. 1998).



Şekil 2.7. Biyokimyasal özellikleri ve sekans analizlerine göre fitazların sınıflandırılması (Oh ve ark. 2004)

2.7. Fitaz Enziminin Kaynakları

2.7.1. Bitkisel fitazlar

Bitkilerde yaygın olarak görülmektedir. Fitaz tritikale, buğday, mısır, arpa, pirinç, fasulye, maş fasulyesi, cüce fasulye ve küçük beyaz kaliforniya fasulyesi gibi hububat bakliyat ve yağlı tohumlardan izole edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Fitaz aktivitesinin ayrıca beyaz hardal, patates, turp, marul, ıspanak, avokado, taze soğan yaprakları, çim ve zambak gibi bitkilerde de olduğu belirlenmiştir (Dvorakova 1998, Viveros ve ark. 2000, Phillipy ve Wyatt 2001). Buğday, kavuzlu buğday, çavdar, arpa, tritikale gibi tahıl taneleri 5.000 unit/kg'den daha fazla aktiviteye ulaşabilen yüksek seviyede fitaz aktivitesi gösterirler. Bu tahılların ve ürünlerinin bitkisel fitaz kaynağı olarak kullanımı hayvan beslenme çalışmalarında denenmiştir (Han ve ark. 1997).

Bitkilerden elde edilen fitazların optimum pH'sı genellikle 4.5-6.0 ve optimum sıcaklığı 38-55 °C aralığında olan histidin asit fosfatazlardır. Bunun yanında bitki fitazlarının kinetik özelliklerinde büyük farklılıklar bulunmaktadır (K_m 30-300 μM ; kcat 43-704 s^{-1})

ve spesifik aktivite 43-636 U/mg protein). Moleküler ağırlıkları 47-76 kDa'dur (Lei ve ark. 2007). 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 etkisizleşebilmektedir (Phillippy 1999). Bitkisel kaynaklı fitazların çeşitliliği ve stabilitesinin düşük olması rasyonlarda güvenilir enzim kaynakları olarak kullanılmasını sınırlandırmaktadır (Angel ve ark. 2002).

Histidin asit fosfotaz ailesindeki bitkisel fitazlar, genellikle 6-fitaz olarak kabul edilir. Ancak, yapılan çalışmalarda bitkisel fitazların bazılarının (Lupin LP11 ve LP12) ortofosfatı hidrolizlemeye, inositol halkasının D-3 pozisyonundan başladığı belirlenmiştir (Greiner ve ark. 2002). Bazı bitkisel fitazların alkalın fosfataz ya da purple asit fosfataz olduğu saptanmıştır.

Zambak poleni fitazının optimum pH'sının 8.0 ve sıcaklığının ise, 55 °C olduğu bildirilmiştir (Jog ve ark. 2005). Enzimin kalsiyum tarafından aktive olduğu, EDTA tarafından inhibisyona uğradığı ve son ürün olarak *D-myo-Ins-1,2,3-trifosfat* açığa çıktığı ve dar bir substrat spesifikliğine sahip olduğu bildirilmiştir.

Hegeman (2001) çimlenmiş soya fasulyesinden izole edilen fitaz geninin, histidin asit fosfataza hiçbir benzerlik göstermediğini, fakat iki çekirdekli Fe(III)-Fe(II) merkezini içermesi ile purple asit fosfotazlara yüksek oranda benzerlik gösterdiğini bildirmiştir. Enzimin optimum pH'sının 4.5-5.0 ve optimum sıcaklığının 58 °C olduğu belirlenmiştir.

Laboure ve ark. (1993) çimlenmiş mısır tohumlarından fitaz enzimini saflaştırarak izole etmişler ve bu enzimin cDNA'sını kodlamışlar (Maugenest ve ark. 1997). Bu cDNA mısırın genomik kütüphanesini taramak için kullanılmış ve iki ayrı gen sekanslanarak izole edilmiştir.

Optimum pH'sı asidik olan bitki fitazlarının yanı sıra alkali ortamda optimum aktivite gösteren bitki fitazları da bulunmaktadır. Bu nedenle bitki fitazları 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.

2.7.2. Hayvansal fitazlar

Fitaz aktivitesi çeşitli hayvan türlerinin dokularında tespit edilmiştir. Ayrıca fitaz enziminin monogastrik hayvanlarda olduğu da bildirilmiştir (Bitar ve Reinhold 1972, Copper ve Gowing 1983, Yang ve ark. 1991a, Chi ve ark, 1999). Ancak monogastriklerdeki bağırsak fitazları gıdalardaki fitat sindiriminde rol oynamamaktadır (Williams ve Taylor, 1985). Hayvansal kaynaklı fitazların hiçbirinin moleküler karakterizasyonu tamamlanmamıştır. Bu enzimlerin genelinde fitat için K_m değeri, 0.03-2.6 mM aralığındadır. Hayvansal fitazlar nötral ve alkali aralıkta optimum pH göstermesine rağmen, kümes hayvanlarının bağırsak epitel hücrelerinde yapılan bir çalışmada, optimum pH'nın 5.5-6.0 olduğu gösterilmiştir (Ellestad ve ark. 2002).

Craxton ve ark. (1997) fitaz aktivitesi olan sıçanların karaciğerinden inositol polifosfat fosfatazı (MIPP) klonlayarak eksprese etmişlerdir. İncelenen tüm sıçan dokularında MIPP mRNA'sı bulunmasına rağmen en çok böbrek ve karaciğer hücresinde eksprese edildiğini tespit etmişler. Ayrıca fitaz benzeri bir enzim tek hücreli bir protozoada tanımlanmıştır (Freund ve ark. 1992).

Fitazlar bağırsak epitel hücre membranından izole edilmiş olsa da (Maenz ve Classen 1998, Ellestad ve ark. 2002), tek mideli hayvanlarda besinsel fitat fosforunun kullanılabilirliğini arttırmak amacıyla düşük maliyetli ekzojen fitazın ilave edilmesi, hayvansal fitaz üzerinde yapılacak çalışmaların azalmasına sebep olmuştur. Kalın bağırsak veya rumende bulunan fitaz aktivitesi gerçekte mikrobiyal kökenlidir (Wise ve Gilbert 1982, Yanke ve ark. 1998).

2.7.3. Mikrobiyal fitazlar

Fitaz enzimi bitkilerde, mikroorganizmalarda ve bazı hayvansal dokularda bulunmasına rağmen yapılan çalışmalar biyoteknolojik uygulamalar açısından mikrobiyal fitazların daha ümit verici olduğunu göstermiştir (Pandey ve ark. 2001, Vohra ve Satyanarayana 2003).

Mikrobiyal fitaz aktivitesi genellikle *Aspergillus* türlerinde tanımlanmıştır. Shieh ve Ware (1968) fitaz üretimi için topraktan 2000'in üzerinde mikroorganizma taramıştır. İzolatların çoğu intraselüler fitaz üretmişlerdir. Yalnızca 30 izolat ekstraselüler aktivite göstermiştir. Ekstraselüler fitaz üretenlerin tümü filamentöz fungusler olarak

gözenmiştir. Bu funguslardan bir tanesi *Penicillium*, bir tanesi *Mucor* diğer yirmi sekiz tanesinin *Aspergillus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Fitaz üretebilen 28 *Aspergillus* cinsinin 21 tanesinin *A. niger* türüne ait olduğu tayin edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalar *A. niger* türünün en iyi ekstraselüler fitaz üreticisi olduğunu doğrulamıştır (Howson ve Davis, 1983, Volfova ve ark. 1994).

Bakteri, maya ve funguslardan fitaz enzimleri karakterize edilmiş olup (Çizelge 2.1), günümüzde ticari olarak üretimde toprak fungusu olan *Aspergillus* üzerinde durulmaktadır. Ancak substrat spesifitesi, proteolizise karşı direnç göstermesi ve katalitik aktivitesi gibi özelliklerinden dolayı bakteriyel fitazlar, fungal enzimlere alternatif oluşturabilecek potansiyele sahiptir (Konietzyn ve Greiner 2004).

Bakteriyel fitazların ortalama olarak moleküler ağırlığı (40-55 kDa) glikolizasyon farkı olduğu için fungal fitazlardan (80-120 kDa) daha küçüktür (Van Hartingveldt ve ark.1993, Kerovuo ve ark. 1998, Han ve Lei 1999, Golovan ve ark. 2000, Rodriguez ve ark. 2000a, Choi ve ark. 2001). İzole edilen fitazların çoğunun optimum pH'sı 4.5-6.0 arasında yer almaktadır. Ancak *Bacillus* sp.'ye ait nötral veya alkali fitazlar da bulunmaktadır (Kim ve ark. 1998, Choi ve ark. 2001). *A. niger* fitazının (phyA) pH optimumu ise asidik sınırlarda olup 2.5 ve 5.5'dir. Bu iki sınır arasında aktivitede azalma meydana gelmektedir. Mikrobiyal fitazların çoğunun sıcaklık optimumu ise 45-60 °C arasında yer almaktadır. Ancak L. Pasamontes ve ark. (1997) *A. fumigatus*'a ait sıcaklığa dirençli fitazın 100 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda 20 dakikalık inkübasyonlarda sadece %10'luk kayıpla aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir (Rodriquez ve ark. 1999, Kim ve ark. 2003).

Çizelge 2.1. Bazı mikrobiyal fitaz kaynakları ve özellikleri (Kerovuo 2000, Greiner ve Konietzny 2006)

Fitaz Kaynağı	pH optimumu	Sıcaklık optimumu	Enzimin bulunduğu konum	Spesifik aktivite (U/mg)
<i>Aspergillus niger</i>	2.2, 5.0-5.5	55-58	Ex	50-103
<i>Aspergillus terreus</i>	5.0-5.5	70	Ex	142-196
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5.0-6.0	60	Ex	23-28
<i>Aspergillus oryzae</i>	5.5	50	Ex	11
<i>Emericella nidulans</i>	6.5	-	-	29-33
<i>Myceliophthora thermophila</i>	5.5	-	-	42
<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	In ve Ex	9.47 (Ex)
<i>Saccharomyces castelii</i>	4.4	77	Ex	418 (70°C)
<i>Cladosporium</i>	3.5	40	-	909
<i>Candida krusei</i>	4.6	40	-	1210
<i>Escherichia coli</i>	4.5	55-60	In*	811-1810
<i>Klebsiella terrigena</i>	5.0	58	In	205
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5.0, 5.5	50, 60	-	224, 297
<i>Klebsiella aerogenes</i>	4.5, 5.2	68	In	-
<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	Ex	9-15
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	7.0-8.0	70	Ex	20

Ex: ekstrasellüler

In: intrasellüler

In*: peripilazmik boşluk

2.7.3.1. Fungal fitazlar

Ticari olarak üretimde kullanılabilen ilk fitazlar *Aspergillus niger* ve *Asperigillus ficuum* gibi türlerden elde edilmiştir. Fungal organizmalar fosfatı sınırlayan koşullar altında, tek karbon kaynağı olarak mısır nişastasının bulunduğu ortamda üretilerek fungal fitaz (3-fitaz) üretimi sağlanmıştır (Ullah ve Gibson, 1987, van Hartingsveldt ve ark. 1993). 500 ünitelik fungal fitaz mısır-soya küspesi diyetine uygulanmış ve farklı yaşlardaki domuzlarda fitat fosforunun kullanılabilirliğinde %40 kadar artış gözlenmiştir (Harper ve ark. 1997, Kemme ve ark. 1997, Zhang ve ark. 2000). Ayrıca 500 ünitelik fungal fitaz ile desteklenmiş mısır-soya küspesi diyetini tüketen kanatlı hayvanlarda fitat fosforunun kullanımını %70'e kadar artış gözlenmiştir (Tamim ve ark. 2004, Zyla ve ark. 2004). Ancak bu fitazların çalıştıkları pH aralıkları gastrointestinal sistemin pH'sından farklıdır. Fungal fitazların çalışma pH'sı 3.5 ile 5.5 arasındadır, bu da monogastrik hayvanların gastrointestinal sistemlerinin pH'sına yakın bir değerdir (Yi ve Kornegay 1996). Bundan dolayı besinlere yüksek düzeyde fungal fitaz konmalıdır (Lei ve Stahl 2001). Ayrıca fungal fitazlar termostabil değildir; bu yüzden pelet yapımı gibi üretim süreçlerinde stabiliteyi kaybedebilirler (Ullah ve Mullaney 1996). Bu nedenle yeni fitazlar bakteriyel kaynaklardan geliştirilmektedir.

2.7.3.2. Bakteriyel fitazlar

Yem sanayinde kullanım açısından bakteriyel kaynaklı fitazlar fungal fitazlardan daha elverişlidir. Bu 6-fitazlar fungal fitazlardan daha termostabildir ve spesifik aktivitesi daha yüksektir. Ayrıca *E. coli*'den elde edilen fitazın pH'sı (en yüksek 3.5) monogastrik hayvanların gastrointestinal sistemlerinin pH'sına daha yakındır (Griener ve ark. 1993). Bu 6-fitazlar *E. coli*'den elde edilir ve ticari kullanım için *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces lividans* ya da *Pichia pastoris* gibi maya türlerinin içerisine klonlanır (Rodriguez ve ark. 1999, Stahl ve ark. 2003). 150 ile 450 ünitelik *E. coli* türevi fitazlar kanatlı hayvanların buğday ve soya unu diyetlerine eklendiğinde fitat fosforu sindirilebilirliğinde %40 artış gözlenmiştir (Silversides ve ark. 2004). 500 ünitelik fitaz ilavesinde ise etlik piliçlerin fitat sindirilebilirliğinde %70 artış gözlenmiştir (Onyango ve ark. 2005). Genç domuzların besinlerine eklenen az miktardaki *E. coli* türevi fitaz enzimi fosfor sindirilebilirliğini %50 arttırmıştır (Adeola ve ark. 2004; Veum ve ark. 2006).

Fitaz enzimi bakteri, fungus ve maya gibi mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedir. Günümüzde ticari olarak üretimde toprak fungusu olan *Aspergillus* üzerinde durulmaktadır. Ancak substrat spesifikliği, proteolizise karşı direnç göstermesi ve katalitik aktivitesi gibi özelliklerinden dolayı bakteriyel fitazlar, fungal enzimlere alternatif oluşturabilmektedir (Konietzny 2004). Fitaz aktivitesi *Aerobacter aerogenes* (Greaves 1967), *Pseudomonas* sp. (Irving 1971), *B. subtilis* (Powar 1982), *Klebsiella* sp. (Shah 1990), *B. subtilis* (natto) (Shimizu 1992), *E. coli* (Greiner 1993), *Enterobacter* sp.4 (Yoon 1996) ve *Bacillus* sp. DS11 (Kim 1998) gibi bakterilerde saptanmıştır. *Bacillus* suşları patojen olmamaları ve sentezledikleri fitazı hücre dışına salgılama yeteneğinde olduklarından endüstride önemli bir yere sahiptir.

2.8. *Bacillus* Hakkında Genel Bilgiler

Bacillus adı, 1872 yılında Ferdinand Cohn tarafından ilk defa kullanılmıştır (Lin 1997). Bacillaceae familyasına dâhil olup, genellikle gram pozitif (bazı türleri değişken) boyanırlar, aerobik veya fakültatif anaerobik, spor oluşturan, çubuk şeklinde bakterilerdir. Çoğunlukla mezofilik olmakla birlikte psikrofilik ve termofilik türleri de vardır (Ayhan 2000). Genellikle 35-37 °C de ve pH 7.0 civarında ürerler. Endospor oluşturdıklarından kötü şartlara dirençlidirler, kapsül sadece *B. anthracis* türünde görülür. Vejetatif hücreler 0,5x1,2 µm ile 2,5x10 µm çapındadır. Peritrik flagellalıdırlar ve *B. anthracis* ve *B. mycooides* hariç genellikle hareketlidir. *Bacillus* suşlarının koloni yüzeylerinin görüntüleri genellikle çevresel koşullara bağlı olarak değişir. Bu koşullardan en önemli olanları mikroorganizma kültürünün bağlı bulunduğu besiyerinin bileşimi ve inkübasyon sıcaklığıdır. Çevresel şartların farklılaşması ile kültürün kendisinde de bazı farklılaşmalar meydana gelir. Sadece küçük koloni formlarına sahip suşların dışında koloninin çapı, besiyeri ve içerisindeki agar konsantrasyonuna bağlı olarak değişir. *Bacillus* türlerinin birçoğunda pigment üretimi yoktur. Geneli beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklere pigmentli kolonilere de rastlanır. *Bacillus megaterium* suşları özellikle kazein içeren agarda sarı renkte pigment oluştururlar. *B. mycooides*'in kolonileri ise rizoid şekilde agarlı besiyerine üzerine yayılır (Buchanan ve Gibbons 1974, Lennete ve ark. 1985, Holt ve ark. 1993).

Bacillus'ların hücre duvarı, hücre yüzeyini tamamıyla örten yüzey katmanı parakristalin oluşturur. *Bacillus*'lar genellikle karbonhidrat kapsülü bulundurlar (Robinson 1985). Tek ya da çok sayıda hücreden oluşan uzun zincirler meydana getirebilirler. Hücrede bulunan sporun şekli ve yeri, türler arasında farklılık gösterir. Sporlar genellikle silindirik, elipsoidal, oval ya da yuvarlaktır. Sporun hücre üzerindeki konumu ise merkezde, merkeze yakın, uca yakın, uçta ya da lateralde bulunabilir (Lennete ve ark. 1985). *Bacillus* sporlarının sporogoniumdaki durumları ve şekilleri ile sporogoniuma bağlı olan büyüklüğü taksonomik çalışmalarda kullanılmaktadır (Ustaçelebi 1999).

Bacillus cinsinin tanımlanmış 51 türü bilinmesine rağmen taksonomik olarak yeri tam olarak belirlenmemiş gruplarda vardır. *Bacillus* türleri çoğunlukla saprofittir, doğada yaygın olarak toprakta bulunur ve toz partikülleri ile sulara, bitki ve hayvan materyallerine bulaşabilmektedirler (Barredo 2005).

Bazı türler fakültatif anaerob özellikte olsalar ve oksidaz testleri değişkenlik gösterse de, daima katalaz pozitiflerdir. Bilinen birkaç tür hareketsizdir (*B. anthracis* ve *B. mycooides*). Tür düzeyinde tanımlamada önemli bir yer tutan spor şekilleri ve konumları, faz-kontrast veya spor boyama ile kolayca saptanabilir.

Şekerleri fermente ederler ve sonuçta gaz oluşumu görülmezsizin asit üretirler. Proteinleri ise, amonyak oluşturarak parçalarlar ve böylece kokuşmaya neden olurlar. DNA'larındaki G+C mol oranı %32-62'dir (Çon ve Gökalp 1997). Bütün türleri nütrient agar, trypticase soy agar, brain heart infusion ve kanlı agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi ürer. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren; nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler (Kaynar ve Beyatlı 2006).

Bacillus cinsi bakteriler toprak, hayvan dışkıları ve bitkisel atıklar üzerinde yaygın olarak bulunurlar. Bu cinsin bireylerinin çoğu zararsız, izolasyonu ve teşhisi kolay, hızlı büyüme oranı ile fermentasyon süresi kısadır. Genel olarak güvenli olmaları, sentezledikleri proteinleri dış ortama salgılama kapasiteleri gibi birçok nedenden dolayı cazip endüstriyel organizmalardır. *Bacillus* türleri çeşitli kompleks substratlara karşı aktivite gösteren çok sayıda ve çeşitli hidrolitik enzimler üretmekte ve salgılamaktadırlar. Bu nedenle *Bacillus* cinsindeki organizmalar, endüstriyel alanda α -

amilaz, fitaz, proteaz, glukanaaz, glukoz izomeraz ve endonükleaz gibi enzimlerin üretiminde yaygın şekilde kullanılmaktadırlar (Arıkan ve Gözükara 2012).

Endüstriyel alanlarda kullanılan 10'dan fazla mikrobiyal kökenli enzimin *Bacillus* cinsine ait bakteriler tarafından üretildiği bilinmektedir. Enzim üretimi çalışmalarında kullanılan bu bakterilerin büyük bir bölümü kemoorganotrof olduğu için besin istekleri azdır, kolayca kültüre alınabilirler ve yapılarında heterojenlik yoktur. Bunun gibi birçok önemli özellikleri sayesinde endüstriyel alanlarda tercih edilmişlerdir (Priest 1977).

Bacillus'ların bazı türleri yiyecekler için önemli olabilir. Bazı türleri de böcek patojenidir. *Bacillus*'ların birkaç türü polipeptit sınıfından antibiyotik üretir. Antibiyotikler kültürlerde sporulasyon aşaması olduğu zaman oluşmaya başladığı gözlenmiştir (Buchanan ve Gibbons 1974).

Turnbell ve Kramer (1991)'in yaptıkları bir araştırmaya göre *Bacillus* türlerinin teşhisi ve türler arasındaki farklılıkların tespiti için spor ve sporangiyum morfolojileri temel alınmıştır. Buna göre de *Bacillus*'lar 3 grupta toplanmıştır;

Birinci grup *Bacillus*'larda kendi içlerinde A ve B olmak üzere ikiye ayrılır. Bu her iki grupta sporangia şişmemiştir. Sporlar elips veya silindirik şekilli, sentral veya terminal konumdadır. Gram pozitiflerdir. A grubu ve B grubu arasındaki fark ise A alt grubunda hücre genişliği 1µm den küçük, B alt grubunda ise 1µm den büyüktür. A alt grubuna örnek olarak *B. megaterium* ve *B. cereus*; B alt grubuna örnek olarak da *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. firmus* ve *B. coagulans* verilebilir (Turnbell ve Kramer 1991).

İkinci grupta yer alan *Bacillus* türlerinde sporangia şişmiştir. Sporları elips, sentral veya terminaldir. Bu grupta yer alan *Bacillus* türlerine örnek olarak *B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. alvei*, *B. laterosporus* ve *B. brevis* verilebilir (Turnbell ve Kramer 1991).

Üçüncü grupta yer alan *Bacillus* türlerinde de sporangia şişmiştir. Sporlar küresel, subterminal veya terminal konumdadır. *B. sphaericus* bu gruba örnek olarak verilebilir (Turnbell ve Kramer 1991).

Bu genus içindeki bakterilerin çoğu patojen değildir. İki adedi insan ve hayvanlarda hastalık oluşturan basillerdir. Bunlar da *B. antracis* ve *B. cereus*'tur (Bilgehan 1995).

2.9. *Bacillus* Fitazlarının Özellikleri

Liu ve ark. (1998) fitazın moleküler ağırlığının organizma türlerine bağlı olarak 35-700 kDa arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Tambe ve ark. (1994) *Klebsiella aerogenes* fitazının moleküler ağırlığının 700 kDa; Greiner ve ark. (1997) *Klebsiella terrigena* fitazının moleküler ağırlığının 40 kDa olduğunu bulmuşlardır. Shimuzi (1992) *Bacillus subtilis*'e ait fitazın moleküler ağırlığının 38 kDa olduğunu rapor etmişlerdir. Powar ve Jagannathan (1982) Yaptıkları çalışmada, *Bacillus subtilis*'den izole ettikleri fitazda birbirine yakın iki protein bandı bulmuşlardır. Her iki bandın da fitaz aktivitesi verdiğini görmüşlerdir. Bu iki izozimin bakteri tarafından üretilebileceğini düşünmüşlerdir. Kim ve ark. (1998) *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından üretilen fitazın 44 kDa olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada *Bacillus sp.*'den izole edilen fitazın SDS-PAGE analizi sonucu moleküler ağırlığı 60 kDa ve 53 kDa olarak saptanmıştır.

Bakterilerden izole edilen fitazlar glikolizasyona uğramayan histidin asit fosfataz ya da β -propeller yapıları alkali fitazlardır (Lei ve ark. 2007). Bakteriyel fitazların enzim aktiviteleri $200-388 \text{ U/mL}^{-1}$ arasında olduğu bildirilmiştir (Quan ve ark. 2001). Bazı bakteriyel fitazlar, özellikle *Bacillus* türlerinden elde edilenlerin, çoğunun nötral pH'da ki optimum sıcaklıkları $55-70 \text{ }^\circ\text{C}$, optimum pH'ları 7.0 ile 7.5 ve moleküler ağırlığı 38-47 kDa arasındadır (Polaina ve MacCabe 2007).

Bacillus subtilis bakterisi tarafından sentezlenen fitaz enzimi üzerine yapılan çalışmada fitaz enziminin etanol ve aseton ile çöktürülmesi sağlanmış, ardından uygulanan iki farklı iyon değişim kromatografisi ile 39 kat ve % 32 verimle saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı ultrasantrifüj ile sedimentasyon yönteminden yararlanılarak 3,5 kDa olarak belirlenmiştir (Powar ve Jagannathan 1982). *Bacillus subtilis* VTT E-6813 fitaz enzimi sırasıyla etanol çöktürmesi, amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografisi uygulanarak % 22 verimle 3,7 kat saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 43 kDa olarak saptanmıştır (Kerovuo ve ark. 1998). *Bacillus subtilis* CF92 tarafından üretilen fitaz enzimi ise, sırasıyla etanol çöktürmesi, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi uygulanarak 24 kat, % 12,7 verimle elde

edilmiştir. Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 46 kDa olarak belirlenmiştir (Hong ve ark. 2011).

Topraktan izole edilen *Bacillus* sp. DS11 termostabil fitaz enzimine sırasıyla aseton çöktürmesi, hidrofobik etkileşim, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi uygulanmış ve enzim % 10 verimle 77 kat saf olarak elde edilmiştir. Monomerik olan enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ve jel filtrasyon kromatografisi ile 40 kDa olarak saptanmıştır. *Bacillus* sp. DS11 fitazının optimum sıcaklığı 70 °C olarak belirlenmiştir. Fitaz enzimi CaCl₂'ün olmadığı koşullarda farklı sıcaklıklarda 10 dakikalık inkübasyonlarının ardından incelenmiş ve 50 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda aktivitede ciddi düşüşler olduğu saptanmıştır. Fakat ortamlarda 5 mM CaCl₂'ün olduğu durumlarda ise 90 °C'de 10 dakikalık inkübasyonun ardından aktivitelerinin % 50'sini koruyabildikleri gözlemlenmiştir. Optimum pH'sı 7.0-8.0 olan enzimin 4.0-8.0 pH aralığında oldukça stabil olduğu belirlenmiştir. Kim ve ark. (1998) *Bacillus* sp. DS11 fitazının Mn²⁺, Cd²⁺ iyonları ve EDTA tarafından önemli ölçüde inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Enzimin Mg²⁺, Hg²⁺, Ba²⁺ ve Cu²⁺ (5 mM) varlığında aktivitesinin yaklaşık % 50'sini koruyabildiğini belirlemişlerdir. Ayrıca *Bacillus* sp. DS11 fitazının 1 mM ve 5 mM PMSF ve 1,4-dithiothreitol (DTT) tarafından inhibe edilmediği bildirilmiştir. Kim ve ark. (1998) *Bacillus* sp. DS11 fitazının çeşitli fosfat esterlerine karşı aktivitesini belirlemiş ve sodyum fitat dışında kullanılan diğer substratlara karşı, oldukça düşük aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Sodyum fitat için K_m değeri 0,55 mM olarak hesaplanmıştır (Kim ve ark. 1998).

Haşlanmış pirinçten izole edilen *Bacillus* sp. KHU-10 tarafından sentezlenen termostabil fitaz aseton çöktürmesi, iyon değişim ve hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmış ve enzim % 21,1 verimle 105,8 kat saf olarak elde edilmiştir. Monomerik olan doğal enzimin moleküler ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile 46 kDa olarak ve denatüre enzimin moleküler ağırlığı ise SDS-PAGE ile 44 kDa olarak saptanmıştır. Optimum sıcaklığı 40 °C olan *Bacillus* sp. KHU-10 fitazının 40 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda 10 dakika boyunca stabil olduğu belirlenmiştir. Enzimin 10 mM CaCl₂ içerdiği koşullarda ise optimum sıcaklığının 60 °C olduğu ve 60 °C'de 10 dakika inkübasyonun ardından aktivitesinin % 95'ini koruduğu saptanmıştır. Optimum pH aralığı 6.5-8.5 olan enzimin aynı pH aralığında

oldukça stabil kalabildiği görülmüştür. Enzimin 10 mM CaCl₂ içerdiği koşullarda ise optimum pH aralığının 6.0-9.5 olduğu ve pH 6.5'den 10,0'a kadar oldukça stabil olduğu bildirilmiştir. *Bacillus* sp. KHU-10 fitazı ile yapılan araştırmada EDTA ile enzim aktivitesinin % 90 inhibe edilmesi, substrat ve enzim arasındaki ara yüzeyleri etkilemesine bağlanmıştır. Bunun yanında çift değerlikli metal iyonları olan Ba²⁺ (% 65), Cd²⁺ (% 100), Co²⁺ (% 40), Cr²⁺ (% 55), Cu²⁺ (% 41), Hg²⁺ (% 57) ve Mn²⁺ (% 83) aktiviteyi düşürmüştür. Metal iyonlarından Cd²⁺ hariç diğerlerinin inhibisyon etkisi, aynı oranda Ca²⁺ ilave edilmesi ile ortadan kaldırılabildiği bildirilmiştir. *Bacillus* sp. KHU-10 fitazı sodyum fitat dışında kullanılan diğer substratlara karşı hiç aktivite göstermemiştir. Enzimin pH 7.0'de sodyum fitat için, kcat 26,6 s⁻¹ ve K_m değeri 50 µM olarak hesaplanmıştır (Choi ve ark. 2001).

Termofil bir bakteri olan *Bacillus laevolacticus* tarafından sentezlenen fitaz enzimi iyon değişim kromatografisi uygulanarak iki adımda 6,5 kat, % 24,4 verimle saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ile enzimin 41 kDa ve 46 kDa molekül ağırlığına sahip iki alt birimden oluştuğu belirlenmiştir. *Bacillus laevolacticus* kısmi saflaştırılmış fitazın optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 7.0 ve 70 °C'dir. Enzim pH 8.0-10.0 aralığında aktiftir ve optimum aktivitesinin % 90'ını gösterebilmektedir. Enzim 60 °C ve pH 8.0'de CaCl₂ varlığında ve yokluğunda 3 saat inkübasyonun ardından aktivitesinin % 80'ini koruyabilmiştir. Enzim ayrıca 5 mM CaCl₂ varlığında ve yokluğunda pH 8.0 ve 80 °C'de inkübasyonunun ardından aktivitesinin tamamını koruduğu belirlenmiştir. *Bacillus laevolacticus* fitazı Cu²⁺ ve Zn²⁺ varlığında, orijinal aktivitesinin % 50'den fazlasını koruyabilmiştir. Enzim aktivitesi üzerine Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Na⁺, K⁺, Ba²⁺ ve Co²⁺ katyonlarında önemli ölçüde inhibisyona neden olmadığı bildirilmiştir. Enzim 1 mM EDTA varlığında aktivitesinin % 90'ını kaybederken, 5 mM EDTA tarafından tamamen inhibe olması, enzim aktivitesi üzerinde metal iyonlarının önemli rol oynadığı şeklinde açıklanmıştır. Alkali pH değerlerinde aktif olan *Bacillus laevolacticus* fitazının kalsiyum fitata olan ilgisinin, sodyum fitata göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Enzim ayrıca, diğer denenen *p*-nitrofenil fosfat, AMP, ATP, fenil fosfat ve NaDPH₂.Na₄ substratlarına karşı % 5.08-40 arasında aktivite gösterdiği bildirilmiştir. K_m ve 49 V_{max} kinetik parametreleri sırasıyla 0,526 mM ve 12,3 µmol/dk/mg olarak hesaplanmıştır (Gulati ve ark. 2007a).

2.10. Fitazların Endüstride Kullanım Alanları

2.10.1. Yem katkı maddesi

Fosfor hayvan vücudunda en çok bulunan ikinci mineral olup bunun büyük bir kısmı kemik ve dişlerde bulunur. Kalsiyumla beraber, kemik yapının oluşumu ve sürekliliği en önemli görevini oluşturur. Daha küçük bir kısmı ise vücudun yumuşak dokuları ve sıvılarında bulunmakta ve buralarda da önemli fonksiyonlar göstermektedir (Underwood ve Suttle, 1999).

Fitat, tohumların çimlenmesi için enerji ve fosfor kaynağı olarak görev almasına karşın bağlı fosfor tek mideli hayvanlar tarafından çok az miktarda kullanılabilir. Bu nedenle inorganik fosforun kanatlı, domuz ve balık rasyonlarına doğrudan ilave edilmesi gerekmektedir. Dolayısıyla inorganik fosfor yenilenemez ve pahalı bir mineral haline gelmektedir (Lei ve Porres 2003).

Fitat ve fitata bağlı fosforun tüm kanatlı rasyonlarında bulunduğu ve fitat fosforunun bu rasyonlar tarafından kısmen kullanılabildiği bilinmektedir (Lowe ve ark. 1939). Warden ve Schaible (1962), broiler üretimlerde, ekzojen olarak verilen fitazın, fitat fosforunun kullanımını ve kemikteki mineralizasyonu artırdığını bildirmişlerdir. Bundan yaklaşık 30 yıl sonra ise yem katkısı olarak, fitata bağlı fosforu serbest bırakacak ve fosfor atığını azaltacak *Aspergillus niger* fitazının ticari olarak kullanımı başlamıştır.

Günümüzde tek mideli hayvanlarda fitazın yem katkısı olarak kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Hatta nişasta tabiatında olmayan polisakkaritleri parçalayan enzimlerden daha fazla kullanılmaktadır (Bedford 2003). Son 10 yıl içerisinde kanatlı ve domuz rasyonlarında mikrobiyal fitaz kullanımı ile ilgili bilimsel çalışmalar ve deneyimler hızla artmaktadır. Bunun sonucunda ise yem katkısı olabilecek yeni fitaz enzimleri araştırılmakta ve kullanılmaktadır. Enzim kullanımındaki en etkin ilerleme belki de fitaz enzimi kullanımıyla olmuştur. 1940'lı yılların yüksek kalitedeki bitkisel protein kaynağı olan soya gibi 1990'lı yılların hayvansal üretimde kullanılan en önemli buluşu fitaz enzimidir (Kornegay, 2001).

Ruminantlar ise, rumendeki mikrobiyal flora tarafından üretilen fitaz enzimi yardımı ile fitatı parçalayabilmektedirler (Yanke ve ark. 1998). Açığa çıkan fosfor ise hem mikrobiyal flora hem de konakçı ruminant tarafından kullanılmaktadır.

Yem katkısı olarak en yaygın kullanılan fitazlar *A. niger* (3-fitaz), *Peniophora lycii* (6-fitaz) ve *Escherichia coli* (6-fitaz) fitazlarıdır. Kanatlı rasyonlarına fitaz enzimi granül, sıvı formda veya yüksek peletleme sıcaklığındaki (>80 °C) enzim denatürasyonunu engellemek için peletleme sonrasında uygulanabilmektedir (Selle ve Ravindran 2006).

Balık üretim masraflarının %70'ini yem giderleri oluşturmaktadır (Rumsey 1993). Tek mideli hayvanlarda olduğu gibi balıklarda yem maddeleri içerisindeki fitin fosforundan yararlanacak sindirim enzimine sahip değildir. Bu nedenle fitaz enzimi su ürünleri üretmek amacıyla, hem düşük fiyatlı bitkisel kökenli maddelerin kullanımını artırmak hem de suda fosforu kabul edilebilir seviyede tutabilmek amaçları ile kullanılmaktadır. Balıkçılıkta yüksek seviyede bitkisel kökenli maddeler içeren yemlerde fitaz enziminin kullanılması ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır (Robinson ve ark. 1996, Mwachireya ve ark. 1999).

2.10.2. Gıda endüstrisi

Fitatlar, bitki tohumları ve danelerde fosfat ve inositolün başlıca depo formudur. Fitat bitki tohumlarının olgunlaşması sırasında oluşur ve olgun tohumlarda toplam fosfatın % 60-90'nını oluşturmaktadır (Loewus 2002).

Diyetlerdeki bitki kökenli gıdaların miktarına ve işlenme derecelerine bağlı olarak günlük fitat tüketimi en fazla 4500 mg olmalıdır. Yaklaşık olarak vejetaryen diyetlerinde ve gelişmekte olan ülkelerin kırsal kesimlerinde günlük fitat tüketimi 2000-2600 mg civarında iken bu değer karışık diyetlerde 150-1400 mg'dır (Reddy 2002).

Diyetlerde fitatın varlığı ile ilgilenilmesinin nedeni çinko, demir, kalsiyum, magnezyum, manganez ve bakır gibi minerallerin alımındaki negatif etkisinden dolayıdır (Lopez ve ark. 2002, Konietzny ve Greiner 2003). Çeşitli pH değerlerinde çözünmez mineral-fitat kompleksleri oluşmakta, bu kompleksler insan sindirim sisteminde absorbe edilemediğinden düşük mineral emilimine neden olmaktadır. Ayrıca sindirim sisteminin üst kısmında sınırlı miktarda mikrobiyal popülasyonun olması ve içsel fitatı hidrolize edici enzimlerin olmamasından dolayı ince bağırsakta, fitat çok sınırlı miktarda hidroliz olabilmektedir (Iqbal ve ark. 1994). Fitat, asidik ve alkali pH'da proteinlerle kompleks oluşturmaktadır (Cheryan 1980). Bu interaksiyon proteinin yapısında değişiklikler meydana getirmekte ve bunun sonucunda enzimatik aktivitede,

proteinin çözünlüğünde ve proteolitik parçalanmada azalmalar meydana gelebilmektedir.

Fitaz enzimi gıda sanayinde çok önemli bir potansiyele sahip olmasına rağmen yakın zamana kadar marketlerde fitaz enzimi kullanılmış ürünler bulunmamaktaydı. Bu alandaki çalışmalar, gıda işlemede teknik geliştirmenin yanı sıra bitki kökenli gıdaların besleyici değerlerinin artırılması üzerine yoğunlaşmıştır. Fitat içeriği yüksek diyetler mineral maddelerin emilimini oldukça azaltmakta (Lopez ve ark. 2002, Konietzny ve Greiner 2003) ve gıdaların işlenmeleri sırasında fitatın defosforilasyonu, sadece kısmen fosforile olmuş myo-inositol fosfat esterlerinin oluşmasına neden olmaktadır (Sandström ve Sandberg 1992, Han ve ark. 1994, Sandberg ve ark. 1999). Myo-inositol fosfat esterleri insanlar için önemli fizyolojik özelliklere sahiptir (Shears 1998). Bu nedenle fitaz enziminin gıda üretimi sırasında kullanılması ile birlikte fonksiyonel gıdaların üretilmesi mümkün olacaktır (Greiner ve ark. 2002) ve böylelikle fitaz enzimi yardımıyla biyokimyasal olarak aktif myo-inositol fosfat esterleri oluşacaktır. Bu sayede insanlar mineral maddelerden daha iyi faydalanabilecekler ve minerallerin sindirim sisteminden emilmesi kolaylaşmış olacaktır.

Gıda sanayinde gıdaların işlenmesi sırasında fitaz ilavesi ekmek yapımı (Haros ve ark. 2001), bitkisel protein izolatlarının üretimi (Wang ve ark. 1999, Fredrikson ve ark. 2001) ve tahıl kepeklerini parçalamada kullanılmaktadır (Kvist ve ark. 2005). Gıda işleme ve hazırlama sırasında, fitat genel olarak bitkilerde ve mikroorganizmalarda doğal olarak bulunan fitazlarla tamamen hidrolize edilememektedir. Demir başta olmak üzere minerallerden yararlanma potansiyelini artırmak için gıdalardaki fitat miktarının çok düşük düzeylere indirilmesi gerekmektedir (Hurrell 2003).

Yaygın bir tüketime sahip olan yoğurdun, buğday rüşeymi ilavesiyle hem protein yönünden zenginleştirilmesi hem değişik bir lezzet kazanması hedeflenmiştir. Fitaz enzimi ilavesiyle de, tahıllardaki mineralleri bağlayarak yarayırlılığı engelleyen fitik asidin olumsuz etkisi ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır. Fitazın mineral miktarları açısından olumlu etkileri kesindir ve yoğurt üretiminde tahıl ürünleriyle birlikte kullanılması yararlı olacaktır. Yalçınkaya ve ark. (2003) tarafından yoğurda buğday rüşeymi ilavesiyle yoğurdun protein, yağ ve mineral madde bakımından zenginleştirilmesine yönelik yapılan çalışmalardan olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Ayrıca rüşeym katkısı, kalsiyum, sodyum, magnezyum, çinko, demir ve fosfor gibi minerallerin toplam miktarlarını artırıcı etkide bulunmaktadır. Yapılan işlem neticesinde mikrobiyal gelişme ve laktik fermantasyonunun hızlandığı gözlemlenmiştir. Söz konusu minerallerin çözünebilirliklerinin, rüşeym katkısı ile önemsiz oranda düştüğü, fakat fitaz enzimi katkısı ile normal yoğurdun biyoyararlılık seviyesinin üzerine çıkabildiği saptanmıştır.

2.10.3. Kâğıt endüstrisi

Kâğıt endüstrisinde bitki fitik asit'inin uzaklaştırılması gerekmektedir. Günümüzde kâğıt hamuru ve kâğıt'ın yapım aşamalarında fitik asit'i parçalamak amacıyla termostabil fitazlar kullanılmaktadır. Fitik asit'in enzimatik olarak parçalanması sonucunda kanserojen veya toksik maddeler içeren ürünler oluşmamaktadır. Bu nedenle kâğıt endüstrisinde fitaz enzimlerinin kullanımı, daha temiz bir teknolojinin kullanılmış olması ve dolayısıyla çevreyi koruma açısından önem taşımaktadır (Liu ve ark. 1998).

2.10.4. Toprak iyileştirme çalışmaları

Bazı toprak alanlarında, fitik asit ve türevleri toplam organik fosforun %50'sini oluşturabilmektedir (Dalal 1978). Findenegg ve Nelemans (1993), mısır bitkisinin topraktaki fitik asit fosforunu kullanılabilmesinde fitazın etkisini araştırmışlardır. Toprağa ilave edilen fitazın, fitinin parçalanma oranının artmasını sağlayarak büyümeyi uyardığını bildirmişlerdir. Bu çalışma bitkilerin köklerine fitaz geninin ekspresyonu ile oluşturulabilecek transgenik bitkilerin, topraktaki fitin fosforundan faydalanabileceği düşüncesini ortaya koymuştur (Day 1996).

2.10.5. Biyoteknoloji

Geçtiğimiz 20 yıl içerisinde fitaz enzimi, besleme, çevre koruma ve biyoteknoloji alanlarında çalışan bilim adamlarının dikkatini çekmektedir. Fitazlar biyoteknolojik uygulamalarda (özellikle yem ve gıdalardaki fitat içeriğini azaltmada) büyük önem taşımaktadır (Lei ve Stahl 2001, Vohra ve Satyanarayana 2003).

2.10.6. Myo-inositol fosfatların hazırlanması

Genel olarak *myo*-inositol ve izomerleri veya biyokimyasal türevleri yüksek bitkiler, mikroorganizmalar ve memeli hücrelerinde önemli biyolojik fonksiyonlar yürütmektedirler. Beslenme ve metabolik fonksiyonlar için, esas formu *myo*-inositoldur.

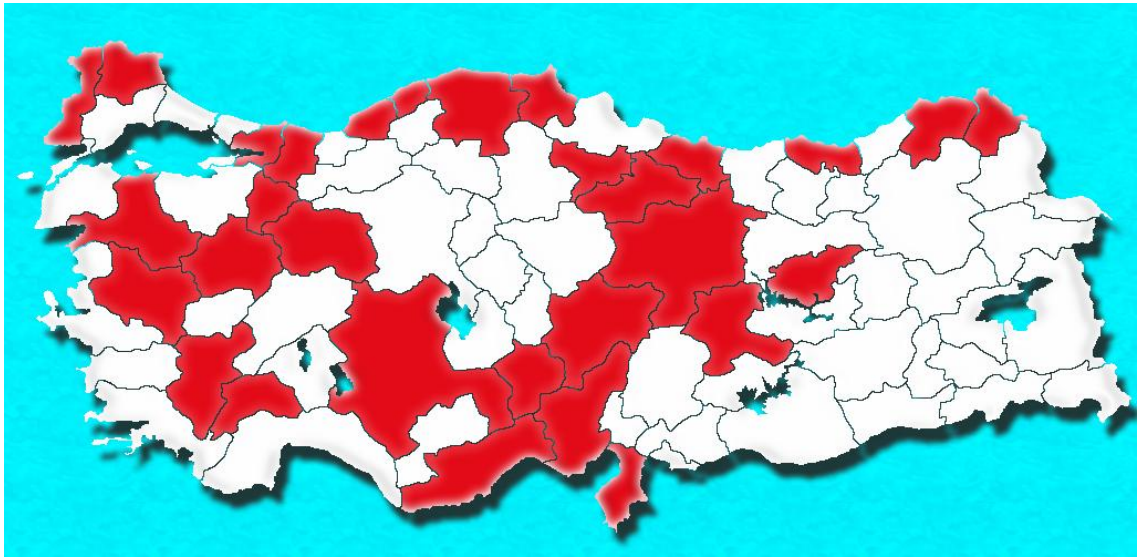
Günümüzde, transmembran sinyalizasyonunda ve intraselüler kaynaklardan kalsiyumun hareketini sağlamada görev alan inositol fosfat ve fosfolipidlere olan ilginin artması, çeşitli inositol fosfatların hazırlanmasını gündeme getirmiştir (Billington 1993, Liu ve ark. 1999). *S.cerevisiae* fitazı kullanılarak fitik asit'in 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 hazırlandığı bildirilmiştir (Siren 1986a). Ayrıca *E. coli* fitazı kullanılarak inositol 1,2,3,4,5-pentakisfosfat, inositol 2,4,5-trifosfat ve inositol 2,5-bifosfat da hazırlanmaktadır (Greiner ve Konietzny 1996). İnositol fosfat türevleri enzim stabilizatörü (Siren 1986b), enzim inhibitörü, biyokimyasal ve metabolik araştırmalarda enzim substratı ve ilaç olarak da kullanılmaktadır (Laumen ve Ghisalba 1994). İnositol fosfat karışımları eklem iltihabı ve astım gibi solunum hastalıklarına karşı kullanıldığı ve spesifik inositol trifosfatların ağrı kesici olarak önerildiği de bildirilmiştir. Ayrıca inositol tirifosfat esterlerinin HIV'in de dahil olduğu retroviral enfeksiyonlara karşı önemli derece önleyici etkiler gösterdiği gözlemlenmiştir (Siren 1998). Bunların yanı sıra, fitatın antikanser etkilerinin sinyal iletim yollarında, hücre döngüsü düzenleyici genlerinde, farklılaşmış genlerde, onkogenler ve belki de tümör baskılayıcı genlerde önemli rol oynadığını düşündürmektedir (Greiner ve ark 1997, Shamsuddin 1999, Selle ve ark. 2007).

İnositol veya inositol fosfatların endüstriyel üretiminde, fitik asitten myo-inositol fosfat türevleri, serbest myo-inositoller ve inorganik fosfat eldesinde fitaz enzimi kullanımı önerilmektedir (Brocades 1991). Bu enzimatik hidrolizin avantajı fitaz enziminin spesifitesi ve reaksiyon koşullarına uygun olmasıdır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılacak *Bacillus* suşları Türkiye'nin 30 farklı ilinden alınan toprak örneklerinden izole edilmiştir (Şekil 3.1). İzolasyon sonucu en yüksek fitaz aktivitesine sahip *Bacillus* sp.'ler, farklı içerikli ortamlarda üretilmişler ve bunlardan en iyi enzim aktivitesinin saptandığı üreme ortamı ve *Bacillus* sp. tespit edilerek, çalışmaya bu bakteri ile devam edilmiştir ve *Bacillus* sp.'ler 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 ve Zonguldak

3.2. Yöntem

3.2.1. Fitaz pozitif bakterilerin izolasyonu

Çalışmalarda 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, ortamda yalnızca sporlu bakterilerin kalması sağlanmış ve tüplerin ağızları kapatılarak soğumaya bırakılmıştır (Lennette ve ark. 1985)

Bakterilerin fitaz üretme kapasitelerinin katı besiyerde belirlenmesi amacıyla fitaz tarama ortamı (PSM) kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Fitaz tarama ortamının

hazırlanmasında, tüm maddeler miktarına uygun bir şekilde ölçülüp erlende karıştırılmış ve pH'sı 7.0 ye ayarlandıktan sonra otoklavlanmıştır. Otoklav işlemi bittikten sonra 50-55 °C' ye kadar soğutulan besiyerleri, 180 °C' de 1 saat pastör fırınında steril edilen petri kaplarına 15'er mL dökülerek soğumaya bırakılmıştır.

Farklı illerden alınan toprak örneklerinden 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} 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 nütrient agarlı ortamda kültüre edilerek, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C' de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Fitaz pozitif bakterilerin seçiminde kullanılan katı besiyeri (PSM) (Howson ve Davis 1983)

İçerik	Fitath Besiyeri (PSM) (g/L)
Glukoz	20
Na-Fitat	4
CaCl ₂ .2H ₂ O	2
NH ₄ NO ₃	5
KCl	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Agar	15
pH	7.0

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

Elde edilen bakterilerden, en büyük zon çapına sahip 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).

Bacillus cinsini tanımak için 3 adet biyokimyasal test ve 2 adet morfolojik test olmak üzere, toplam 5 adet test yapılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Biyokimyasal ve morfolojik testlerde kullanılan besiyerleri (Çotuk 2003)

İçerik	Hareketlilik Testi (% g)	Nişastanın Hidrolizi Testi (% g)	Katalaz Testi (% g)	Spor Boyama (% g)	Gram Boyama (% g)
Nişasta	-	0.5	-	-	-
Nütrient Broth	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Agar	1	2	2	1	-
pH	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0

3.2.2.1. Hareketlilik testi

Hareketlilik testi için agar ve nütrient broth kullanılarak ortam hazırlanmıştır (Çizelge 3.2). Steril petriyerler, alt taraflarından kalemle çizilerek ikiye bölünmüş ve bakteri ekilecek kısım işaretlenmiştir. Belirlenen bölgeye 0,1 mL pipetlenen mikroorganizma üremiş sıvı kültür, çizgiyi geçmeyecek şekilde, drigalski özesi ile iyice yayıldıktan sonra 37 °C’ de 18 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Temiz 1994).

3.2.2.2. Katalaz testi

Katalaz testinde katı ve sıvı ortamlar kullanılarak, farklı yöntemlerle test yapılabilmektedir. Çalışmada ise, % 0,8 nütrient broth içeren agarlı ortama ekilmiş bakteriler, 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda oluşan koloniler üzerine 1-2 damla % 3’ lük H₂O₂ damlatılmış ve gaz çıkışı olup olmamasına göre değerlendirme yapılmıştır.

3.2.2.3. Nişastanın hidrolizi testi

Çizelge 3.2’de gösterilen ortama, seri dilüsyon yapılan bakteriler tek koloni oluşturacak şekilde ekilip, 37 °C’de, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, besiyerine % 0,5 I (iyot) ve % 5 KI (potasyum iyodür) ile hazırlanmış iyot çözeltisi damlatılarak koloniler etrafında açık renkli bölge oluşumu izlenmiştir (Koneman ve ark. 1992)

3.2.2.4. Gram boyama

Gram boyama işlemi Temiz (1994)' in belirttiği yönteme göre yapılmıştır. Buna göre; bakterilerin 18 saatlik taze kültürlerinden, steril öze ile alınarak 1 damla steril distile su ile yayma preparat hazırlanmış ve preparatlar havada kurumaya bırakılmıştır. Kuruma tamamlandıktan sonra lamlar 3 defa alevden geçirilerek tespit işlemi yapılmıştır. Daha sonra lamların üzerine, mikrobiyal film tabakasını kaplayacak şekilde, bol miktarda kristal viole damlatılarak 1 dakika beklenmiştir. Kristal viole yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra lamların üzerine % 0,5 I ve % 5 KI ile hazırlanmış gram iyodin (lugol) dökülerek yine 1 dakika beklenmiştir. Boya, suyla uzaklaştırılmış ve lamlar % 95'lik etil alkol ile renk kayboluncaya kadar yıkanmıştır. Ardından, film tabakasının üzerine safranin eklenmiş ve 45 saniye beklenmiş ve boya yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar, havada kurutulmuş ve immersiyeon yağı ile 10x100' lük objektifte, Olympus CH-2 marka ışık mikroskopunda incelenmiştir. İyi boyanmış olan örneklerde Gram (+) olan mikroorganizmalar koyu mor (menekşe) renkli, Gram (-) olanlar ise açık pembe renkli görünüşleri ile ayırt edilmiştir.

3.2.2.5. Spor boyama

Endospor boyama işlemi Durlu Özkaya (2000)' nın belirttiği yönteme göre yapılmıştır. Buna göre; taze kültürleri hazırlanan bakteriler, lam üzerine 1 damla steril distile su ile iyice yayılarak havada kurutulmuş ardından 3 kez alevden geçirilerek fikse edilmiştir. Örnekler malaşit yeşili ile alevde 5 dakika etkiye bırakılmış ve buharlaştıkça boya ilave edilmiştir. Distile su ile yıkanan örnekler 30 saniye safranin ile boyanmış ve distile suyla tekrar yıkanıp havada kurutulduktan sonra bakteri sporlarının morfolojileri, Olympus CH-2 marka araştırma mikroskobu kullanılarak incelenmiştir.

3.2.3. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri

Çalışmada kullanılan bakterilerin saklanması, geliştirilmesi amacıyla farklı besiyerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Buna göre, bakterilerin buzdolabı koşullarında uzun süre dayanmalarını sağlamak için, Çizelge 3.3'de verilen kültür saklama besiyeri kullanılmış olup, kültürler 30 günde 1 kez yeniden hazırlanan agarlı besiyerine aşılacak sureti ile korunmuşlardır.

Çizelge 3.3. Bakteri saklanması ve geliştirmesinde kullanılan besiyerleri

İçerik	Kültür Saklama Besiyeri (% g) (Sarıkaya 1995)	Bakteri Ön Geliştirme Besiyeri (LB) (% g)
Tripton	-	1
Maya Özü	-	0,5
Na-Fitat	-	0,5
Nütrient Broth	0.8	-
NaCl	0.8	1
Agar	2.0	-
pH	7.0	7.0

3.2.4. Enzim üretim ortamının belirlenmesi

Biyokimyasal ve morfolojik testler sonucunda tespit edilen *Bacillus* sp.'ler içerisinde fitaz hidroliz oranı (zon çapı) en yüksek olan *Bacillus* suşu seçilmiştir. Seçilen *Bacillus* sp. suşu 3.2.5.'da belirtilen koşullarda, Çizelge 3.4'te görülen 6 farklı fitaz üretim ortamında 96 saat süre boyunca inkübe edilmiştir. Üreme ve enzim aktivite tayinleri 24., 48., 72. ve 96. saatlerde yapılarak bakterinin gelişme grafikleri çıkarılmış ve maksimum enzim üretiminin gerçekleştiği besiyeri belirlenmiştir.

Çizelge 3.4. Fitaz üretim ortamının tespitinde kullanılan sıvı besiyerleri Besiyeri 1 (Howson ve Davis 1983), Besiyeri 2 (TS) ve 3 (PSM) (Park 2001) Besiyeri 4 (Mittal ve ark. 2011), Besiyeri 5 ve 6 (Choi ve ark. 2001)

İçerik	Besiyeri	Besiyeri	Besiyeri	Besiyeri	Besiyeri	Besiyeri
	1	2	3	4	5	6
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
Glukoz	20	-	15	-	20	-
Na-Fitat	4	1	5	1	2	0,1
Dekstroz	-	5	-	-	-	-
Maltoz	-	-	-	-	-	10
Pepton	-	10	-	10	20	10
Beef Ekstrakt	-	-	-	-	10	5
Maya Özütü	-	5	-	-	-	-
CaCl₂.2H₂O	2	1	-	-	2	1
NH₄NO₃	5	-	5	-	-	-
(NH₄)₂SO₄	-	-	-	2	-	-
KCl	0,5	-	0,5	0,5	-	-
MgSO₄.7H₂O	0,5	1	0,5	0,5	2	-
FeSO₄.7H₂O	0,01	-	0,01	0,3	-	-
MnSO₄.7H₂O	0,01	-	0,01	0,3	-	-
ZnCl₂	-	-	-	-	-	1
Na₂HPO₄	-	-	-	-	-	0,01
pH	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0

3.2.5. Bakteri üretim koşulları

Kültür saklama ortamından (Çizelge 3.3) steril öze ile alınan bakteri kültürü, içerisinde 30 mL bakteri geliştirme besiyeri (Çizelge 3.3) bulunan 100 mL'lik erlene aşılanmış, 37°C' de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 18 saat süre ile üretilmiştir.

Bu bakterinin enzim üretim kapasitesini saptamak amacıyla 18 saatlik bakteri kültürlerinin 600nm'deki optik yoğunlukları (O.D) spektrofotometre (Beckman Coulter-DU 700) kullanılarak, bir standart elde edebilmek amacıyla, steril fizyolojik tuzlu su ile 0.3'e ayarlanmıştır. Bu şekilde ayarlanan kültür çözeltilerinden, içerisinde 150 mL maksimum enzim üretiminin belirlendiği besiyeri (Çizelge 3.4) bulunan 500 mL'lik erlenlere %1 oranında aşılanmış ve 37°C' de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 96 saat süre boyunca inkübe edilmiştir. Üreme ve enzim aktivite tayinleri

8., 24., 32., 48., 56., 72., 80. ve 96. saatlerde yapılarak bakterinin gelişme grafiği çıkarılmış ve maksimum enzim üretim zamanı saptanmıştır.

3.2.6. Bakteri üremesinin ölçülmesi

Bakteri üremesinin belirlenmesi amacıyla, besiyerinin bulanıklığı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 3.2.4 ve 3.2.5'te belirtilen yöntemle inkübasyona bırakılan besiyerlerinden, belirlenen saatlerde örnek alınarak, 600 nm dalga boyunda okunmuştur. Fitaz üretiminde kullanılan besiyeri kör olarak kullanılmıştır ve optik yoğunluk (OD) değerlerinin okunmasıyla bakteri üreme miktarı belirlenmiştir (Sarikaya 1995).

Elde edilen optik yoğunluk (OD) değişimleri, zamana karşı grafiklenerek gelişme eğrileri çıkarılmıştır.

3.2.7. Enzim aktivitesinin ölçülmesi

Fitaz aktivitesinin tayininde Choi ve ark. (2001)'nin kullandıkları yöntemden faydalanılmıştır. Bu amaçla, öncelikle kültür ortamından 10 mL alınarak 15 dakika süre ile +4 °C' de santrifüj edilerek (5000 devir/dk) bakteri hücrelerinin bulunduğu pellet kısmı ile enzim içeren sıvı kısım birbirinden ayrılmıştır.

Enzim aktivite tayininde substrat çözeltisi olarak 50 mL 0,1 M Tris-HCl (pH 7.0) tamponuna 2mM Na-Fitaz eklenmiştir. Substrat çözeltisi her aktivite tayin işleminden önce taze olarak hazırlanmıştır.

Deneylerde 1 adet kör tüp ve her bir enzim örneği için 2 adet örnek tüpü kullanılmıştır (Çizelge 3.5). Her iki örnek tüpüne 0,9' ar mL substrat çözeltisi, kör tüpüne ise 0,75 mL TCA çözeltisi ilave edilmiş ve tüpler 37°C'lik su banyosunda 5 dakika bekletilerek reaksiyon sıcaklığına getirilmiştir. Daha sonra substrat içeren tüplere 0,1 mL enzim çözeltisinden, kör tüpe ise 0,1 mL Tris-HCl (pH 7.0) tamponu ilave edilerek 37°C' de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda örnek tüplerine 0,75 mL TCA çözeltisinden eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve kör tüpüne ise 0,9 mL substrat eklenip, tüpler tüp karıştırıcısında (Vortex) karıştırılmıştır. Bu karışıma % 5,5 sülfürik asitle hazırlanan % 2,5 amonyum molibdat çözeltisi ile % 2,5 ferroz sülfat renk reaktifinden 1,5 mL ilave edilmiş ve örneklerin absorbansları köre karşı spektrofotometrede ölçülmüştür.

Çizelge 3.5. Fitaz aktivite tayini reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek Tüpü	Kontrol (Kör) Tüpü
Substrat çözeltisi	0,9 mL	-
% 5' lik TCA çözeltisi	-	0,75
37 °C' de su banyosunda 5 dakika bekletilir.		
Enzim çözeltisi	0,1 mL	-
0.1 M Tris-HCl Tamponu	-	0,1 mL
Vorteksle karıştırılır ve 37 °C' de su banyosunda 30 dakika bekletilir.		
% 5' lik TCA çözeltisi	0,75 mL	-
Substrat çözeltisi	-	0,9 mL
Vorteksle karıştırılır.		
Renk çözeltisi	1,5 mL	1,5 mL
Vorteksle karıştırılır ve 5 dakika bekletilir.		
700 nm' de absorbans ölçümü yapılır.		

Enzim aktivitesi Unit (IU) cinsinden hesaplanmış olup, Standart deney koşullarında dakikada 1 µmol sodyum fitattan inorganik fosfatın serbestlenmesini sağlayan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir. Enzim aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Anonim, 2014)

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\text{Pi}(\mu\text{M})}{t \text{ (dk)} \times V_E \text{ (mL)}}$$

Pi: Salınan fosfatın miktarı

t: Zaman

V_E: Kullanılan enzimin hacmi

3.2.8. İnorganik fosfat standart grafiği ve hazırlanışı

İnorganik fosfor miktarını saptamak için farklı konsantrasyonlarda (0-100 µM) standart KH₂PO₄ çözeltileri hazırlandı. İnorganik fosfor miktarı, 3.2.7'de tarif edildiği gibi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

3.2.9. Enzim aktivitesinin ölçümünde kullanılan solüsyonlar

3.2.9.1. 0,1 M Tris-HCl tamponunun (pH 7) hazırlanması

12,11 gr Tris tartılır ve 900 mL distile su ile seyreltilir. Çözelti 2N HCl ile pH: 7.0'a getirilir. Son hacim 1 L' ye tamamlanır.

3.2.9.2. % 5'lik TCA (Trikloroasetik asit) çözeltilisinin hazırlanması

5 gr TCA tartılır ve son hacim distile su ile 100 mL' ye tamamlanır.

3.2.9.3. Substrat çözeltilisinin hazırlanması

50 mL 0,1 M Tris HCl (pH: 7.0) çözeltilisi içerisine 2mM Na-Fitat karıştırılır. (Kim ve ark. 1998)

3.2.9.4. Renk ayıracı çözeltilisinin hazırlanması

Renk ayıracı a ve b çözeltileri ile sırasıyla 4:1 oranında hazırlanır.

a) % 5,5 Sülfürik asitte hazırlanan % 2,5 amonyum molibdat çözeltilisi

90,5 mL' lik distile suya 5,5 mL sülfürik asit ilave edilir. 2,4 g amonyum molibdat tartılır ve bu çözeltiliye ilave edilir.

b) % 2,5 Ferroz sülfat

2,5 g ferroz sülfat tartılır ve distile su ile 100 mL' ye tamamlanır. Günlük olarak hazırlanır.

3.2.9.5. KH₂PO₄ çözeltilisinin hazırlanması

0,14 gr KH₂PO₄ tartılır ve çözeltiliye 100 mL distile su ilave edilir.

3.3. Bakteri Gelişimi ve Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Faktörler

3.3.1. Karbon (C) kaynaklarının etkisi

Mikroorganizmaların üremesinde karbon kaynaklarının önemi göz önüne alınarak farklı karbon kaynakları ile çalışılmıştır. Bu amaçla Çizelge 3.4'te içeriği verilen besiyerlerinden en yüksek fitaz aktivitesinin saptandığı besiyerindeki karbon kaynağı çıkarılarak yerine aynı oranda glukoz, fruktoz, sükroz, maltoz, laktoz, gliserol, patates nişastası, buğday kepeği, mısır nişastası ve buğday nişastası karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.

Bakterilerin aşılınması ve üretimi 3.2.5'te belirtildiği gibi yapılmış ve belirlenmiş olan en iyi enzim üretim zamanına göre üreme ve fitaz aktivite tayinleri yapılmıştır.

3.3.2. Azot (N) kaynaklarının etkisi

Azot kaynaklarının üreme kapasiteleri üzerine olan etkilerinin araştırılması amacıyla çeşitli azot kaynaklarının, enzim üretimine olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla Çizelge 3.4'te içeriği verilen besiyerlerinden en yüksek fitaz aktivitesinin saptandığı besiyerindeki azot kaynağı çıkarılarak yerine aynı oranda organik azot kaynağı olarak pepton, maya özütü (yeast ekstrakt), mısır ıslatma suyu (corn steep-liquor), tripton, yağsız süt tozu (skimmed milk), ve et özütü (meat ekstrakt), inorganik azot kaynağı olarak ise NH_4NO_3 , KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 ve NH_4Cl kullanılmıştır.

Üretim işlemi 3.2.5'te belirtildiği gibi yapılmış ve belirlenmiş olan en iyi enzim üretim zamanına göre üreme ve fitaz aktivite tayinleri yapılmıştır.

3.3.3. Metal iyonlarının etkisi

Besiyerinde bulunan metal iyonlarının bakteri gelişmesi ve enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla, Çizelge 3.4'te içeriği verilen besiyerlerinden en yüksek fitaz aktivitesinin saptandığı besiyerindeki metal iyonu çıkarılarak yerine aynı oranda MgSO_4 , LiSO_4 , FeSO_4 , CaCl_2 , KCl , NaCl , MnSO_4 ve ZnSO_4 kullanılmıştır.

Üretim işlemi 3.2.5'te belirtildiği gibi yapılmış ve belirlenmiş olan en iyi enzim üretim zamanına göre üreme ve fitaz aktivite tayinleri yapılmıştır.

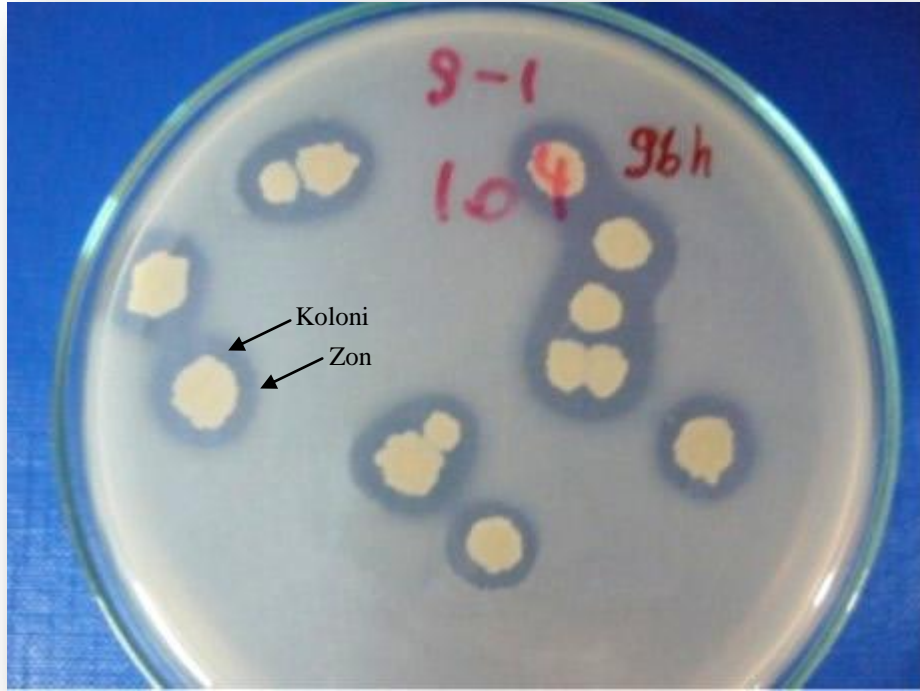
3.3.4. Maksimum fitaz üretimi için modifiye ortamın hazırlanması

En yüksek fitaz aktivitesinin saptandığı karbon, azot kaynakları ve metal iyonlarını içeren yeni bir modifiye ortam hazırlanmış ve bu ortamda enzim aktivitesi kontrol edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Fitaz Pozitif Bakterilerin Belirlenmesi

Bu çalışmada Türkiye'nin 30 farklı ilinden alınan toprak örneğinden 300 adet bakteri izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin *Bacillus* olup olmadığını belirlemek üzere biyokimyasal ve morfolojik testler yapılmış, bu testlerin sonucunda 236 adet bakterinin *Bacillus* sp. olduğu belirlenmiştir. PSM ortamında 96. saat boyunca inkübe edilen *Bacillus* sp. suşları arasında 20 tanesinde açık renkli hidrolitik zonlar görülmüştür. Bunların içerisinde 6 tanesinin zayıf açıklıkta çevresel hidrolitik zon (2-4 mm), 11 tanesinde orta açıklıkta çevresel hidrolitik zon (5-8 mm), 3 tanesinin geniş açıklıkta çevresel hidrolitik zonlu bölgelere (9-11 mm) sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bunlardan 11 mm zonu gösteren *Bacillus* sp. suşu EBD 9-1 olarak adlandırılmıştır. Fitaz pozitif özellik gösteren izolatın besiyerindeki görüntüsü Şekil 4.1' de verilmiştir.



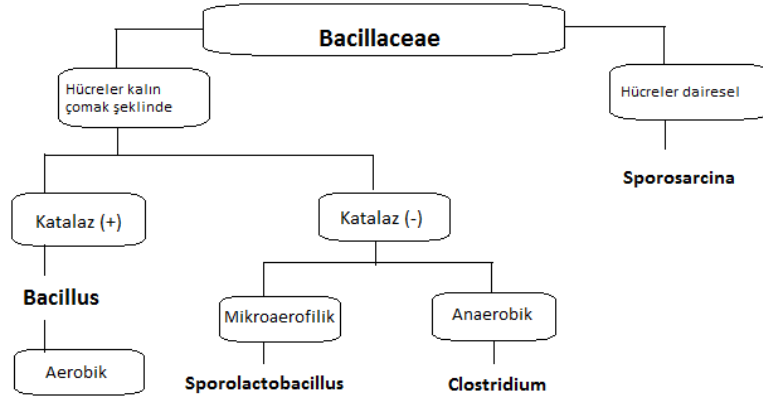
Şekil 4.1. Fitaz üreten *Bacillus* sp. EBD 9-1' in PSM ortamındaki görüntüsü

Çizelge 4.1. Fitaz pozitif bakterilerin 96. saatteki zon 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
9-1	Trabzon	7	11
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	8,2
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
28-5	Kocaeli	5	8

4.2. Biyokimyasal ve Morfolojik Testler

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



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

4.2.1. Biyokimyasal testler

4.2.1.1. Katalaz testi

Katalaz bir enzim olup çoğunlukla aerobik mikroorganizmalar tarafından oluşturulurlar. Bu enzim ortamdaki hidrojen peroksit'i (H_2O_2) su ve oksijene ayırmaktadır. 3.2.2.2' ye göre yapılan katalaz testi sonunda, katı bakteri kültürlerine H_2O_2 damlatıldığında, serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlenmesi, hidrojen peroksitin ayrışmasını dolayısıyla da katalaz varlığını gösterdiğinden tüm bakteriler katalaz (+) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Belirlenen kolonilerde serbest oksijenin kabarcıklar halinde görünümü (*Bacillus* sp. EBD 9-1)

4.2.1.2. Nişasta hidroliz testi

Bacillus türleri özellikle α -amilaz enzimi üretimi açısından çok önemlidirler ve çoğu türü nişastayı hidroliz edebilme yeteneğindedir (Priest 1977). 3.2.2.3'e göre yapılan test sonucunda, iyot varlığında nişasta, besiyerinde mavi-siyah bir renk vermiştir. Bu durum nişastayı parçalayan enzimin bulunmadığının bir göstergesi olup, eğer nişasta hidroliz edilmişse koloni etrafında açık renkli bir zon oluşumunun görülmesi pozitif bir sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.4).

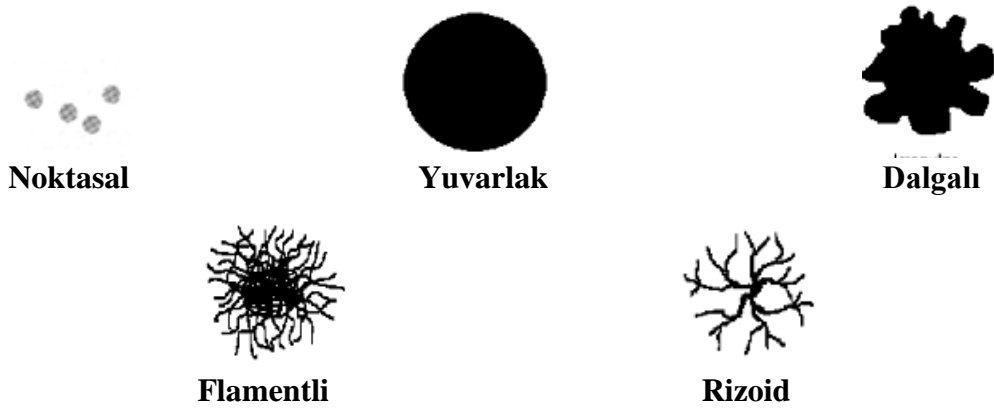


Şekil 4.4. Nişasta hidrolizi sonucunda iyotla boyanmış ve boyanmamış bölgeler (*Bacillus* sp. EBD 9-1)

4.2.2. Morfolojik testler

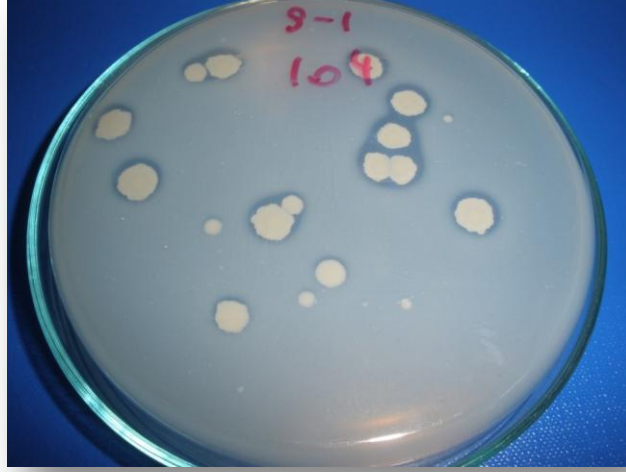
4.2.2.1. Koloni yapısı ve bakterilerin şekli

Bakteriler, farklı karakteristik koloni tiplerine sahiptirler (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Bakteriyel koloni tipleri

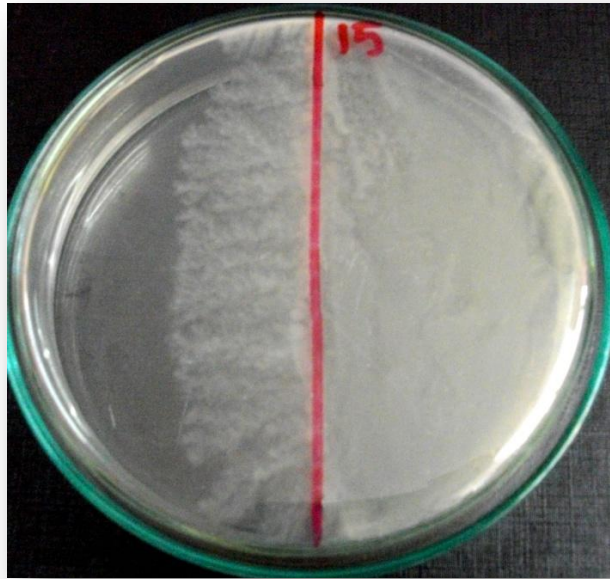
Çalışmamızda izole edilen bakterilerin noktasal, filamentli ve dalgalı koloni tipi özellik gösterdiği tespit edilmiştir, fitaz üreten *Bacillus* sp. EBD 9-1'in dalgalı koloni tipi gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. EBD 9-1 bakterisinin dalgalı koloni yapısı

4.2.2.2.Hareketlilik testi

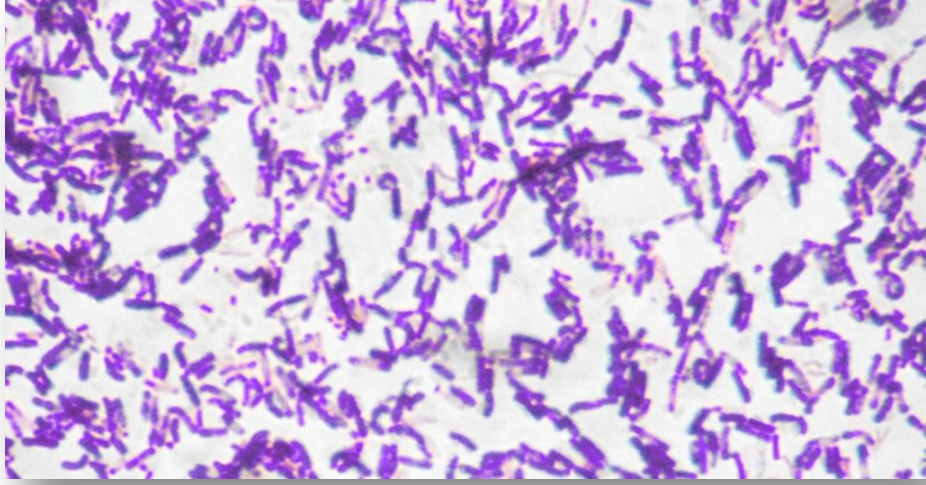
3.2.2.1'e göre yapılan hareketlilik testi sonucunda tüm bakterilerin hareketli (Şekil 4.7) olduğu belirlenmiştir (bkz. Çizelge 4.2).



Şekil 4.7. Petri kutusundaki yumuşak agarlı besiyerinde hareketlilik kontrolü (*Bacillus* sp. EBD 9-1)

4.2.2.3. Gram boyama

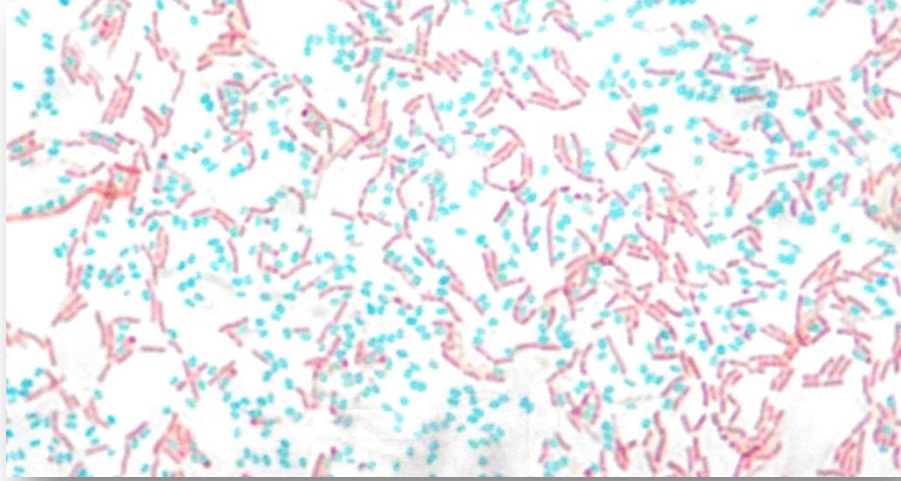
Bakterilerin tanımlanmasında önemli bir aşama olan gram boyama 3.2.2.4' e göre yapılmış olup, ilk boya olarak kullanılan kristal viyoleyi hücre içinde tutabilen bakteriler gram (+) olarak kabul edilmiş olup, denemeye alınan tüm bakteriler mor menekşe bir renk gösteren gram (+) olarak değerlendirilmişlerdir (Şekil 4.8). Mikroskopik incelemeler (Olympus CH-2) sonucunda ise bakterilerin hepsinin çubuk (basil) şeklinde olduğu görülmüştür (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. *Bacillus* sp. EBD 9-1'in ışık mikroskopunda görünümü (10X100)

4.2.2.4. Spor boyama

Spor oluşumu Bacillaceae familyasının tipik özelliğidir. Endospor oluşumu bu familyanın üyeleri olan *Bacillus* ve *Clostridium* cinsi bakterilerde görülmektedir. Denemeye alınan bakterilerde spor boyama 3.2.2.5'e göre yapılmış olup, tüm bakterilerin sporlu oldukları ve sporun hücre içindeki konumunun terminal (uç) bölgede olduğu saptanmıştır. İncelemeler Olympus CH-2 marka ışık mikroskopunda, 100X objektifte, immersiyon yağı ile yapılmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. *Bacillus* sp. EBD 9-1'in spor boyama sonrası görünümü (10X100)

Yapılan biyokimyasal ve morfolojik testler sonucunda tüm bakterilerin *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonrasında zon çapları dikkate alınarak seçilen bir adet bakteri üreme eğrileri çıkarılmak üzere denemeye alınmıştır (Çizelge 4.2).

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

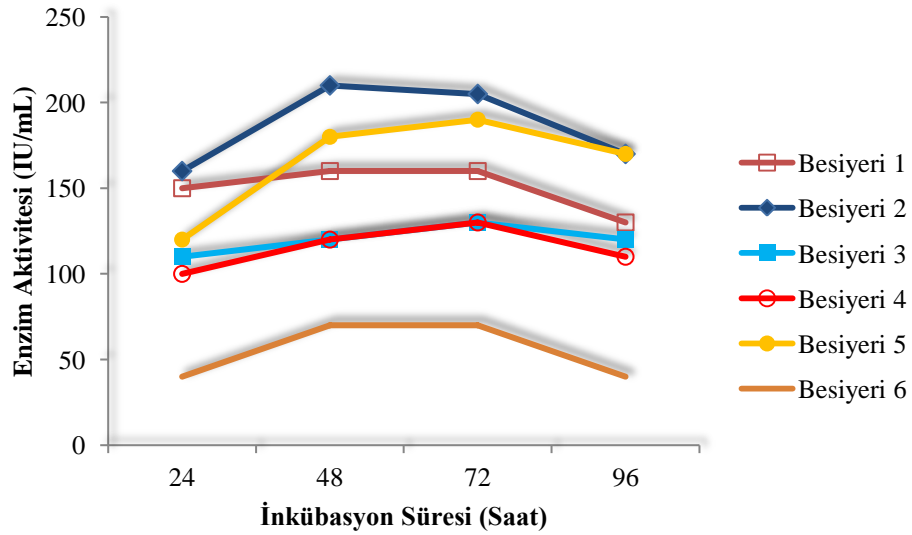
TESTLER	9-1	19-4	19-9
Koloni Şekli	Dalgalı	Dalgalı	Dalgalı
Şekil	Basil	Basil	Basil
Gram Boyama	+	+	+
Spor Boyama	+	+	+
Endospor Pozisyonu	⊥	⊥	⊥
Hareketlilik	+	+	+

4.3. Fitaz Üretim Ortamının Belirlenmesi

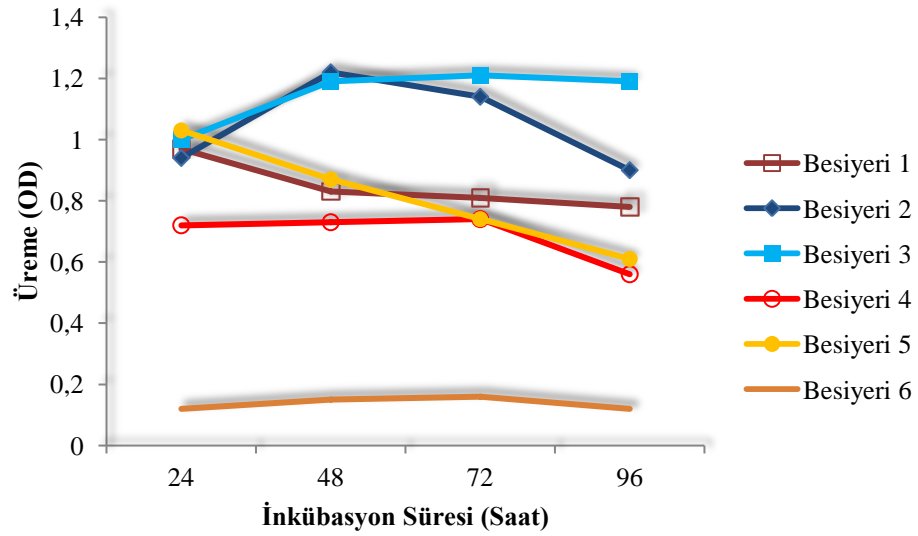
Bacillus sp.lerin fitaz enzimi üretimine teşvik edilmesi buldukları ortamdaki fitatın varlığına ve ortamdaki diğer maddelere bağlı olduğundan farklı araştırmacıların çalışmalarında kullandıkları 6 ortam (Çizelge 3.4) fitaz üretim kapasitesi açısından denemeye alınmıştır. Denemeye alınan bu 6 ortamdan 2 numaralı besiyerinde *Bacillus* sp. EBD 9-1'den 48 saat sonunda en yüksek enzim üretimi (208 U/mL) ve üreme saptanmıştır (Çizelge 4.3, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Daha sonraki çalışmalara bu besiyeri ile devam edilmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı besiyerlerinin 24-96. saatte, *Bacillus* sp. EBD 9-1'in enzim üretimi ve üremesi üzerine etkileri

Saat	Besiyeri 1		Besiyeri 2		Besiyeri 3		Besiyeri 4		Besiyeri 5		Besiyeri 6	
	IU/ mL	OD	IU/ mL	OD	IU/ mL	OD	IU/ mL	OD	IU/ mL	OD	IU/ mL	OD
24.	150 ±1,5	0,97	160 ±3	0,94	110 ±1,5	1	100 ±6,1	0,72	120 ±8	1,03	40 ±1,5	0,12
48.	160 ±3	0,83	208 ±1,5	1,22	120 ±1,5	1,19	120 ±3	0,73	180 ±4,5	0,87	70	0,15
72.	160 ±1,5	0,81	205 ±6,1	1,14	130 ±4,5	1,21	130 ±3	0,74	190 ±4,5	0,74	70 ±1,5	0,16
96.	130 ±4,5	0,78	170 ±4,5	0,9	120 ±8,5	1,19	110 ±1,5	0,56	170 ±3	0,61	40	0,12



Şekil 4.10. *Bacillus* sp. EBD 9-1'in Çizelge 3.4'te verilen besiyerlerindeki fitaz üretim kapasitelerinin karşılaştırılması

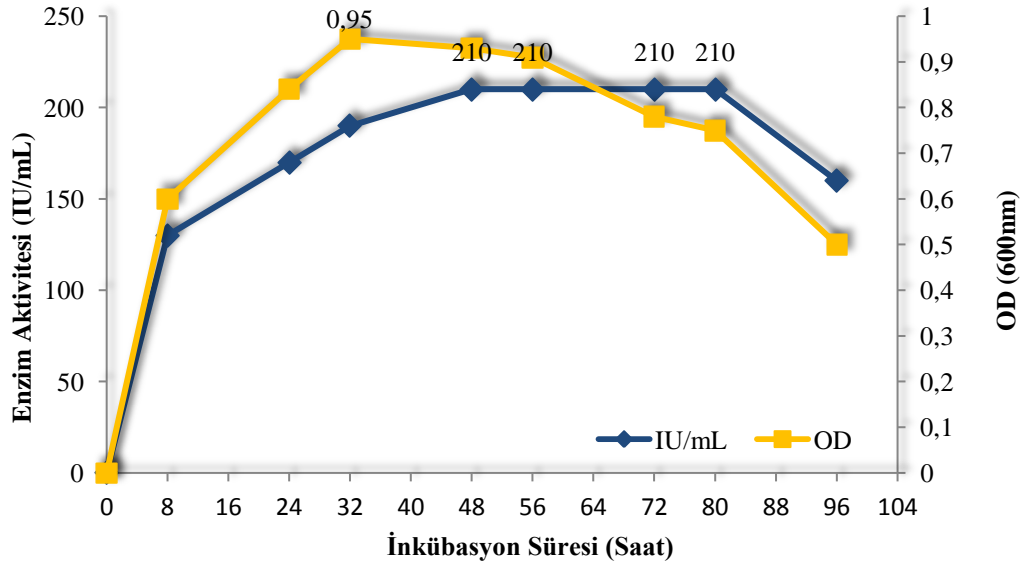


Şekil 4.11. *Bacillus* sp. EBD 9-1'in Çizelge 3.4'te verilen besiyerlerindeki üreme değerleri

Bacillus sp. EBD 9-1 suşun enzim üretim saatini belirlemek üzere bakterinin üreme eğrisi çıkarılmıştır. 8-96 saatler arası yapılan üreme sonucunda bakterinin en yüksek enzim üretim zamanı 48 saat (210 U/mL) olarak saptanırken, üreme eğrisinin zamanı geniş tutulduğundan bakterinin maksimum üreme zamanı ise 32. saat olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.12).

Çizelge 4.4. 2. Besiyerinin 8-96. saatte, *Bacillus* sp. EBD 9-1'in enzim üretimi ve üremesi üzerine etkileri

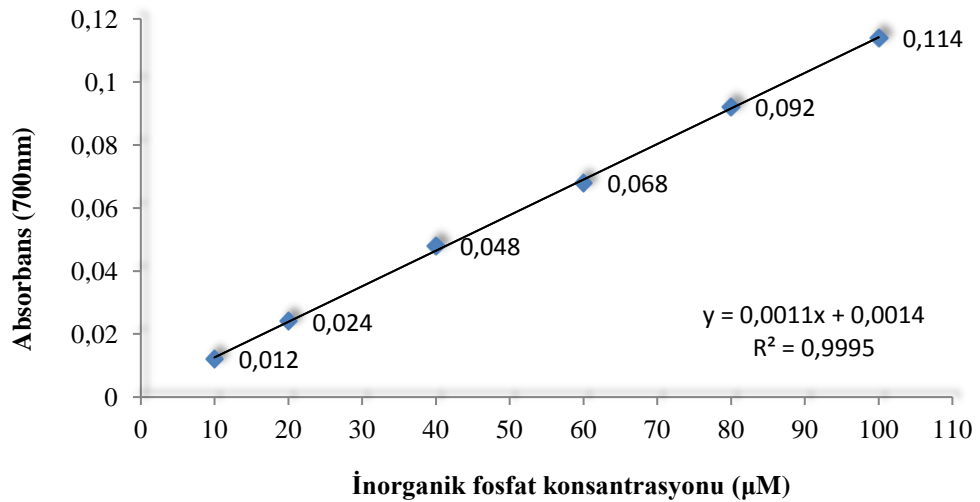
		Besiyeri 2							
Saat	8.	24.	32.	48.	56.	72.	80.	96.	
IU/mL	130±5	170±7,4	190±3,6	210±5,5	210±8,1	210±7	210±11	160±10	
OD	0,6	0,84	0,95	0,93	0,91	0,78	0,75	0,50	



Şekil 4.12. *Bacillus* sp. EBD 9-1'in Besiyeri 2 (Çizelge 3.4)'de fitaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri

4.4. İnorganik Fosfat Standart Grafiği ve Hazırlanışı

İnorganik fosfor miktarını saptamak için farklı konsantrasyonlarda (0-100 μM) standart KH_2PO_4 çözeltileri hazırlandı. İnorganik fosfor miktarı, daha önce tarif edildiği gibi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı absorbands grafiği lineer regresyon analiziyle çizilerek konsantrasyonu bilinmeyen örneğin inorganik fosfat konsantrasyonu, standart grafiğinden elde edilen doğru denkleminin formülünden hesaplandı (Şekil 4.10). Doğrunun denklemi $y = 0,0011x + 0,0014$, regresyon katsayısı $R^2 = 0,9995$ 'dir.



Şekil 4.13. İnorganik fosfat standart grafiği

4.5. Bakteri Gelişimi ve Enzim Üretimi Üzerine Etki Eden Faktörler

Bakterilerin enzim üretim kapasiteleri, buldukları ortama bağlı olduğundan, ortam şartlarının değiştirilmesi enzim üretim miktarına etki etmektedir. Bu nedenle, besiyeri 2'nin karbon (C), azot (N) ve metal iyonu kaynakları değiştirilmiş, değişen ortam şartlarının *Bacillus* sp. EBD 9-1'in fitaz üretimi üzerine olan etkileri belirlenmiştir.

Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

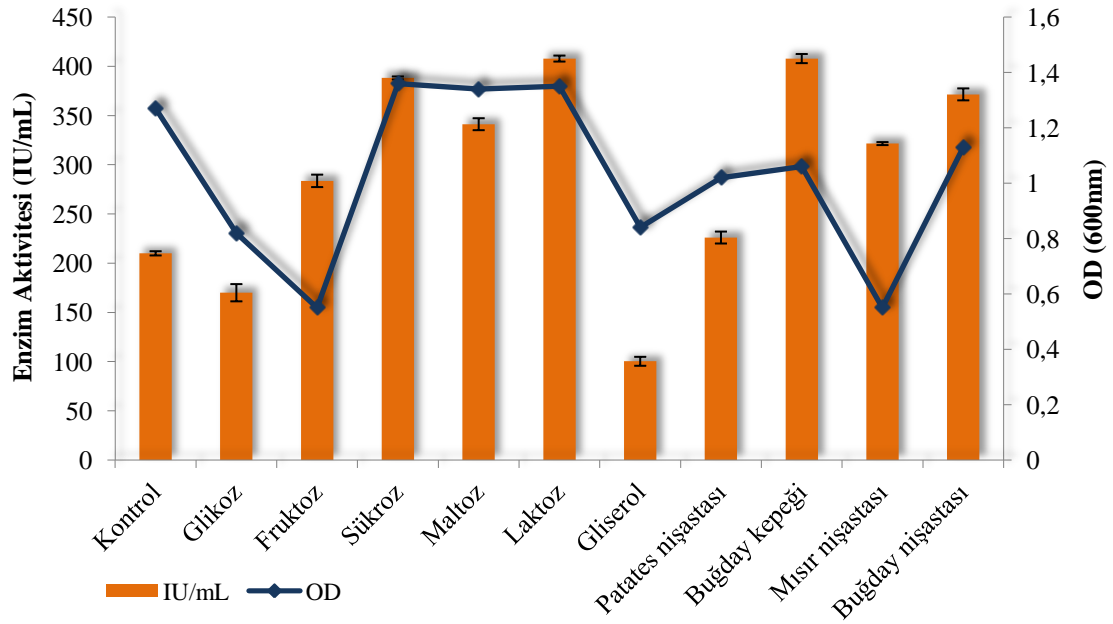
4.5.1. Karbon kaynaklarının etkisi

Üreme ortamında bulunan karbon kaynaklarının bakteri gelişmesi ve enzim üretimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla, Çizelge 3.4'te içeriği verilen besiyerindeki karbon kaynağı (Dekstroz) çıkarılarak yerine aynı oranda Glukoz, Fruktoz, Sükroz, Maltoz, Laktoz, Gliserol, Patates nişastası, Buğday kepeği, Mısır nişastası ve Buğday nişastası içeren besiyerinde bakteri 48 saat boyunca inkübe edilmiş ve 48. saatte alınan örneklerde fitaz aktivitesi ve üreme değeri tayinleri yapılmıştır (Çizelge 4.5, Şekil 4.14).

Çizelge 4.5 ve Şekil 4.14'nin incelenmesinden de anlaşılacağı üzere 48. saatte *Bacillus* sp. EBD 9-1'in enzim üretimi açısından karbon kaynağı tercih sırası sırasıyla Laktoz = Buğday kepeği > Sükroz > Buğday nişastası > Maltoz > Mısır nişastası > Fruktoz > Patates nişastası > Kontrol (Dekstroz) > Glukoz > Gliserol olarak belirlenmiştir. Maksimum bakteri üremesinin sırasıyla Laktoz = Sükroz = Maltoz > Kontrol (Dekstroz) > Buğday nişastası > Buğday kepeği > Patates nişastası > Gliserol = Glukoz > Mısır nişastası = Fruktoz varlığında olduğu görülmektedir. Laktozlu besiyerinde ve Buğday kepeği bulunan besiyerinde fitaz aktivitelerinde kontrole göre %94'lük artış gözlenirken, gliserol ve glukozlu ortamların aktivitelerinde sırasıyla %52 ve %8'lik kayıplar gözlenmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı karbon kaynaklarının 48. saatte, *Bacillus* sp. EBD 9-1'in enzim üretimi ve üreme üzerine etkileri

Karbon Kaynakları	OD ₆₀₀	IU/mL	Bağlı Aktivite (%)
Kontrol (Dekstroz)	1,27	210 ± 2,1	100
Glukoz	0,82	170 ± 8,7	81
Fruktoz	0,55	284 ± 6,3	135
Sükroz	1,36	388 ± 1,5	185
Maltoz	1,34	341 ± 6,1	162
Laktoz	1,35	408 ± 3	194
Gliserol	0,84	100 ± 4,5	48
Patates Nişastası	1,02	226 ± 6,1	108
Buğday Kepeği	1,06	408 ± 4,6	194
Mısır Nişastası	0,55	322 ± 1,5	153
Buğday Nişastası	1,13	372 ± 6,1	177



Şekil 4.14. Farklı karbon kaynaklarının 48. saatte, *Bacillus* sp. EBD 9-1'in enzim aktivitesi üzerine etkileri

4.5.2. Azot kaynaklarının etkisi

Azot kaynaklarının bakteri üremesi ve enzim üzerine etkilerini belirlemek amacıyla kontrol ortamındaki pepton ve maya özütü yerine sırasıyla mısır ıslatma suyu (corn step-liquor), tripton, yağsız süt tozu, pepton, maya özütü ve et özütü; inorganik azot kaynağı olarak ise NH_4NO_3 , KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 ve NH_4Cl kullanılmıştır. Farklı

azot kaynakları içeren besiyerlerinden 48. saatte alınan örneklerde üreme değerleri ve enzim aktivite tayinleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar grafik ve çizelge olarak ayrı ayrı verilmiş olup, buralarda da görülebileceği gibi en yüksek enzim aktivitesi organik azot kaynaklarından 'et özütü' varlığında elde edilmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.15).

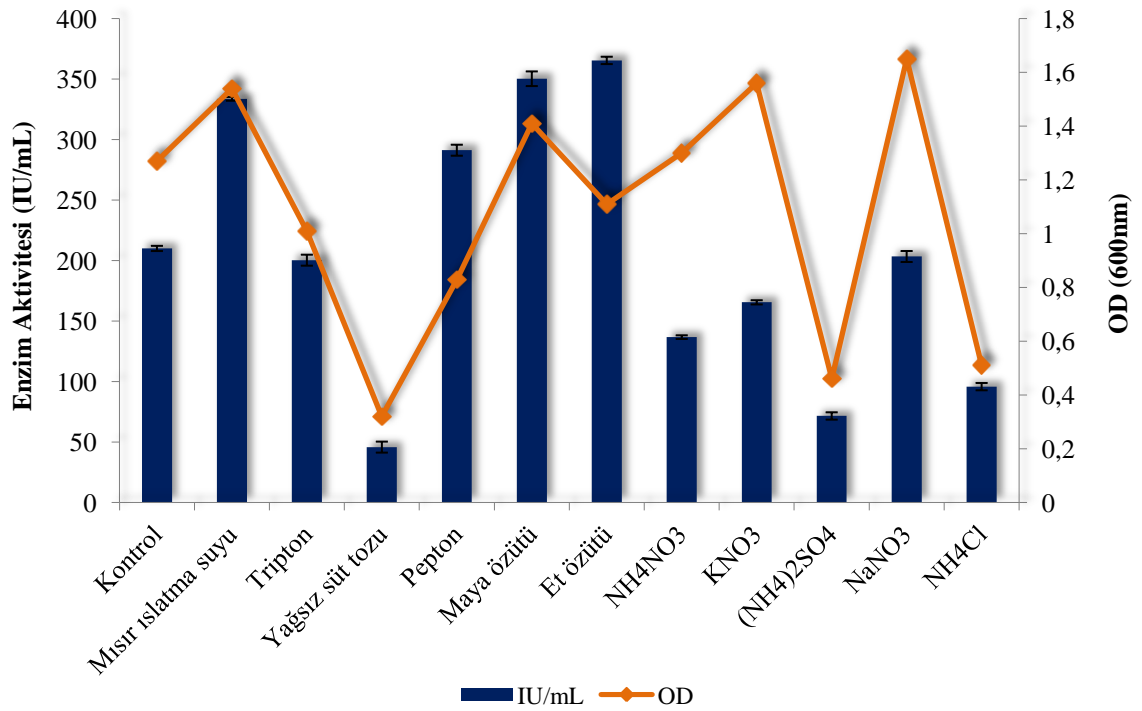
Bacillus sp. EBD 9-1'in enzim üretimi açısından organik azot kaynağını sırası ile et özütü > Maya özütü > Mısır ıslatma suyu (Corn step-liquor) > Pepton > Kontrol (Pepton ve Maya özütü) > Tripton > Yağsız süt tozu şeklinde tercih ettiği görülmüştür. Belirtilen tercih sıraları incelendiğinde, kullanılan azot kaynakları içerisinde et özütü (365 IU/mL) kontrol (210 IU/mL)'e göre %74'lük bir verim artışı sağladığı saptanmıştır. Yağsız süt tozu (46 IU/mL) varlığında ise kontrole göre enzim aktivitesinde %78'lik bir düşüş olduğu bulunmuştur.

İnorganik azot kaynaklarının sırasıyla NaNO_3 > KNO_3 > NH_4NO_3 > NH_4Cl > $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ şeklinde tercih edildiği görülmüştür. KNO_3 (165 IU/mL) ve NaNO_3 (203 IU/mL) varlığında ise kontrole yakın aktiviteler görülürken diğer inorganik azot kaynaklarının aktivitelerinde önemli düşüşler (%35-66 arasında) saptanmıştır. İnorganik azot kaynaklarının *Bacillus* sp. EBD 9-1'den elde edilen fitaz enzimi üretimi üzerine pozitif bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Bakteri üremesi üzerine organik azot kaynaklarının etkisi incelendiğinde tercihin farklı şekilde sıralandığı görülmektedir. Buna göre; Mısır ıslatma suyu (Corn step-liquor) > Maya özütü > Kontrol (Pepton ve Maya özütü) > Et özütü > Tripton > Pepton > Yağsız süt tozu olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.15). İnorganik azot kaynaklarının etkisi incelendiğinde ise, NaNO_3 > KNO_3 > NH_4NO_3 > NH_4Cl > $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ şeklinde bir sıralama gerçekleşmektedir. İlk üç sıradaki inorganik azot kaynaklarında kontrole yakın üreme gözlenirken NH_4Cl (0,54) ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,46)'ta üremenin oldukça düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca inorganik azot kaynaklarında üremenin enzim aktivitesiyle paralel şekilde değiştiği gözlenmiştir.

Çizelge 4.6. Organik ve inorganik azot kaynaklarının 48. saatte *Bacillus* sp. EBD 9-1'in fitaz aktivitesi ve üreme miktarı üzerine etkileri

Azot Kaynakları	OD ₆₀₀	IU/mL	Bağlı Aktivite (%)
Kontrol	1,27	210 ± 2,1	100
Mısır Islatma Suyu	1,54	334 ± 1,5	159
Tripton	1,01	200 ± 4,5	95
Yağsız Süt Tozu	0,32	46 ± 4,5	22
Pepton	0,83	291 ± 4,5	138
Maya Özütü	1,41	350 ± 6,1	167
Et Özütü	1,11	365 ± 3	174
NH₄NO₃	1,3	137 ± 1,5	65
KNO₃	1,56	165 ± 1,7	78
(NH₄)₂SO₄	0,46	72 ± 3	34
NaNO₃	1,65	203 ± 4,5	97
NH₄Cl	0,51	96 ± 3	46



Şekil 4.15. Organik ve inorganik azot kaynaklarının 48. saatte *Bacillus* sp. EBD 9-1'in fitaz üretim kapasitesi üzerine etkileri

4.5.3. Metal kaynaklarının etkisi

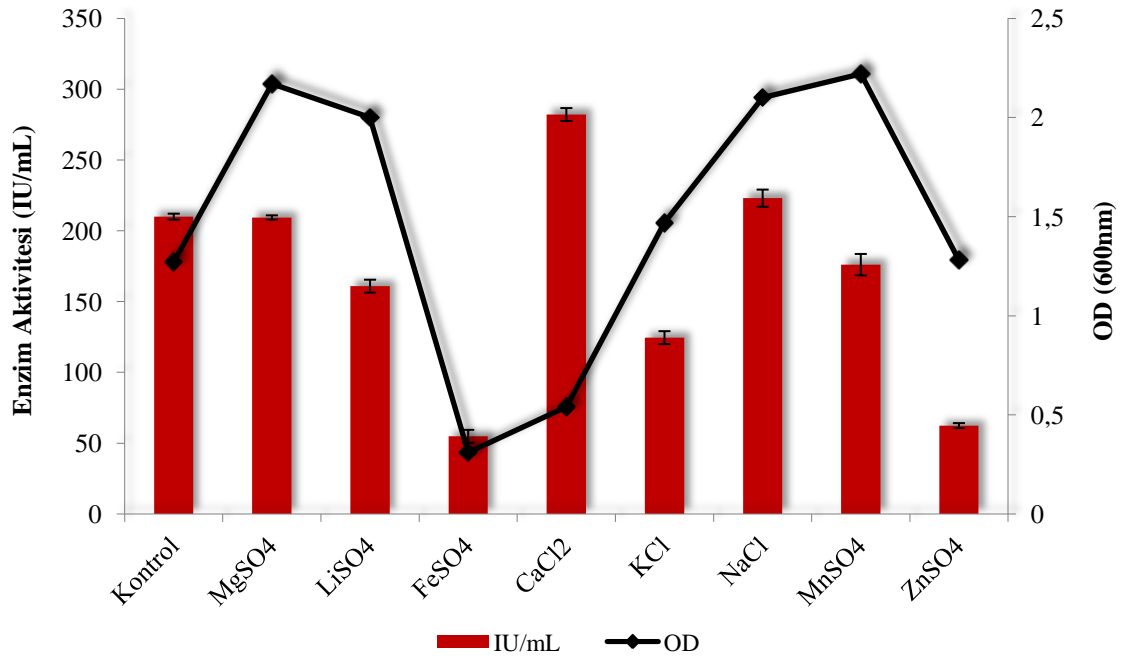
Metal iyonlarının bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine etkisini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda kontrol ortamındaki MgSO₄-CaCl₂ yerine sırasıyla MgSO₄, LiSO₄, FeSO₄, CaCl₂, KCl, NaCl, MnSO₄ ve ZnSO₄ kullanılmıştır. Farklı metal kaynakları içeren besiyerlerinden 48. saatte alınan örneklerde üreme değerleri ve enzim aktivite tayinleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar grafik ve çizelge olarak ayrı ayrı verilmiş olup, buralarda da görülebileceği gibi en yüksek enzim aktivitesi CaCl₂ varlığında elde edilmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.16).

Bacillus sp. EBD 9-1'in enzim üretiminde metal kaynağını sırası ile CaCl₂ > NaCl > Kontrol (MgSO₄ - CaCl₂) = MgSO₄ > MnSO₄ > LiSO₄ > KCl > ZnSO₄ > FeSO₄ şeklinde tercih ettiği görülmüştür. Belirtilen tercih sıraları incelendiğinde, kullanılan metal kaynakları içerisinde CaCl₂ (282 IU/mL)'nin kontrol (210 IU/mL)'e göre %34'lük, NaCl (223 IU/mL)'ün %6'lık gibi çok az bir verim artışı sağladığı saptanmıştır. MgSO₄'te kontrolle aynı aktiviteyi gösterirken diğer tüm metal kaynaklarının enzim aktivitesinde düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir. Özellikle ZnSO₄ ve FeSO₄'ün enzim üretimini oldukça düşürdüğü (%70-74) gözlenmektedir.

Bakteri üremesi üzerine metal kaynaklarının etkisi incelendiğinde sıralamanın farklı şekilde değiştiği görülmektedir. Buna göre; MnSO₄ > MgSO₄ > NaCl = LiSO₄ > KCl > Kontrol (MgSO₄ - CaCl₂) = ZnSO₄ > CaCl₂ > FeSO₄ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.16). Özellikle CaCl₂ (0,54) ve FeSO₄ (0,31)'te üremenin kontrole (1,27) göre çok azaldığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.7. Metal kaynaklarının 48. saatte *Bacillus* sp. EBD 9-1'in fitaz aktivitesi ve üreme miktarı üzerine etkileri

Metal Kaynakları	OD ₆₀₀	IU/mL	Bağlı Aktivite (%)
Kontrol	1,27	210 ± 2,1	100
MgSO₄	2,17	209 ± 1,5	100
LiSO₄	2	161 ± 4,5	77
FeSO₄	0,31	55 ± 4,5	26
CaCl₂	0,54	282 ± 4,5	134
KCl	1,47	125 ± 4,5	60
NaCl	2,1	223 ± 6,1	106
MnSO₄	2,22	176 ± 7,6	84
ZnSO₄	1,28	62 ± 1,7	30



Şekil 4.16. Organik ve inorganik azot kaynaklarının 48. saatte *Bacillus* sp. EBD 9-1'in fitaz üretim kapasitesi üzerine etkileri

4.5.4. Maksimum fitaz üretimi için modifiye ortamın oluşturulması

En yüksek fitaz üretiminin elde edildiği karbon ve azot kaynağı ile metal iyonları bir araya getirilerek besiyeri 2 (kontrol ortam) modifiye edilmiş ve bu ortamda enzim üretiminin artırılması yoluna gidilmiştir. Karbon kaynağı olarak Laktoz, azot kaynağı olarak et özütü ve metal iyonu kaynaklarından da CaCl₂ ve NaCl kullanılarak modifiye ortam oluşturulmuştur (Çizelge 4.8).

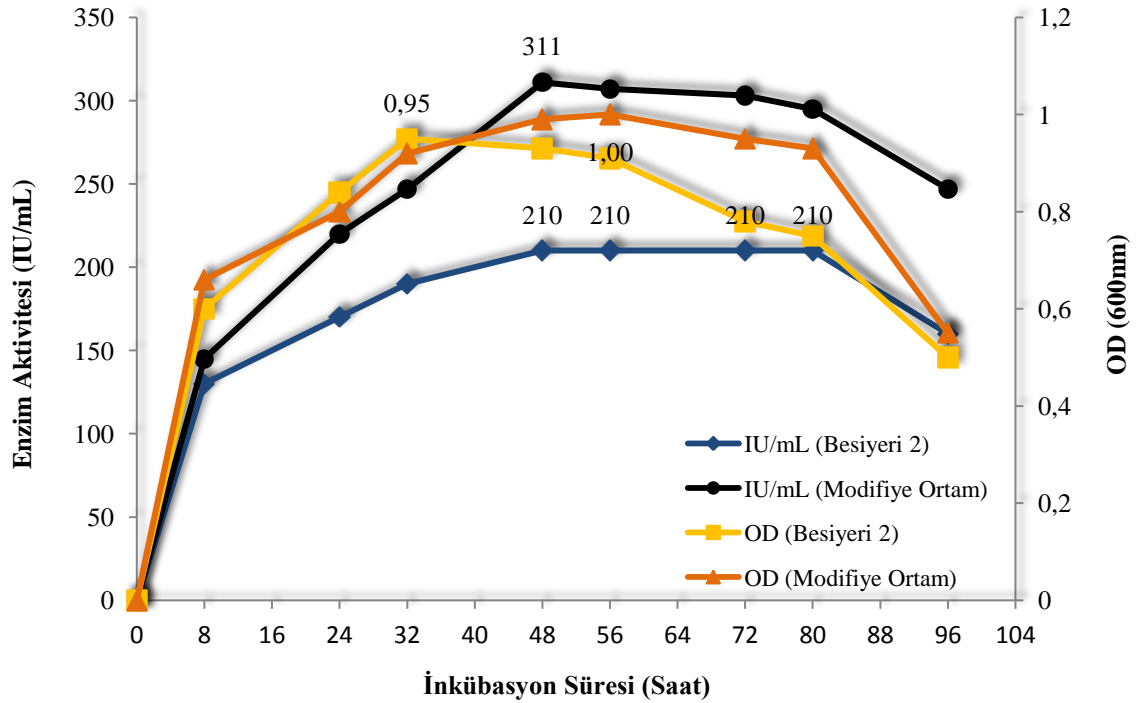
Çizelge 4.8. Kontrol olarak kullanılan besiyeri ve yeni modifiye besiyerinin içerikleri

İçerik	Besiyeri 2 (g/L)	Modifiye Ortam (g/L)
Na-Fitat	1	1
Dekstroz	5	-
Laktoz	-	5
Pepton	10	-
Maya Özütü	5	-
Et Özütü	-	7,5
MgSO₄.7H₂O	1	-
CaCl₂	1	1
NaCl	-	1
pH	7.0	7.0

Çizelge 4.8’da görüldüğü gibi modifiye edilen ortamda kontrol (Besiyeri 2)’e göre yüksek verimde fitaz üretimi gerçekleştirilmiş olup, 48. Saatte aktivitede %48 oranında artış sağlanmıştır (Çizelge 4.9, Şekil 4.17). *Bacillus* sp. EBD 9-1’in maksimum enzim üretimine (311 IU/mL) 48. saatte ulaştığı, üremenin ise 56. saatte gözlemlendiği saptanmıştır (Çizelge 4.9, Şekil 4.17).

Çizelge 4.9. Modifiye ortamdaki fitaz aktivitesinin ve bakteri üremesinin Besiyeri 2 ile karşılaştırılması

Saat	Besiyeri 2			Modifiye Ortam		
	OD ₆₀₀	IU/mL	B.Akt (%)	OD ₆₀₀	IU/mL	B.Akt (%)
8.	0,6	130 ± 5	62	0,66	145 ± 3,3	69
24.	0,84	170 ± 7,4	81	0,8	220 ± 6,4	105
32.	0,95	190 ± 3,6	90	0,92	247 ± 4	118
48.	0,93	210 ± 5,5	100	0,98	311 ± 7,5	148
56.	0,91	210 ± 8	100	1,02	307 ± 6,2	146
72.	0,78	210 ± 7	100	0,85	303 ± 8	144
80.	0,75	210 ± 11	100	0,83	295 ± 12	140
96.	0,50	160 ± 10	76	0,55	247 ± 8,7	118



Şekil 4.17. Besiyeri 2 ve Modifiye ortamda *Bacillus* sp. EBD 9-1’in zamana karşı enzim aktivitelerinin ve üreme değerlerinin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Endüstriyel alanda kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kökenli olmakla birlikte ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan izole edilmektedirler. Bunun nedeni, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve daha ucuz olmaları, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilmesi gibi avantajlara sahip olmasıdır. Mikroorganizmaların avantajları yanında endüstride faydalı olan ve ticari olarak kullanılan enzimlerin de bazı avantajlara sahip olması gerekmektedir. Buna göre bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilmesi için işlem maliyeti bakımından ucuz olması, fiziksel ve kimyasal koşullara bağlı olmadan aktivitesini en yüksek düzeyde koruması ve mümkün olan en uzun süreyle sürdürmesi, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olması, alerjik ya da toksik etkiye sahip olmaması, yani güvenilir olması gerekir (Wiseman 1987, Sarıkaya 1995, Horikoshi 1996).

Mikrobiyal yolla enzim üretiminin ilk aşaması uygun mikroorganizmanın seçimidir. Kültür ortamı ve fermantasyon koşulları da enzim üretimini etkileyen önemli parametrelerdir. Ortam içeriğinin optimize edilmesi amacıyla farklı kaynaklı karbon, azot ve metal iyon kaynakları kullanılmaktadır (Lan 2002, Gulati 2007b). Enzim üretiminde mikroorganizmaların yüksek bir paya sahip olması nedeni ile üretimi artırmak için üretim ortamının modifiye edilmesi kadar modifiye edilmiş mikroorganizmaların kullanılması yoluna da gidilmektedir.

Bugüne kadar tanımlanan 3000 değişik enzimin çoğunun endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmasına karşın, bu enzimler talebi karşılayamamaktadır. Bu noktada esas sorun enzimlerin çoğunun endüstriyel reaksiyon koşullarına dayanıklı olmamasıdır. Bu yüzden, yeni enzim kaynaklarının ortaya çıkartılması amacıyla mikroorganizmaların karakterizasyonu ve tanımlanması bilim insanlarının ve endüstrinin yoğun ilgisini çekmektedir. Enzimler ve diğer mikrobiyal ürünlerin ortaya çıkarılması için öncelikle doğadan mikroorganizmaların izole edilmesi ve etkin yöntemlerle taranması gerekmektedir. Yapılan eleme çalışmaları sonucunda bulunacak olan yeni gen kaynakları yeni endüstriyel mikroorganizmaların ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Ayrıca doğal gen havuzlarının korunması, incelenmesi ve sınıflandırılmasının önemi de ortaya çıkmaktadır.

Endüstriyel amaçlı enzim üretimlerinde kullanılacak olan mikroorganizmalar ya doğadan izolasyon yoluyla elde edilmekte ya da enzim verimi potent olan mikroorganizmalardan rekombinant DNA teknolojisi ve mutasyon teknikleri ile arttırılma yollarına gidilmektedir (Uhling, 1998) . Doğadan yeni verimli kaynakların bulunması ile yeni bakteri suşları açığa çıkarılmakta ve bilim dünyasına kazandırılmaktadır. Ülkemizde genellikle var olan potent mikroorganizmalar ile çalışılmaktadır. Ulusal kaynaklarımız kullanılarak doğadan elde edilecek yeni potent *Bacillus* sp. suşlarının ortaya çıkarılması konusunda yeterince çalışmalar yapılmamıştır.

Dünyada olduğu gibi, Türkiye’de de enzim kullanımı her geçen gün artmaktadır. Bu proje kapsamında araştırılacak fitaz enzimi, yem endüstrisi tarafından kullanılan ve her geçen gün kullanım oranı artan bir enzimdir.

Enzimler, endüstride hemen her alanda kullanılabilen ve bu alanların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle birçok bilim adamı doğal kaynaklardan bakteri izolasyonuna gitmekte, böylelikle yeni türlerin ortaya çıkması sağlanmaktadır. Fitaz enzimi, dünya çapında kullanım alanı açısından giderek yaygınlaşan ve büyüyen bir pazar payına sahip olup, genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Belirli bir mikroorganizma tipi, aynı enzimi farklı ortamlarda farklı oranlarda üretebilmektedir. Bu nedenle, enzim üretim ortamı değiştirilerek, enzim üretim kapasitesinin arttırılması yoluna gidilmesi, yüksek miktarda enzim üretimi için alternatif yollardan biridir (Uhling, 1998).

Son yıllarda endüstriyel öneminden dolayı hem bilim adamları, hem de girişimcilerin ilgisini çektiği için çalışmalarımızda fitaz enzimi üretimi amacıyla *Bacillus* suşları izole edilerek, bunlardan en iyi sonucu veren suş kullanılmıştır. Bu amaçla Türkiye’nin çeşitli illerinin topraklardan izole edilen *Bacillus* suşlarının fitaz enzim aktivitesi analizleri yapılmıştır.

Türkiye topraklarınının 30 farklı şehirden toplam 300 bakteri izole edilerek bakterilerin *Bacillus* olup olmadığını tayin etmek amacı ile Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology’e (Buchanan ve Gibbons 1974) göre uygulanan biyokimyasal ve morfolojik testler (Çizelge 4.2) ile bu mikroorganizmaların 236 tanesinin *Bacillus* sp. suşu olduğu tayin edilmiştir. Bu suşlardan 20 tanesinin PSM besiyerinde (Çizelge 4.2)

fitaz pozitif olduğu belirlenmiştir. Fitaz pozitif *Bacillus* sp. suşları cetvel yardımıyla ölçülerek (Çizelge 4.1) en geniş zonu veren suş *Bacillus* sp. EBD 9-1 olarak adlandırılmış ve fitaz üretim kapasiteleri farklı ortamlarda araştırılmıştır.

Doğadan yeni fitaz pozitif mikroorganizmaların izolasyonu birçok araştırmacı tarafından kendi doğal kaynakları kullanılarak araştırılmıştır. Bunlardan Sreeramulu ve ark. (1996), *Lactobacillus amylovorus*'tan, Yoon ve ark. (1996) *Enterobacter* sp. 4'ten, In ve ark. (2004) *Pseudomonas fragi* Y9451 suşundan, Casey ve Walsh (2004) *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959 suşundan, Soni ve Khire (2007) *Aspergillus niger* NCIM 563 suşundan, Anastasio ve ark. (2010) *Enterococcus faecium* A86 ve *Lactobacillus plantarum* H5 suşundan ekstraselüler fitaz enzimi üretimini araştırmışlardır.

Yaptığımız izolasyon çalışmaları sonucunda en geniş zon gösteren *Bacillus* sp. EBD 9-1'in maksimum fitaz ürettiği ortamı belirlemek amacı ile Çizelge 3.4'te belirtilen 6 farklı içerikli sıvı ortamlarda 24-96 saat arasında yapılan takip sonucunda Besiyeri 2'nin diğerine göre daha verimli bir enzim üretim ortamı olduğu saptanmıştır. Bu besiyerinde bakterinin üreme eğrisi çıkarılmış ve maksimum enzim aktivitesi 48. saatte 210 U/mL olarak saptanırken, maksimum bakteri üremesinin de 32. saatte O.D 0,95 olduğu gözlenmiştir.

En iyi enzim üretim ortamı olarak belirlediğimiz Besiyeri 2'de, bakterinin üreme zaman aralığı geniş tutulmuş ve *Bacillus* sp. EBD 9-1'in maksimum enzim üretim zamanı ve bakterinin üremesini belirlemek amacı ile 8., 24., 32., 48., 56., 72., 80. ve 96. saatlerde enzim aktivite ve O.D. tayinleri yapılmıştır. Yapılan çalışmalar *Bacillus* sp. EBD 9-1' in üreme grafiği incelendiğinde maksimum enzim üretiminin durağan fazın ortasında olduğu ve bu fazın sonuna kadar aynı aktiviteyi koruduğu saptanmıştır. Bakterinin maksimum enzim üretiminin 48. saatte 210 U/mL olarak gerçekleştiği ve bu aktivitenin 80. saate kadar devam ettiği gözlenmiştir. En yüksek üreme O.D'si ise 32. saatte 0,95 olarak belirlenmiştir. Üremenin durağan fazında maksimum enzim üretimi elde edilmiştir. Enzim üretiminin bakteri üremesi (OD) ile paralelik göstermediği belirlenmiştir.

Dechavez ve ark. (2011), *B. megaterium* ile fitaz üretimini 96 saatlik inkübasyon sonrası saptamışlardır. Sreedevi ve Reddy (2012), izole ettikleri bir *Bacillus* sp.'nin 72 saat üretimi sonucu maksimum fitaz verimi sağlamışlardır.

Sreeramulu ve ark. (1996), *Lactobacillus amylovorus* B4552 suşuna ait ekstraselüler fitaz aktivitesinin 125-146 U/ml aralığında olduğunu belirlemişlerdir. Raghavendra ve Halami (2009), *Pediococcus pentosaceus* CFR R38 ve CFR R35 suşlarına ait intraselüler fitaz aktivitesinin sırasıyla 213 U/ml, 89 U/ml olduğunu saptamışlardır. Anastasio ve ark. (2010), *Enterococcus faecium* A86 suşunun ekstraselüler fitaz aktivitesini 0,74 U/mL, *Lactobacillus plantarum* H5 ekstraselüler fitaz aktivitesini ise 0,71 U/mL olarak bulmuşlardır. Fu ve ark. (2011) 12 izolat elde etmişler ve bu izolatlardan *B.licheniformis* ZJ-6 suşundan en yüksek fitaz aktivitesini 0,1511 U/mL olarak saptamışlardır. Lata ve ark. (2013) *Aspergillus heteromorphus* MTCC 10685 suşundan logaritmik fazın sonu olan 120 saatte maksimum fitaz aktivitesini (17,88 U/mL) elde etmişlerdir. Singh ve ark. (2013) yeni izole ettikleri *Bacillus subtilis* DR6 suşundan maksimum fitaz üretimini logaritmik fazın sonu olan 72. saatte 378 U/mL olarak elde etmişlerdir.

Priest (1977), maksimum enzim üretiminin logaritmik üreme fazının sonlarına doğru olduğunu ve artışın bir süre sonra durma fazında da devam ettiğini belirtmişse de, kendi yaptığımız ve diğer araştırmacıların çalışma sonuçları kıyaslandığında bunun her zaman geçerli olmadığını göstermektedir.

Üretim ortamı içeriği fitaz üretimini arttırıcı bir etkiye sahiptir (Gulati,2007). Bu amaçla izole ettiğimiz *Bacillus* sp. EBD 9-1 bakterisinin fitaz üretim kapasitesini arttırmak için üretim ortamında farklı karbon, azot ve metal iyonları kaynakları denenmiş ve elde edilen sonuçlara göre yeni bir modifiye ortam oluşturulmuştur. Bu amaçla yapılan çalışmada laktoz veya buğday kepeği bulunan ortamlarda, diğer karbon kaynaklarının kullanıldığı ortamlara göre fitaz üretiminde en iyi karbon kaynağı oldukları ve % 94'lük bir verim artışı sağlandığı belirlenmiştir. Laktozu ve buğday kepeğini % 85 ile sükroz, % 77 ile buğday nişastası takip etmiştir. Karbon kaynağı olarak glukoz bulunan ortamda % 19'lük bir aktivite kaybı gözlenirken en düşük aktivite % 52'lik bir aktivite kaybı ile gliserollü ortamda gözlenmiştir.

Çeşitli araştırmacılar en iyi enzim üretimi için karbon kaynaklarını incelemişler ve bu araştırmalar neticesinde birbirinden farklı sonuçlara ulaşmışlardır. Fakat *Bacillus* sp. suşlarında yapılan bazı çalışmalarda, en iyi fitaz üretiminin gözlemlendiği karbon kaynakları içerisinde buğday kepeği ve sükrozun ön plana çıktığı görülmüştür (Idriss 2002, Gulati 2007a). *B. laevolacticus*'ta ise bu maddelerin fitaz üretimine katkısının oldukça az olduğu bildirilmiştir. Bunun yerine fitaz üretimine fruktoz maltoz ve sükrozun daha etkili olduğu belirtilmiştir (Gulati 2007a). Kim (1997), *B. amyloliquefaciens* üzerinde yaptığı çalışmalarda fitaz enziminin glukoz, fruktoz, sükroz ve maltoz tarafından uyarılmadığını gözlemlemiştir. Yapılan diğer çalışmalarda ise yeni izolat *Bacillus subtilis* BPTK4 (Shamna 2012), *Bacillus subtilis* (Kerovuo 1998), *Lactobacillus amylovorus* B4552 (Sreeramulu ve ark. 1996)'de en iyi fitaz üretiminin glukozlu ortamda gerçekleştiği bildirilmiştir. Sighn ve ark. (2013) *B. subtilis* DR6 türünün optimum fitaz aktivitesinin % 0,75 glukoz + % 0,75 sükroz varlığında gerçekleştiğini açıklamışlardır. Çeşitli monosakkarit ve disakkarit karbon kaynakları ortamlara teker teker ilave edilerek analiz edilmiş ve maksimum enzim üretimi sükroz varlığında (0,106 U/mL) bulunmuştur. Aynı çalışmada sükroz ve bezelye unu karışımıyla oluşturulan ortamda ise fitaz aktivitesinin 0,35 U/mL'ye yükseldiği bildirilmiştir (Gulati 2007a).

Bu sonuçlardan da anlaşılacağı üzere karbon kaynaklarının fitaz üretimine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda kullanılan mikroorganizma çeşidi ve karbon kaynağının, maksimum enzim üretimine büyük etkileri olduğu görülmektedir. Ayrıca ortamdaki diğer bileşenlerin, karbon kaynakları ile etkileşimlerinin maksimum fitaz üretimi üzerine etkili olduğu sonucuna ulaşabilmektedir. Bu da bize mikroorganizmaların kullandığı metabolik yolların farklı olduğunu göstermektedir.

Azot kaynaklarının bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine olan etkilerini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda organik azot kaynakları içerisinde en yüksek verim %74 ile et özütü ile sağlanırken en düşük aktivite %88'lik kayıp ile yağsız süt tozunda görülmüştür. Tripton bulunan ortamda ise %5'lik bir aktivite kaybı belirlenmiştir. İnorganik azot kaynaklarının varlığında ise, fitaz üretiminin organik azot kaynaklarına göre oldukça düştüğü gözlenmiştir. İnorganik azot kaynakları içerisinde en yüksek

aktivite NaNO_3 'te %3 lük bir aktivite kaybı ile gözlenmiştir. Organik azot kaynaklarının, inorganik azot kaynaklarına göre daha etkili olduğu ifade edilebilir.

Bacillus subtilis KHU-10 için en iyi azot kaynaklarının pepton ve beef ekstrakt olduğu bildirilmiştir (Choi 1999). Çeşitli araştırmalarda ise *Bacillus* sp. suşları için en iyi azot kaynağının maya özütü olduğu açıklanmıştır (Fu 2011, Shamna 2012). Gulati ve arkadaşları (2007a), *Bacillus laevolacticus* ile yaptıkları çalışmalarda beef ekstrakt, pepton ve triptonun fitaz enzimi üretimi üzerine uyarıcı bir etkisinin olmadığını açıklamışlardır (Gulati 2007a). *Bacillus subtilis* MJA suşu ile yapılan çalışmada fitaz üretimini en çok uyaran azot kaynağının malt ekstrakt olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda bazı inorganik azot kaynaklarının enzim üretimi açısından daha etkili olduğunu göstermektedir. Örneğin NH_4NO_3 (Fu 2011) ve $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Gulati 2007a) inorganik azot kaynaklarının bulunduğu ortamlarda fitaz üretiminin uyarıldığı bildirilmiştir.

Yaptığımız çalışmada inorganik azot kaynağı varlığında fitaz üretiminin fazla olmamasının nedeni, besi ortamında bulunan diğer bileşenlerle amonyum tuzlarının negatif etkileşime girdiği düşünülebilir. Ayrıca, bu durum bakterinin ortamdaki amonyumdan faydalanma yeteneğinin olmadığını göstermektedir. Böyle bir sonuç Shaheen ve ark. (2008) tarafından da ifade edilmiştir. Tüm bu sonuçlara göre amonyuma spesifik represyon mekanizmasının karmaşık bir yapısı olduğu ifade edilmektedir (Shaheen ve ark. 2008). Bu sonuçlar bakteri suşlarının farklı azot kaynakları varlığında farklı enzim üretim kapasitelerine sahip olduklarını göstermiştir.

Metal iyonlarını bakteri gelişimi ve fitaz üretimi üzerine etkisini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda çeşitli metal iyonları kullanılmış ve CaCl_2 varlığında %34'lük aktivite artışı ile en yüksek enzim üretimi sağlanmıştır. NaCl ve MgSO_4 ise fitaz üretimini olumlu yönde etkilemiştir. Ortamda kullanılan diğer metal iyonlarının ise fitaz üretimini olumsuz yönde etkiledikleri tespit edilmiştir. Bakteri ve mantarların, fitaz üretiminde metal iyonlarının etkisi üzerine yapılan birçok çalışma bu bulguları desteklemektedir. *B. amyloliquefaciens* (Oh 2001), *Bacillus* sp.DS11 (Kim 1998), *Bacillus subtilis* (natto) (Shimizu 1992) ve *Bacillus subtilis* (Kerovuo 1998)'in fitaz üretiminde CaCl_2 'ün oldukça önemli bir metal iyonu olduğu bildirilmiştir. Fe^{2+} , Zn^{2+} ve Cu^{2+} gibi bazı metal iyonlarının fitaz aktivitesini %50 oranında inhibe ettiği

bildirilmiştir (Segueilha 1992). Yaptığımız çalışmada da benzer sonuçlar gözlenmiştir. Ortamlarda FeSO₄ varlığında enzim aktivitesinde %74'lük bir kayıp gözlenirken; ZnSO₄ varlığında %70'lik bir aktivite kaybı gözlenmiştir. Özellikle üremenin CaCl₂ ve FeSO₄ varlığında kontrole göre çok azaldığı gözlenirken, CaCl₂'nin fitaz aktivitesindeki (282 IU/mL) artış dikkat çekmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre Ca⁺² un enzim üretimi üzerine büyük bir etkisinin olduğu belirlenmiştir. Doyle ve ark. (1980) yaptıkları çalışmalarda bakteri hücre duvarının yapısında bulunan peptidoglukan ve teikoik asit yapısına giren kalsiyum iyonlarının, bakteri üremesinde artış sağladığını bildirmişlerdir.

Tüm bu sonuçlar bakterilerin fitaz enzimini oluşturabilmesi ve stabilizasyonunu sağlayabilmesi için ortamda bir veya birkaç etkili metal iyonunun mutlaka bulunması gerektiğini ortaya koymaktadır (Manning ve ark. 1961).

Yaptığımız çalışmada en yüksek enzim üretiminin gözlendiği karbon, azot ve metal kaynakları kullanılarak modifiye edilen ortamda *Bacillus sp.* EBD 9-1 suşu enzim üretimi açısından değerlendirilmiş olup, fitaz enziminin aktivitesi 311 U/mL olarak bulunmuştur. Modifiye ortamda yapılan enzim üretiminde, kontrole göre %48 oranında bir verim artışı sağlanmıştır.

Görüldüğü gibi literatürde *Bacillus* türlerinden elde edilen fitazlar ile ilgili çok çeşitli sonuçlar bildirilmiştir ve bu da bize *Bacillus* türlerinin çok çeşitli özelliklerde fitazlara sahip olduklarını göstermektedir.

Enzimler farklı endüstri dallarında yaygın olarak kullanılan biyolojik katalizörlerdir ve bu alanların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Enzimler, yem sanayinde 30 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır. Son yıllarda ABD, Avrupa ve Türkiye'de yem katkı maddesi olarak enzimler yoğun şekilde kullanılmaktadır ve kullanımları giderek yaygınlaşmaktadır. Özellikle, Dünyada fitaz enziminin kullanımının artması nedeniyle bu enzim bilim ve teknolojinin oldukça ilgilendiği bir alan olmuştur. Fitaz enziminin ilavesi hayvanların yem hammaddeleriyle aldıkları fitat fosforundan yararlanmalarını artırmakta ve özellikle entansif hayvan yetiştiriciliği yapılan alanlarda hayvansal atıklardaki fosforun birikiminden kaynaklanan çevre kirliliğini azaltmaktadır. Ayrıca fitaz enzimi insan beslenmesine ve sağlığına olumlu katkılarda bulunmaktadır. Spesifik

fitik asit veya inositol türevi ürünlerdeki gelişmeler de dikkati çekmekte ve fitaz enziminin kullanımı için yeni bir alan oluşturmaktadır. Mikrobiyal fitazlar üretimleri ve uygulanmalarının uygunluğu nedeni ile teknolojik ve ekonomik anlamda önerilmektedir. Biyoteknoloji ise fitaz enzimlerinin kullanım alanlarının artmasıyla birlikte günümüzde kullanılan ve gelecekte de bu enzimleri üretmede ve özelliklerinin geliştirilmesinde kullanılacak oldukça etkin bir teknolojidir (Aşan 2007).

Çalışma sonucunda, kendi kaynaklarımızdan yeni izole edilen ve *Bacillus* sp. EBD 9-1 olarak adlandırdığımız bakteriden yüksek verimde enzim üretimi sağlanmıştır. Enzim maksimum üretimini karbon kaynağı olarak laktoz, azot kaynağı olarak et özütü ve metal iyonu olarak CaCl_2 ve NaCl varlığında elde edilmiştir. Çalışmada oluşturulan yeni modifiye ortamda enzim üretimi kontrol ortama göre %48'lik bir artış göstermiştir. Elde edilen bu enzimin besin değeri yüksek yem eldesi için yem sanayinde, özel *myo*-inositollerin elde edilmesinde, ilaç ve gıda endüstrileri gibi endüstrinin birçok alanında kullanılabilirliği olabilir. Özellikle yemlere uygulanarak etlik piliçlerin performansını arttırarak daha fazla verim elde etme potansiyeli olabilir. Bu amaçla, fitaz enzimi U.Ü. Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı'nda kanatlı rasyonlarına katılarak enzimin yemlerde kullanılabilirliği araştırılacaktır. Böylece dış ülkelerden satın alınan fitaz enziminin ülkemizde geniş çapta üretilmesi ve bu sayede ülke ekonomisine katkıda bulunması mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Adeola, O., Sands, J.S., Simmins, P.H., Schulze, H. 2004.** The efficacy of an Escherichia coli-derived phytase preparation. *J. Anim. Sci.*, 82:2657-2666.
- Anastasio, M., Pepe, O., Cirillo, T., Palomba, S., Blaiotta, G., Villani, F. 2010.** Selection and Use of Phytate-Degrading LAB to Improve Cereal-Based Products by Mineral Solubilization During Dough Fermentation. *Journal of Food Science*, Vol. 75, Nr. 1.
- Anderson, R.J. 1914.** A contribution to the chemistry of phytin. I. Composition of barium phytate and phytic acid. II. A study of the properties of phytic acid and its decomposition products. Eighth paper on phytin. *J. Biol. Chem.*, 17: 171-190.
- Angel, R., Tamim, N.M., Applegate, T.J., Dhandu, A.S., Ellestad L.E. 2002.** Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy, *Journal of Applied Poultry Research*, 11: 471-480.
- Anonim, 2009.** <http://www.danisco.com/animalnutrition>
- Anonim, 2011.** http://www.bccresearch.com/market_research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030f.html
- Anonim, 2012a.** [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, 2012b.** <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-markets-bio030g.html>
- Anonim, 2014.** <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030h.html>
- Anonim, 2014.** <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-phytase.html>,2014).
- Arıkan, B., Gözükar, F., 2012.** Isolation Of Thermophilic *Bacillus* sp., Production, Characterization And Determination Of Biotechnological Application Of Lichenase (β -1,3 And 1,4 Glucanase). *Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, Cilt (27-5): 121-122.
- Aschroft, S.J. 1997.** Intracellular second messengers. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 426, 73-80.
- Aşan, M. 2007.** Mikrobiyal Fitazlar, Uygulama Alanları ve Biyoteknoloji. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, *Tarım Bilimleri Dergisi*, 13(2): 147-155
- Ayhan, K. 2000.** Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar. *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını*, Sim Matbaacılık Ltd. Ankara, 43-44.
- Baldi, B.G., Franceschi, V.R., Loewus, F.A. 1987.** Localization of phosphorus and cation reserves in *Lilium longiflorum* pollen. *Plant Physiol*, 61: 1018-1021.

- Barredo, J.L., 2005.** Microbial Enzymes and Biotransformations. *Humana Pres*, Totowa, New Jersey.
- Baruah, K., Sahu, N.P., Pal, A.K., Jain, 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.
- Bedford, M.R., 2003.** New enzyme Technologies for poultry feeds. *Br. Poul. Sci.*, 44 (Suppl. 1): S14-S16.
- Bilgehan, H., 1995.** *Bacillus* Genusu: Klinik Mikrobiyolojik Tanı, Fakülteler Kitabevi, Barış Yayınları, İzmir, 529-532.
- 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 mucose of rat, chicken, calf, and man. *Biochim. Biophys. Acta* 268, 442-452.
- Blank, G.E., Pletcher, J., Sax. M. 1971.** Structure of myo-inositol hexaphosphate dodecasodium salt octatriacontahydrate. Single crystal x-ray analysis. *Biochem Biophys Res Comm.*, 44: 319-325.
- 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.
- Bosch, D.J., Zhu, M., Kornegay, E.T. 1998.** Net returns from microbial phytase when crop applications of swine manure are limited by phosphorus, *Journal of Production Agriculture*, 11: 157–213.
- Brocades, G. 1991.** DNA sequence encoding phytase. *Pat. EP*, 420 358.
- Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., 1974.** Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th edition, The Williams and Wilkins Company, 1246 p. Baltimore.
- Caldwell, A.G., Black, C.A. 1958.** Inositol hexaphosphate. III. Content in soils. *Proc Soil Sci Soc Amer.*, 22: 290-293.
- Casey, A., Walsh, G. 2004.** Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *Journal of Biotechnology*, 110, 313–322.
- Cheryan, M. 1980.** Phytic acid interactions in food systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 13: 297-355.
- Chi, H., Tiller, G.E., Dasouki, M.J. et al. 1999.** Multiple inositol polyphosphate phosphatase: evolution as a distinct group within the histidine phosphatase family and chromosomal localization of the human and mouse genes to chromosomes 10q23 and 19. *Genomics* 56, 324-336.

- Choi, Y.M., Suh, H.J., Kim, J.M. 2001.** Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *J. Prot. Chem.*, 20: 287-292.
- Chris, E.D., Klaas, J.K. 2000.** Energy Consumption in the Food Chain: Comparing alternative options in food production and consumption. *Ambio* 29: 98-101.
- Copper, J.R. Gowing, H.S. 1983.** Mammalian small intestine phytase. *Br. J. Nutr.*, 50, 673-678.
- Cosgrove, D.J., Irving, G.C.J. 1980.** Inositol Phosphates: Their chemistry, Biochemistry and Physiology. North Holland, Inc., *New York: Elsevier*, 191 p.
- Costello, A.J.R., Glonek, T., Myers, T.C. 1976.** Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance – pH titration of hexaphosphate (phytic acid). *Carbohydr. Res.*, 46, 156-171.
- Craxton, A, Caffrey, J.J., Burkhart, W., Safrany, S.T., Shears, S.B. 1997.** Molecular cloning and expression of a rat hepatic multiple inositol polyphosphate phosphatase. *Biochem. J.* 328, 75-81.
- Cromwell, G.L., Stahly, T.S., Coffey, R.D., Monegue, H.J., Randolph, J. H. 1993.** Efficacy of phytase in improving the bioavailability of phosphorus in soybean meal and corn-soybean meal diets for pigs. *J. Animal Sci.* 71, 1831-1840.
- Çon, A.H., Gökalp, H.Y. 1997.** Gıda Mikrobiyolojisi. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Notları, Mühendislik Fakültesi Basım Ünitesi, Denizli, Yayın no: 007, 23 s.
- Çotuk, A. 2003.** Genel mikrobiyoloji laboratuvar yöntemleri. Nobel Tıp Kitabevleri, 138s.
- Dalal, R.C. 1978.** Soil organic phosphorus. *Adv. Agronom.*, 29: 83-117.
- Davies, N. T. 1982.** Effects of phytic acid on mineral availability. In *Dietary Fiber in Health and Disease*. Vahoung, G.V., Kritchevsky, D., Eds., Plenum Press, New York.
- Day, P.R., 1996.** Genetic modification of plants: significant issues and hurdles to success. *Am. J. Clin. Nutr.*, 63:651S-656S.
- De Boer, I.J.M., Peters, H.T.A., Grossian, M., Koops, W.J. 1997.** Nutrient flows in agriculture in the Netherlands with special emphasis on pig production, *Journal of Animal Science*, 75: 2054–2063.
- Dechavez, R.B., Serrano, Jr.A.E., Nuñal, S., Christopher C.M.A. 2011.** Production and characterization of phytase from *Bacillus* spp. as feed additive in aquaculture. *Aquacult. Aquarium Conserv. Legislation Int. J. Bioflux Soc.*, 4: 394-403.
- 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
- Deshpande, S.S., Cheryan, M. 1984.** Effect of phytic acid, divalent cations, and their interactions on alpha-amylase activity. *J. Food Sci.* 49, 516-524.

- Doyle, R.J., Matthews, S., Streips, U.N. 1980.** Chemical basis for selectivity of metal ions by the *Bacillus subtilis* cell wall. *J. Bacteriol.*, 143(1): 471-480
- Dvorakova, J. 1998.** Phytase: Sources, Preparation and Exploitation. *Folia Microbiol.* 43, 323-338.
- Dyer, W.J., Wrenshall, C.L., Smith, G.R. 1940.** The isolation of phytin from soil. *Science* 91: 319–321.
- 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.
- Erdman, J.R. 1979.** Oil seed phytates: nutritional implications. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 56, 736–741.
- Ergün, A., Tuncer, Ş.D., Çolpan, İ. Yalçın, S., Yıldız, G., Küçükersan, M.K., Küçükersan, S., Önel, A.G., Muğlalı, Ö.H., Şehu, A., 2002.** Yemler, Yem Hijyeni ve Teknolojisi. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, 465 s.
- Findenegg, G.R., J.A. Nelemans. 1993.** The effect of phytase on the availability of P from myo-inositol hexaphosphate (phytate) for maize roots. *Plant Soil*, 154: 189-196.
- Francis, G., Makkar, P.S.H., Becker, K. 2001.** Antinutritional factors present in plant derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish, *Aquaculture*, 199: 197-227.
- Fredrikson, M., Biot, P., Larsson, M., Alminger, 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*. *Eur. J. Biochem.*, 207, 359-367.
- Fu, S., Guo, S., Shen, Z., Zhang, N., Qu, G., et al. 2011.** Characterization of a thermostable alkaline phytase from *Bacillus licheniformis*. International Conference on Agricultural and Biosystems Engineering, Advances in Biomedical Engineerin, China, Hong Kong, Vol 1-2, 102-106, Febuary 20-21,
- Glennon, M.C., Shears, S.B. 1993.** Turnover of pentakisphosphates, inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol polyphosphates in primary cultured hepatocytes. *Biochem J.*, 293: 583-590.
- 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. *Can. J. Microbiol.*, 46: 59-71
- Greaves, M.P., Anderson, G., Webley, D.M. 1967.** The Hydrolysis of Inositolphosphates by *Aerobacter aerogenes*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 132: 412-418.

- Greiner, R., Haller, E., Konietzny, U., Jany, K.D. 1997.** Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Arch. Biochem. Biophys.* 341, 201-206.
- Greiner, R., Konietzny, U. 1996.** Construction of a bioreactor to produce special breakdown products of phytate. *J. Biotechnol.*, 48: 153-159.
- Greiner, R., Konietzny, U. 2006.** Phytase for food application. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 125–140.
- Greiner, R., Konietzny, U., Jany, K. D. 1993.** Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 107-113.
- Greiner, R., Larsson Alminger, M., Carlsson, N.G., Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., Pedrosa, M., Goyoaga, C. 2002.** Pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytases of legume seeds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50: 6865-6870.
- Greiner, R., Larsson Alminger, M., Carlsson, N.G., Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., Pedrosa, M.M., Goyoaga, C. 2002.** Enzymatic phytate degradation-A possibility to design functional foods. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 21: 50-54.
- Griener, R., Kontietzny, U., Jany, K.D. 1993.** Purification and characterization of two from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 303:107-113
- Gulati, H.K., Chadha, B.S., Saini, H.S. 2007a.** Production and characterization of thermostable alkaline phytase from *Bacillus laevolacticus* isolated from rhizosphere soil. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 34:91-98
- Gulati, H.K., Chadha, B.S., Saini, H.S. 2007b.** Production of feed enzymes (phytase and plant cell wall hydrolyzing enzymes) by *Mucor indicus* MTCC 6333: Purification and characterization of pythase. *Folia Microbiol.*, 52859:491-497.
- Gupta, S.K., Venkatasubramanian, T.A. 1975.** Production of aflatoxin on soybeans. *Appl. Microbiol.*, 29: 834-836.
- Gümüsel, F. 2002.** Biyoteknoloji, genetik ve sağlık sektörü. Kocaeli Sanayii için teknolojik uzgörü ortak projesi, 73-135 s.
- Han, O., Failla, M.L., Hill, A.D., Morris, E.R., Jr. Smith J.C. 1994.** Inositol phosphates inhibit uptake and transport of iron and zinc by a human intestinal cell line. *J. Nutr.*, 124: 580-587.
- Han, Y.M., Lei, X.G. 1999.** Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 364: 83-90.
- Han, Y.M., Yang, F., Zhou, A.G., Miller, E.R., Ku, P.K., Hogberg, M.G., Lei, X.G. 1997.** Supplemental phytases of microbial and cereal sources improve dietary phytate phosphorus utilization by pigs from weaning through finishing. *Journal of Animal Science*, 75: 1017–1025.

- Hara, A., Ebina, S., Kondo, A., Funaguma, T. 1985.** A new type of phytase from pollen of *Typha latifolia* L. *Agric. Biol. Chem.* 49, 3539-3544.
- Harland, B.F., Oberleas, D. 1987.** Phytate in Foods. *Wld Rev Nutr Diet.*, 52: 235-259.
- Harland, F.B., Morris, E.R. 1995.** Phytin: A good or a bad food component. *Nutr. Res.*, 15: 733-754.
- Harland, F.B., Oberleas, D. 1987.** Phytate in Foods. *Wld Rev Nutr Diet.*, 52: 235-259.
- Haros, M., C.M. Rosell, C. Benedito. 2001.** Fungal phytase as a potential breadmaking additive. *Eur. Food Res. Technol.*, 213: 317-322.
- Harper, A. F., Kornegay, E.T., Schell, T.C. 1997.** Phytase supplementation of low-phosphorus growing-finishing pig diets improves performance, phosphorus digestibility, and bone mineralization and reduces phosphorus excretion. *J. Anim. Sci.*, 75: 3174-3186.
- Hartig, T. 1855.** Über das Klebermehl. *Bot. Ztg.*, 13: 881-882.
- Hartig, T. 1856.** Weitere mittheilungen das klebermehl (Aleuron) betreffend. *Bot. Ztg.*, 14: 257-268.
- Hartman, G.H. Jr. 1979.** Removal of phytate from soy protein. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 56, 731–735.
- Hegeman, C.E., Grabau, E.A. 2001.** A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. *Plant Physiology*, 126: 1598–1608.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T., Williams, S. T. 1993.** *Manuel of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Honke, J., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, C., Frias, J., Gorecki, R. 1998.** Changes in quantities of inositol phosphates during maturation and germination of legume seeds. *Z Lebensm Unters Forsch A.*, 206: 279-283.
- Horikoshi, K. 1999.** Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology, Reviews* 63: 735- 750.
- Howson, S.J., Davis, R.P. 1983.** Production of phytate hydrolysing enzymes by some fungi. *Enzyme Microb Technol.*, 5: 377-389.
- Hurrell, R.F. 2003.** Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. *J. Nutr.*, 133(suppl.): 2973-2977.
- 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.
- Inagawa, J., Kiyosawa, I., Nagasawa, T. 1987.** Effect of phytic acid on the hydrolysis of lactose with beta-galactosidase. *Agric. Biol. Chem.* 51, 3027-3032.

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.

Isaacks, R.E., Kim, H.D., Bartlett, G.R., Harkness, D.R. 1977. Inositol pentaphosphate in erythrocytes of a freshwater fish, peraracu (*Arapaima gigas*). *Life Sci.*, 20: 987-990.

Isbrandt, L.R., Oertel, R.P. 1980. Conformational states of myo-inositol hexakis(phosphate) in aqueous solution. A ¹³C NMR, ³¹P NMR, and Raman spectroscopic investigation. *J. Am. Chem. Soc.*, 102: 3144-3148.

IUPAC-IUB (1968) The nomenclature of cyclitols. Tentative rules *Eur J Biochem* 5: 1-12.

IUPAC-IUB (Commission on Biochemical Nomenclature) (1977) Nomenclature of phosphorus containing compounds of biochemical importance. *Eur. J. Biochem.* 79, 1-9.

Jackson, J.F., Jones, G., Linskens, H.F. 1982. Phytic acid in pollen. *Phytochem.*, 21: 1255-1258.

Jog, S.P., Garchow, B.G., Mehta, B.D., Murthy, P.P.N. 2005. Alkaline phytase from lily pollen: Investigation of biochemical properties. *Archives Biochemistry Biophysics*, 440: 133-140.

Johnson, L.F., Tate, M.E. 1969. Structure of myo-inositol pentaphosphates. *Ann N Y Acad Sci.*, 165:526-532.

Johnson, L.F., Tate, M.E. 1969a. Structure of phytic acid. *Can. J. Chem.*, 47: 63-74.

Jongbloed, A. W., Mroz, Z., Kemme, P. A. 1992. The effect of supplementary *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs on concentration and apparent digestibility of dry matter, total phosphorus, and phytic acid in different sections of the alimentary tract. *J. Animal Sci.* 70, 1159-1168.

Kaynar, P., Beyatlı, Y. 2006. Balıklardan İzole Edilen *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi, Plazmid DNA ve Protein Profillerinin İncelenmesi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 4(3), 1-30.

Kemme, P. A., Jongbloed, A.W., Mroz, Z., Beynen, A. C. 1997. The efficacy of *Aspergillus niger* phytase in rendering phytate phosphorus available for absorption in pigs is influenced by pig physiological status. *J. Anim. Sci.* 75:2129-2138.

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

- 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*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2079-2085.
- Kerovuo, J., Tynkkynen, S. 2000.** Expression of *Bacillus subtilis* phytase in *Lactobacillus plantarum* 755. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 325-329
- Kim, D.H., Oh, B.C., Choi, W.C., Lee, J.K., Oh, T.K. 1999.** Enzymatic evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* phytase as a feed additive. *Biotechnol Lett*, 21: 925–7
- Kim, H., Kim, Y., Lee, J., Kim, K., Kim, Y. 2003.** Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*. *Biotechnology Letters*, 25: 1231-1234.
- Kim, Y.O., Kim, H.K., Bae, K.S., Yu, J.H., Oh, T.K. 1998.** Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microb Technol.*, 22: 2-7.
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. 2002.** Industrial Enzyme Applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 345-351.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M. 1992.** Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, ed. 4. Philadelphia, JB Lippincott, P: 447, 449, 459, 548.
- 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., Greiner, R. 2004.** Bacterial phytase: Potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 11-18.
- Kornegay, F. E. T. 2001.** Digestion of Phosphorus and Other Nutrients: The Role of Phytases and Factors Influencing Their Activity. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. Ed., M.R.Bedford, G.G. Partridge, CABI Publishing, UK. pp: 237-272.
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., Becker, K. 2010.** Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition. *Food Chemistry* 120, 945– 959
- Kutlu, H.R. 2000.** Kanatlı Rasyonlarında Enzim Kullanımı, *Çiftlik Dergisi*, 194: 84-88.
- Kvist, S., Carlsson, J.M., 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. *Biochem. J.* 295, 413-419.
- Lan, G.O., Abdullah, N., Jalaludin, S., Ho, Y.W. 2002.** Optimization of carbon and nitrogen sources for phytase production by *Mitsuokella jalaludinii*, a new Rumen bacterial species. *Letters in Applied Microbiology*, 35(2), 157-161

- Laumen, K., Ghisalba O. 1994.** Preparative scale chemo enzymatic synthesis of optically pure D-myo-inositol 1-phosphate. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58: 2046-2049.
- Lehmann, M., Kostrewa, D., Wyss, M., Brugger, R., D'Arcy, A., Pasamontes, L. 2000.** From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase. *Protein Eng.* 13:49-57
- Lei, X.G., Porres, J.M. 2003.** Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotech Lett*, 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.), The Netherlands, *Springer*, pp. 505–529
- Lei, X.G., Stahl, C.H. 2001.** Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:474-481.
- Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, J.W.JR., Shadomy, J.H. 1985.** Manual of clinical microbiology. USA, 1149 pp.
- Liener, I.E. 1981.** Factors affecting the nutritional quality of Soya products. *J Am Oil Chemists Soc.*, 58: 406-415.
- Liener, I.E., 1994.** Implications of antinutritional components in soybean foods. *Crit. Rev. Fd. Sci. Nutr.* 34: 31-67.
- 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.M., Rob, A. 1998.** The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 22: 415-424.
- Loewus, F. 2002.** Biosynthesis of phytate in food grains and seeds. In: Food Phytases, N.R. Reddy, S.K. Sahte (Eds.), CRC Pres, Boca Raton, Florida, USA, 53-61.
- Lopez, H.W., Leenhardt, F., Coudray, C., Rèmèsy C. 2002.** Minerals and phytic acid interactions: Is it a real problem for human nutrition? *Int. J. Food Sci. Technol.*, 37: 727-739.
- Lott, J.A., Ockenden, I., Raboy, V., Batten, G.D. 2002.** A global estimate of phytic acid and phosphorus in crop grains, seeds, and fruits. In: Reddy NR, Sathe SK, editors. Food Phytates. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 6-23.
- Lott, J.N.A., Buttrose, M.S. 1978.** Globoids in protein bodies of legume seed cotyledons. *Aust Plant Physiol.*, 5: 89-111.
- Lowe, D.A. 2001.** *Basic Biotechnology*. (Ed: Ratledge C. and Kristionsen B.), Second Edition, Cambridge University Pres.

- Lowe, J.T., Steenbock, H., Keiger, C.H. 1939.** Cereals and rickets. IX. The availability of phytin-P to the chick. *Poult. Sci.*, 18: 40-44.
- 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, New York, pp: 61–84
- Maenz, D.D., Classen, H.L. 1998.** Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poultry Science*, 77: 557–563.
- Manning, G.B., Campbell, L.L., Foster, R.J. 1961.** Thermostable α -amylase of *Bacillus stearothermophilus*. II. Physical properties and molecular weight. *J. Biol. Chem.*, 236:2958-2961
- Maugenest, S., Martinez, I., Lescure, A.M. 1997.** Cloning and characterization of a cDNA encoding maize seedling phytase. *Biochem. J.* 322, 511-517.
- McCollum, E.V., Hart, E.B. 1908.** On the occurrence of a phytin-splitting enzyme in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 4(6):497-500
- Menniti, F.S., Oliver, K.G., Putney, J.W., Shears, S.B. 1993.** Inositol phosphates and cell signalling: New views of InsP, and InsP. *TIBS* 18: 53-56.
- Midilli, M., Muğlalı, H., Alp, M, Kocabağlı, N., Tanör, M.A., Toklu, G.S. 2003.** Yeme katılan fitaz enziminin broylerlerde besi performansı ve mineral dengesi üzerine etkisi, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 27: 751-759.
- Mitchell, D.B., Vogel, K., Weimann, B. J., Pasamontes, L., Van Loon, A.P.G.M. 1997.** The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology*, 143: 245-252.
- Mittal, A., Gulab, S., Goyal, V., Yadav, A., Aneja, K.R., et al. 2011** Isolation and biochemical characterization of acidothermophilic extracellular phytase producing bacterial strain for potential application in poultry feed. *Jundishapur J Microbiol*, 4, 273-282
- Mullaney, E.J., Daly, C.B., Kim, T., Porres, J.M., Lei, X.G., Sethumadhavan, K., Ullah, A.H.J. 2002.** Site-directed mutagenesis of *Aspergillus niger* NRRL 3135 phytase at residue 300 to enhance catalysis at pH 4.0, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 297: 1016–1020.
- Mwachireya, S.A., R.M. Beames, D.A. Higgs, B.S. Dosanjh. 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.
- National Environmental Outlook 4, 1997-2000** (In Dutch, cited from 2). Bilthoven, The Netherlands. pp. 5.
- Neuberg, C. 1908.** An analysis of the constitution of phytin. *Biochem Z* 9: 557-560

- Neuberg, C. 1908a.** The connection of the circular inositol to the aliphatic sugar. *Biochem Z* 9: 551-556.
- O'Dell, B.L., De Boland, A., Koirtyohann, R. 1972.** Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. *J Agric Food Chem.*, 20: 718-721.
- O'Dell, B.L., De Boland, A.R. 1976.** Complexation of phytin with proteins and cations in corn germ and oilseed meals. *J. Agric. Food Chem.*, 24: 804-808.
- Ogawa, M., Tanaka, K., Kasai, Z. 1975.** Isolation of high phytin containing particles from rice grains using an aqueous polymer two phase system. *Agric Biol Chem.* 39: 695-700.
- Ogawa, M., Tanaka, K., Kasai, Z. 1979.** Phytic acid formation in dissected ripening rice grains. *Agric Biol Chem.*, 43: 2211-2213.
- Oh, B.C., Chang, B.S., Park, K.H., Ha, N.C., Kim, H.K., et al. 2001.** Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11. *Biochem*, 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 phytase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63: 362-372.
- Onyango, E. M., Bedford, M.R., Adeola, O. 2005.** Efficacy of an evolved *Escherichia coli* phytase in diets of broiler chicks. *Poult. Sci.* 84:248-255.
- DurluÖzkaya, F., 2000.** Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Armoni Matbaacılık Ltd. Şti. Ankara. 358 p.
- Pallauf, J., Rimbach, G. 1996.** Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Arch. Anim. Nutr.* 50, 301-319.
- Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A., Soccol, V.T. 2001.** Production, Purification and Properties of Microbial phytases. *Bioresource Technol.*, 7: 203-214.
- Park, Y.J. 2001.** Expression, characterization, and antifungal activity of phytase from *Bacillus subtilis* TS16-111. *PhD Thesis*, Faculty of the Graduate school of Seoul National University, Korea.
- Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M., van Loon. A,P, 1997.** Gene cloning, purification and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol.*, 63: 1696-1700.
- Pekşen, E., Artık, C. 2005.** Antibesinsel maddeler ve yemeklik tane baklagillerin besleyici değerleri, *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20 (2) : 116-117
- Pfeffer, M. 1872.** Comprehensive study of aleurone grains, identification of globoid and approximation of its chemical nature. *Johrb. Wiss. Bot.*, 8: 429-574.

- 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.
- Polaina, J., MacCabe, A.P. 2007.** Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. *Springer*, The Netherlands
- Posternak, S., Hebd, C.R. 1903.** Seances Acad. *Sci.*, 137,202-203,337-339.
- Powar, V.K., Jagannathan, V. 1982.** Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 151, 1102-1108.
- Pratley, C.A., Stanley, D.W. 1982.** Protein-phytate interactions in soybeans. I. Localization of phytate in protein bodies and globoids. *J Food Biochem*, 6: 243-253.
- Priest, F.G. 1977.** Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*. *Bacteriology Rev.*, 4183: 711-753.
- 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.
- Purva, V., Uttam, C.B. 2004.** Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolase): an overview, *Enzyme Micob. Technol.*, 35: 3-4.
- Raboy, V., Dickinson, D.B. 1987.** The timing and rate of phytic acid accumulation in developing soybean seeds. *Plant Physiol.*, 85: 841-844.
- Rao, B.M., Tanksale, M.A., Ghathe, S.M., Deshpande, V.V. 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology*, 62: 597-635.
- Rapoport, S. 1940.** Phytic acid in avian erythrocytes. *J Biol Chem.*, 135: 403-406.
- Rapoport, S., Guest, G.M. 1941.** Distribution of acid-soluble phosphorus in the blood cells of various vertebrates. *J Biol Chern.*, 138: 269-275.
- Ravindran, V., Bryden, W.L., Kornegay, E.T. 1995.** Phytin: Occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poult Avian Biol Rev.*, 6: 125-143.
- Ravindran, V., Ravindran, G., Sivalogan, S. 1994.** Total and phytate phosphorus contents of various foods and feedstuffs of plant origin. *Food Chem.*, 50: 133-136.
- Reddy, N.R. 2002.** Occurrence, distribution, content, and dietary intake of phytate. In: Food Phytases, N.R. Reddy, S.K. Sahte (Eds.), CRC Pres, Boca Raton, Florida, USA, 25-51.

- Reddy, N.R., Pierson, M.D. 1987.** Isolation and partial characterization of phytic acid-rich particles from great northern beans (*Phaseolus-vulgaris* L). *J Food Sci.*, 52: 109-112.
- Reddy, N.R., Pierson, M.D., Sathe, S.K., Salunkhe, D.K. 1989.** Phytates in cereals and legumes. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc. 147 p.
- Reddy, N.R., Pierson, M.D., Sathe, S.K., Salunkhe, D.K. 1989.** Phytates in cereals and legumes. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Reddy, N.R., Sathe, S.K. 2002.** Food Phytate. NY, Washington D.C. CRCpress, 258 p.
- Reddy, N.R., Sathe, S.K., Salunkhe, D.K. 1982.** Phytates in legumes and cereals. *Adv Food Res.* 28: 1-92.
- Richardson, N.L., Higgs, D.A., Beames, R.M., McBride, J.R. 1985.** Influence of dietary calcium, phosphorus, zinc and sodium phytate level on cataract incidence, growth and histopathology in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Nutr.* 115, 553-567.
- Rimbach, G., Pallauf, J. 1992.** The effect of a supplement of microbial phytase on zinc availability. *Z. Ernahrungswiss.* 31, 269-277
- Robinson, E.H., Jackson, S., Li, M.H. 1996.** Supplemental phytase in catfish diets. *Aquacul. Mag.*, 22: 80-82
- Robinson, R. K., 1985.** Dairy Microbiol., 258p.
- Rodriguez, E., Han, Y.M., Lei, X.G. 1999.** Cloning, sequencing, and expression of an *Escherichia coli* acid phosphatase/phytase gene (appA2) isolated from pig colon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 257:117-123.
- Rodriguez, E., Wood, Z.A., Karplus, P.A., Lei, X.G. 2000.** Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*, *Arch. Biochem. Biophys.* 382: 105-112.
- Rose, A.R. 1912.** A resume of the literature on inosite phosphoric acid with special reference to the relation of that substance to plants. *Biochem Bull.* 21-49.
- Rumsey, G.L. 1993.** Fish meal and alternate sources of protein in fish feeds: Update. *Fisheries*, 18: 14-19.
- Rumsey, G.L. 1993.** Fish-meal and alternate sources of protein in fish feeds update 1993. *Fisheries* 18: 14-19.
- Sandberg, A.N., Andlid, T. 2002.** Phytogenic and microbial phytases in human nutrition. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 823-833.
- Sandberg, A.S., Brune, M., Carlsson, N.G., Hallberg, L., Skoglund, E., Rossander-Hulthén, L. 1999.** Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 70: 240-246.

- Sandström, B., Sandberg, A.S. 1992.** Inhibitory effects of isolated inositol phosphates on zinc absorption in humans. *J. Trace Elem. Electrol. Health Dis.*, 6: 99-103.
- Sarıkaya, E. 1995.** α -Amilaz üreten bazı *Bacillus* suşlarının gelişme parametreleri, enzim özellik ve üretim koşullarının optimizasyonu. *Doktora Tezi*, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Sathe, S.K., Reddy, N.R. 2002.** *Introduction*, Reddy NR, Sathe SK (eds), *Food Phytates*, Boca Raton, pp: 1–5
- Schallmey, M., Singh, A., Ward, O.P. 2004.** Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 1-17.
- Schulze, E., Winterstein, E. 1896.** Phytates in Cereals and Legumes. *Physiol. Chem.*, 40:120
- Scott, J.J., Loewus, F.A. 1986a.** Phytate metabolism in plants. In: Graf E, editor. *Phytic Acid: Chemistry and Applications*. Minneapolis, MN: Pilatus Press. pp. 23-42.
- Scott, J.J., Loewus, F.A. 1986b.** A calcium-activated phytase from pollen of *Lilium longiflorum*, *Plant Physiol.*, 82: 333-335.
- Segueilha, L., Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G., Galzy, P. 1992.** Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. *J Ferment Bioeng* 74: 7-11.
- Selle, P.H., Gill, R.J., Scott, T.A. 2007.** Effects of pre-pelleted wheat and phytase supplementation on broiler growth performance and nutrient utilisation. *Proceedings of Australian Poultry Science Symposium*, 19, 182–185.
- Selle, P.H., Ravindran, V. 2006.** Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal feed Science and Technology* (In Press).
- Selle, P.H., Ravindran, V., 2007.** Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal feed Science and Technology*, 135, 1–41.
- Shah, V., Parekh, L.J. 1990.** Phytase from *Klebsiella* sp. No. PG-2: Purification and Properties. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 27: 98-102.
- Shaheen, M., Aamer, A.S., Abdul, H., Fariha, H. 2008.** Influence of culture conditions on production and activity of protease from *Bacillus subtilis*. *Pak. J. Bot.*, 40(5): 2161-2169
- Shamna, K.S., Rajamanikandan, K.C.P., Kumar, D.J.M., Balakumaran, M.D., Kalaichelvan, P.T. 2012.** Extracellular production of Phytases by a Native *Bacillus subtilis* Strain. *Annals of Biological Research*, 3(2):979-987
- Shears, S.B. 1998.** The versatility of inositol phosphates as cellular signals. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1436: 49-67.
- Shieh, T.R., Ware, J.H. 1968.** Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Appl. Microbiol.* 16, 1348-1351.

- Shieh, T.R., Wodzinski, R.J., Ware, J.H. 1969.** Regulation of the formation of acid phosphatase by inorganic phosphate in *Aspergillus ficuum*. *J. Bacteriol.* 100, 1161-1165.
- Shimizu, M. 1992.** Purification and Characterization of Phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(8): 1266-1269.
- Silversides, F.G., Scott, T.A., Bedford, M.R. 2004.** The effect of phytase enzyme and level on nutrient extraction by broilers. *Poult. Sci.*, 83:985-989
- Singh, M., Krikorian, A.D. 1982.** Inhibition of trypsin activity in vivo by phytate. *J. Agric. Food Chem.* 30, 799-805.
- Singh, N.K., Joshi, D.K., Gupta, R.K. 2013.** Isolation of Phytase Producing Bacteria and Optimization of Phytase Production Parameters. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(5):e6419
- Siren, M. 1986a.** Stabilized pharmaceutical and biological material composition. Pat.SE 003 165.
- Siren, M. 1986b.** New myo-inositol triphosphoric acid isomer. Pat. SW 052 950.
- Siren, M. 1998.** Use of an ester of inositoltriphosphate for the preparing of medicaments. U.S. Patent 5846957.
- Soni, S.K., Khire, J.M. 2007.** Production and partial characterization of two types of phytase from *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerged fermentation conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 1585-1593.
- Sreedevi, S., Reddy, B.N. 2012.** Isolation, screening and optimization of phytase production from newly isolated *Bacillus* sp. C4. *Int J Pharm Biol Sci*, 2(2): 218-231.
- Sreeramulu, G., Srinivasa, D.S., Nand, K., Joseph, R. 1996.** *Lactobacillus amylovorus* as a phytase producer in submerged culture. *Letters in Applied Microbiology*, 23, 385-388.
- Stahl, C.H., Wilson, D.B., Lei, X.G. 2003.** Comparison of extracellular *Escherichia coli* AppA phytases expressed in *Streptomyces lividans* and *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Letters* 25:827-831.
- Stephens, L., Radenberg, T., Thiel, U., Vogel, G., Khoo, K.H., et al. 1993.** The detection, purification, structural characterization, and metabolism of diphosphoinositol pentakisphosphate (s) and bisdiphosphoinositol tetrakisphosphate(s). *J Biol Chem.*, 268: 4009-4015.
- Suzuki, U., Yoshimura, K., Takaishi, M. 1907.** Bull. Coll. Agric. Tokyo Imp. Univ. 7,495.
- Tambe, 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.

- Tamim, N.M., Angel, R., Christman, M. 2004.** Influence of dietary calcium and phytase on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chickens. *Poult. Sci.*, 83:1358-1367.
- Tanaka, K., Kasai, Z. 1981.** Phytic acid in rice grain. In: Ory RLD, editor. Antinutrients and natural toxicants in food. Westport, CT: Food and Nutrition press. pp. 239-260.
- Tanaka, K., Yoshida, T., Kasai, Z. 1974.** Radio autographic demonstration of the accumulation site of phytic acid in rice and wheat grains. *Plant Cell Physiol*, 15: 147-151.
- Temiz, A. 1994.** Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri. Ankara, s. 26-120.
- Thompson, L.U. 1986.** Phytic acid: a factor influencing starch digestibility and blood glucose response. In: Graf E, editor. Phytic Acid: Chemistry and Applications. Minneapolis, MN: Pilatus Press. pp. 173-194.
- Truter, M.R., Tate, M.E. 1970.** Crystallographic studies of hydrates of dodecasodium myo-inositol hexaphosphate (phytic acid). *J Chem Soc B*: 70-71.
- Turnbell, P.C.B., Kramer, J.M. 1991.** *Bacillus*: Manual of clinical Microbiology, Fifth Edition, Balows, A., Hauster, J. R., Herman, K. L., Isenberg, H. D. and Shadomy, H. J., American Society of Microbiology, Washington D. C., 296-303.
- Uhling, H. 1998.** Industrial Enzymes and Their Applications. Translated and updated by Elfried M. Linsmaier-Bednar, Ph.D. New York.
- Ullah, A.H., Sethumadhavan, K., Lei, X.G., Mullaney, E.J. 2000.** Biochemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* phytase (phyA). *Biochem Biophys Res Commun*, 275: 279-285.
- Ullah, A.H.J., Gibson, D.M. 1987.** Extracellular phytase (EC 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Prep. Biochem.*, 17:63-91.
- Ullah, A.H.J., Mullaney, E.J. 1996.** Disulfide bonds are necessary for structure and activity in *Aspergillus ficuum* phytase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 227:311-317.
- Underwood, E. J., Suttle, N. F. 1999.** The Mineral Nutrition of Livestock 3rd Ed. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Ustaçelebi, Ş. 1999.** Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, s:411-412, 624-625.
- Van Beilen, J.B., Li, Z. 2002.** Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 338-344.
- Van Hartingsveldt, W., Van Zeijl, C.M.J., Harteveld, M., Gouka, R.J., Suykerbuyk, M.E.G., Luiten, R.G.M., Van Paridon, P.A., Selten, G.C.M., Veenstra, A.E., Van Gorcom, R.F.M., Van den Hondel, C.A.M.J.J. 1993.** Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (phyA) of *Aspergillus niger*. *Gene*, 127: 87-94.

- Veum, T.L., Boling, D.W., Buff, C.E., Bedford, M.R. 2006.** A genetically engineered *Escherichia coli* phytase improves nutrient utilization, growth performance, and bone strength of young swine fed diets deficient in available phosphorus. *J. Anim. Sci.*, 84:1147-1158.
- Viveros, A., Centeno, C., Brenes, A., Canales, R., Lozano, A. 2000.** Phytase and acid phosphatase activities in plant feedstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4009-4013.
- Vohra, A., Satyanarayana, T. 2003.** Phytases: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23(1): 29-60.
- Volfova, O., Dvorakova, J., Hanzlikova, A., Jandera, A. 1994.** Phytase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol.*, 39, 481-484.
- 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.
- Warden, W. K., Schaible, P. J. 1962.** Preliminary investigations concerning utilization of phytin phosphorus by the chick. *Poultry Sci.*, 41:1692.
- Weremko, D., Fandrejowski, H., Zebrowska, T., Han, K., Kim, J.H., Cho, W.T. 1997.** Bioavailability of phosphorus in feeds of plant origin for pigs Review. *Asian-Australians Journal of Animal Sciences*, 10: 551-566.
- Williams, P.J., Taylor, T.G. 1985.** A comparative study of phytate hydrolysis in the gastrointestinal track of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) and the laboratory rat. *Br. J. Nutr.* 54, 429-435.
- Winterstein, E. 1897.** A phosphorus compound from plants, which yields inosite on decomposition. *Ber Dtsch Chem Ges.*, 30: 2299-2302.
- Wise, A., Gilbert, D.J. 1982.** Phytate hydrolysis in germfree and conventional rats. *Applied Environmental Microbiology*, 43: 753-756.
- Wiseman, A. 1987.** The Application of Enzymes in Industry. Handbook of Enzym Biotechnology (Wiseman, A.), John Wiley Sons, New york, p:274-373.
- Wodzinski, R. J., Ullah, A. H. J. 1996.** Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 263-302.
- Wolfgang, A. 2004.** Enzymes in industry: Production and applications. Wileyvch Verlag GmbH&Co. KgaA, Weinheim, pp 485.
- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Remy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehmann, M., Van Loon, A.P.G.M. 1999.** Biochemical Characterization of Fungal Phytases (myo-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases): Catalytic Properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 367-373pp.
- Yalçınkaya, S., Ayar, A. Elgün, A. 2003.** Buğday Ruseymi ve Fitaz İlavesiyle Besin Değeri Yüksek Yoğurt Üretimi. *S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 17 (32): 57 -63

- Yang, W.J., Matsuda, Y. Sano, S., Masutani, H., Nakagawa. 1991.** 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.
- Yi, Z., Kornegay, E.T. 1996.** Sites of phytase activity in the gastrointestinal tract of young pigs. *Anim. Feed*, 61:361-368.
- 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.
- Yu, S., Cowieson, A., Gilbert, C., Plumstead, P., Dalsgaard, S. 2012.** Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters: Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP1-5) including IP5 isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin. *Journal of Animal Science*, 90:1824-1832.
- Zhang, Z.B., Kornegay, E.T., Radcliffe, J.S., Wilson, J.H., Veit, H.P. 2000.** Comparison of phytase from genetically engineered *Aspergillus* and canola in weanling pig diets. *J. Anim. Sci.*, 78:2868-2878.
- Zhou, J.R., Erdman, J.W.Jr., 1995.** Phytic acid in health and disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 35 (6): 495-508.
- Zyla, K.M. Mika, B. Stodolak, A. Wikiera, J. Koreleski, S. Swiatkiewicz. 2004.** Towards complete dephosphorylation and total conversion of phytates in poultry feeds. *Poult. Sci.*, 83:1175-1186.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Eren Baygın

Doğum Yeri : Konya / Akşehir

Doğum Tarihi : 26.09.1987

Eğitim Durumu

Lise : Akşehir Lisesi / 2001 - 2004

Lisans : Uludağ Üniversitesi / 2006 - 2012

Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi / 2012 - 2015

Çalıştığı Kurumlar : ---

İletişim (e-posta) : biyoeren@gmail.com

Yayınları : **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