

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2013-YL-034

**FİTAZ ÜRETEN FUNGUSTAN ENZİMİN ÜRETİMİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Gamze Sevri EKREN

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Kubilay METİN

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Gamze Sevri EKREN tarafından hazırlanan “**Fitaz üreten fungustan enzimin üretimi saflaştırılması ve karakterizasyonu**” başlıklı tez, 27.06.2013 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

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

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

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN
Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

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

27/06/2013

Gamze Sevri EKREN

ÖZET

FİTAZ ÜRETEN FUNGUSTAN ENZİMİN ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Gamze Sevri EKREN

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Kubilay METİN

2013, 175 sayfa

Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı stok kültürlerinde kayıtlı havadan ve topraktan izole edilmiş 165 adet fungus fitaz enzimi üretme kapasitesi açısından taranmıştır. *Aspergillus niger* UA-D suşunun en yüksek aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. *Aspergillus niger* UA-D suşundan ekstraselüler olarak PSM ortamında üretilen fitaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE Sefaroz CL-6B ve Fenil Sepharoz CL-4B işlemleri uygulanarak % 2.6 verimle 73 kat saflaştırılmıştır. SDS-PAGE elektroforezinde tek bant elde edilmiş ve moleküler ağırlığı 65 kDa olarak hesaplanmıştır. Maksimum aktivitesini pH 3.0 ve 70 °C sergilediği bulunmuştur. Enzimin geniş bir sıcaklık ve pH aralığında stabil olduğu saptanmıştır. Enzimin fitik asit için K_m değeri 180 μ M ve V_{max} değeri 54.35 U/mL olarak hesaplanmıştır. Fitaz enziminin geniş bir substrat spesifikliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Fitaz aktivitesi, Ba^{2+} ve Li^+ tarafından artarken, Fe^{2+} , Al^{3+} ve Pb^{2+} tarafından inhibe olmuştur. Enzim aktivitesi NBS, PMSF, DTNB, 2,3-bütandion varlığında oldukça inhibe olurken, CMC, DTT ve β -merkaptolanol ile aktive olmuştur. Bu sonuçlar enzimin katalitik merkezinde triptofan, sistein, serin ve arjinin rezidülerinin önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Polihidrik alkollerden gliserol ve sorbitolün sıcaklık stabilitesini artırdığı ve organik çözücülerin ise enzim aktivitesini çok fazla etkilemediği belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Fitaz enzimi, *Aspergillus niger*, saflaştırma, karakterizasyon

ABSTRACT
PRODUCTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
PHYTASE FROM PHYTASE PRODUCING FUNGUS

Gamze Sevri EKREN

M.Sc. Thesis, Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Kubilay METİN

2013, 175 Pages

Fungal strains that were isolated from air and soil and registered in Adnan Menderes University Department of Biology culture stocks were screened for phytase activity of 165 fungal strains. *Aspergillus niger* UA-D. strain showed the highest phytase activity. Extracellular phytase produced by *Aspergillus niger* in PSM was purified 73-fold with a recovery of % 2.6 referred to the phytase activity in the crude extract using, ammonium sulphate precipitation, DEAE Sepharose CL-6B and Phenyl Sepharose CL-4B. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme gave a single stained band at a molecular mass of approximately 65 kDa. The temperature and pH for maximum activity of the enzyme were 70 °C and 3.0, respectively. K_m and V_{max} values for phytic acid of the enzyme were calculated to be, 180 μ M and 54.35 U/mL, respectively. The phytase exhibited broad substrate specificity. The enzyme was stimulated by Ba^{2+} and Li^+ and strongly inhibited by Fe^{2+} , Al^{3+} and Pb^{2+} . The enzyme activity was markedly inhibited in the presence of NBS, PMSF, DTNB, 2,3-butanedione suggesting that tryptophan, cysteine, arginine and serine residues play an important role in the catalytic process. Glycerol and sorbitol enhance thermostability of phytase. The enzyme was determined to be highly stable against organic solvents.

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

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam süresince tecrübesini ve bilgi birikimini hiçbir zaman esirgemeyen, beni her zaman destekleyen ve çalışmalarımın her aşamasında büyük bir özveri ile katkılarını sunmaktan asla kaçınmayan değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Kubilay METİN'e içten teşekkürlerimi sunarım. Pozitif enerjileri ile her zaman yanımda olan ve bilgi birikimi ile yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Z. Burcu Bakır ATEŞLİER'e ve Doktora öğrencisi Öznur KOÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

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

Çalışmamın istatistik değerlendirmelerindeki yardımlarından dolayı ve manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili kardeşim Hande EKREN'e sonsuz teşekkür ederim.

Akademik çalışmalarında ve yaşantısında her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Oktay AŞICI ve Sedef SOYAL'a teşekkür ederim.

Çalışmamda fungusların enzim üretme yeteneklerinin taranmasında yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Merve YAVUZ'a teşekkür ederim.

Maddi ve manevi destekleri ile bugüne kadar hep yanımda olan ve varlıklarıyla bana güç veren, meleğim, annem Raziye EKREN ve sevgili babam Yılmaz EKREN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın yürütülmesinde FEF-12028 no'lu proje ile araştırmamızı destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xxi
TABLOLAR DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Mikrobiyal Enzimler	1
1.2. Enzimlerin Tarihçesi	2
1.3. Fitaz Enzimi (<i>Myo</i> -inositol-hegzafosfat fosfohidrolaz; EC 3.1.3.8)	5
1.3.1. Fitazların Optimum pH'ya Göre Sınıflandırılması	7
1.3.2. Fitazların Katalitik Merkeze Göre Sınıflandırılması.....	8
1.3.2.1. Histidin asit fosfataz (HAP)	8
1.3.2.2. β - Propeller fitazı (BPPHy).....	10
1.3.2.3. Sistidin fosfataz (CP)	11
1.3.2.4. Purple asit fosfataz (PAP)	11
1.3.3. Fitazların Stereospesifikliğine Göre Sınıflandırılması	12
1.4. Fitaz Enziminin Kaynakları	13
1.4.1. Bitkisel Fitazlar	13
1.4.2. Hayvansal Fitazlar.....	14
1.4.3. Mikrobiyal Fitazlar.....	14
1.4.3.1. Bakteri fitazları (PhyC)	15
1.4.3.2. Fungus ve maya fitazları	16

1.4.3.3. Diğer mikroorganizmalar	17
1.5. Fitat ve Yapısı	17
1.6. Fitaz Enziminin Endüstride Kullanım Alanları	19
1.6.1. Fitaz Enziminin Yemlerde Kullanılması.....	19
1.6.2. Fitaz Enziminin <i>Myo</i> -İnositol Eldesindeki Önemi.....	21
1.6.3. Fitaz Enziminin Minerallerden Yararlanmaya Etkisi	21
1.6.4. Fitaz Enziminin Protein Sindirimine ve Metabolik Enerjiye Etkisi.....	23
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	24
2.1. Fitazların Saflaştırılması	24
2.2. Fitazların Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi	31
2.3. Fitazların Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi.....	37
2.4. Fitazların Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin Etkisi	42
2.5. Fitazların Stabilitesi Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi.....	45
2.6. Fitazların Substrat Spesifitesi	45
3. MATERYAL ve METOD	50
3.1. Kimyasallar	50
3.2. Fitaz Üreten Fungusların Taranması ve Seçimi	51
3.3. Fitaz Aktivitesinin Kantitatif Tayini	53
3.4. İnorganik Fosfat Standart Grafiği ve Hazırlanışı.....	55
3.5. Protein Tayini.....	56
3.5.1. Coomassie Brilliant Blue G250 Çözeltisinin Hazırlanışı.....	57
3.5.2. Protein Standartlarının Hazırlanışı.....	57
3.5.3. Yöntem.....	58
3.6. Aflatoksin Testi.....	58
3.7. Sporulasyon ve Sporulasyon Ortamının Hazırlanışı	59
3.8. Enzim Üretimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi	59

3.9. <i>Aspergillus niger</i> UA-D'nin Fitaz Üretim Ortamı	60
3.10. <i>Aspergillus niger</i> UA-D'nin Fitaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi	60
3.10.1. Fitaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	60
3.10.2. Fitaz Üretimi Üzerine Başlangıç pH'sının Etkisi.....	60
3.11. <i>Aspergillus niger</i> UA-D'nin Büyüme Eğrisi.....	61
3.12. Fitazın Saflaştırılması.....	61
3.12.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	62
3.12.2. Diyaliz	63
3.12.3. İyon Değişim Kromatografisi.....	63
3.12.4. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	64
3.13. <i>Aspergillus niger</i> UA-D Fitazının Karakterizasyonu.....	65
3.13.1. PAGE ve SDS-PAGE ile Fitazın Molekül Ağırlığının Belirlenmesi	65
3.13.1.1. SDS-PAGE için gerekli çözeltiler.....	65
3.13.1.2. Yöntem.....	66
3.13.1.3. Örneklerin hazırlanışı ve jele uygulanışı.....	68
3.13.1.4. Jelin boyanması.....	68
3.13.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	69
3.13.3. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	69
3.13.4. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	69
3.13.5. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi	70
3.13.6. Enzim Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi	70
3.13.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	70
3.13.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi	70
3.13.9. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin ve Denatürantların Etkisi.....	72
3.13.10. Enzim Aktivitesi Üzerine İnorganik Fosfatın Etkisi	74
3.13.11. Enzimin Sıcaklık Stabilitesi Üzerine Polihidrik Alkollerin Etkisi	74

3.13.12. Enzim Stabilitesi Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi.....	74
3.13.13. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi.....	76
3.13.14. Verilerin Değerlendirilmesi	76
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	77
4.1. Fitaz Enzimi Üretimi İçin Fungusların Taranması, Aflatoksin Testi ve Seçimi	77
4.2. Enzim Üretimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi	89
4.3. <i>Aspergillus niger</i> UA-D'nin Fitaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi	90
4.3.1. Fitaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	91
4.3.2. Fitaz Üretimi Üzerine Başlangıç pH'nın Etkisi	93
4.4. <i>Aspergillus niger</i> UA-D'nin Büyüme Eğrisi	95
4.5. Fitazın Saflaştırılması	99
4.5.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	99
4.5.2. İyon Değişim Kromatografisi	102
4.5.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	102
4.6. <i>Aspergillus niger</i> UA-D Fitazının Karakterizasyonu.....	105
4.6.1. PAGE ve SDS-PAGE Yöntemi İle Fitazın Molekül Ağırlığının Tayini	105
4.6.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	108
4.6.3. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	111
4.6.4. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	116
4.6.5. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi	119
4.6.6. Enzim Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi.....	123
4.6.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	124
4.6.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Metal İyonları ve EDTA'nın Etkisi.....	127
4.6.9. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin ve Denatürantların Etkisi	134
4.6.10. Enzim Aktivitesi Üzerine İnorganik Fosfatın Etkisi.....	139

4.6.11. Enzimin Sıcaklık Stabilitesi Üzerine Polihidrik Alkollerin Etkisi	140
4.6.12. Enzim Stabilitesi Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi.....	143
4.6.13. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi	146
5. SONUÇ	149
KAYNAKLAR.....	151
ÖZGEÇMİŞ.....	175

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
[S]	Substrat Konsantrasyonu
°C	Derece santigrad
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
APS	Amonyum persülfat
BPP	β-Propellar fosfataz
BPPhy	β-Propellar fitazı
BSA	Sığır serum albumini
cm	Santimetre
CMC	Sikloheksil-N-(2-morfolinoetil)-karboimid metil-p- toluen-sulfonat
CP	Sistidin fosfataz
Da	Dalton
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DTT	1,4- Dithiothreitol
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
g	Gram
g	Yer çekimi ivmesi
h	Saat
HAP	Histidin asit fosfataz
HAPhy	Histidin asit fitaz
HBF	Halil Bıyık Fungus
IU	Uluslararası enzim ünitesi
kDa	Kilodalton
k _{cat}	Turn over sayısı
K _m	Michaelis-Menten sabitesi
L	Litre
M	Molar
MEA	Malt ekstrakt agar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar

mmol	Milimol
NBS	N-bromo suksinamid
nm	Nanometre
Ort	Ortalama
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PAP	Purple asit fosfataz
<i>p</i> CMB	<i>p</i> -kloromerküri benzoat
pH	H ⁺ iyonu konsantrasyonu
<i>p</i> HMB	<i>p</i> -hidroksimerkürlenzoik asit
PMSF	Fenil metil sülfonil florür
PSM	Fitaz tarama ortamı
rpm	Dakikadaki devir sayısı
S.H.	Standart hata
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SH grubu	Sülfidril grubu
<i>sp.</i>	Tür
SSS	Substrat spesifik bölgesi
TCA	Trikloro asetik asit
TEMED	N,N,N',N'- Tetrametiletildiamin
U	Enzim ünitesi
V _{max}	Maksimum enzim aktivitesi
α	Alfa
β	Beta

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Fitatın fitaz ile hidrolizi	5
Şekil 1.2. Fitik asidin 3-fitaz ve 6-fitaz ile hidrolizi	12
Şekil 1.3. Fitik asit (<i>myo</i> -inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis dihidrojen fosfat).....	18
Şekil 1.4. Mineraller ile kompleks oluşturmuş fitatın hidrolizi	22
Şekil 1.5. Fitazın fitata bağlı fosfat gruplarının hidrolizi ile metalleri, metal bağlı enzimleri ve proteinleri serbest bırakması	23
Şekil 3. 1. Standart inorganik fosfat grafiği.....	56
Şekil 3. 2. Protein standart grafiği.....	57
Şekil 4. 1. Fitaz aktivitesinin taranması.....	77
Şekil 4. 2. <i>A. niger</i> 'in malt ekstrakt agardaki görüntüsü.....	86
Şekil 4. 3. Kantitatif fitaz aktivite tayini ile en iyi fitaz aktivitesine sahip suşun seçim	88
Şekil 4. 4. Enzim üretimi üzerine inokulum miktarının etkisi	89
Şekil 4. 5. Fitaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi	91
Şekil 4. 6. Fitaz üretimi üzerine başlangıç pH'sının etkisi.....	93
Şekil 4. 7. <i>Aspergillus niger</i> UA-D'nin gelişimi ile hacimsel aktivite ve biyokütle değişimi	97
Şekil 4. 8. <i>A. niger</i> UA-D'nin gelişimi ile kültür ortamındaki pH ve biyokütle değişimi	97
Şekil 4. 9. Fitaz enziminin iyon değişim kromatografisinde saflaştırılması	103
Şekil 4. 10. Fitaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisinde saflaştırılması	104
Şekil 4. 11. Saflaştırma adımlarının PAGE görüntüleri.....	106
Şekil 4. 12. Saflaştırma adımlarının SDS-PAGE görüntüleri	106
Şekil 4. 13. SDS-PAGE protein standart eğrisi.....	107
Şekil 4. 14. Ham <i>A. niger</i> UA-D fitazının aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi ...	109
Şekil 4. 15. <i>A. niger</i> UA-D fitazının aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	109

Şekil 4. 16. <i>A. niger</i> fitazının 25 ve 37 °C'deki sıcaklık stabilitesi.....	113
Şekil 4. 17. <i>A. niger</i> fitazının 60, 70 ve 80 °C'deki stabilitesi.....	114
Şekil 4. 18. <i>A. niger</i> UA-D ham fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	117
Şekil 4. 19. <i>A. niger</i> UA-D fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	117
Şekil 4. 20. <i>A. niger</i> UA-D fitaz stabilitesi pH'nın etkisi	120
Şekil 4. 21. <i>A. niger</i> UA-D fitaz aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi.	124
Şekil 4. 22. <i>A. niger</i> UA-D fitaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Michaelis-Menten Grafiği)	126
Şekil 4. 23. <i>A. niger</i> UA-D fitaz aktivitesi üzerine sodyum fitat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk Grafiği)	126
Şekil 4. 24. <i>A. niger</i> fitaz aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA' nın etkisi	133
Şekil 4. 25. <i>A. niger</i> fitaz aktivitesi üzerine inhibitörlerin ve denatürantların etkisi.....	138
Şekil 4. 26. <i>A. niger</i> UA-D fitaz aktivitesi üzerine inorganik fosfatın etkisi	139
Şekil 4. 27. <i>A. niger</i> UA-D sıcaklık stabilitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi.....	141
Şekil 4. 28. <i>A. niger</i> UA-D fitazının stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisi.....	145
Şekil 4. 29. <i>A. niger</i> UA-D fitazının substrat spesifikliği	148

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Fitaz tarama agar ortamının içeriği (PSM)	52
Tablo 3.2. Kantitatif fitaz aktivitesi taramasında reaksiyon bileşenleri	53
Tablo 3.3. Kantitatif fitaz aktivite tayini reaksiyon bileşenleri	54
Tablo 3.4. Standart deney koşulları altında kantitatif fitaz tayini reaksiyon bileşenleri.....	54
Tablo 3.5. İnorganik fosfor miktarının ölçümü.....	56
Tablo 3.6. <i>Aspergillus niger</i> UA-D fitaz üretim ortamının içeriği.....	60
Tablo 3.7. Diyaliz torbasının ön işlemden geçirilmesi.....	63
Tablo 3.8. % 8'lik ayırma jelinin içeriği	67
Tablo 3.9. % 4'lük yoğunlaştırma jelinin içeriği	68
Tablo 3.10. 1 mM metal iyonu içeren deney ortamı	71
Tablo 3.11. 5 mM metal iyonu içeren deney ortamı	71
Tablo 3.12. 10 mM metal iyonu içeren deney ortamı	72
Tablo 3.13. 1 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı	73
Tablo 3.14. 5 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı	73
Tablo 3.15. % 0.5 organik çözücü içeren deney ortamı	75
Tablo 3.16. % 1 organik çözen içeren deney ortamı	75
Tablo 4. 1. Fungusların kalitatif fitaz aktivitesi tarama sonuçları.....	78
Tablo 4. 2. Kantitatif fitaz aktivite tayini	87
Tablo 4. 3. Enzim üretimi üzerine inokulum miktarının etkisi	89
Tablo 4. 4. Fitaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi	91
Tablo 4. 5. Fitaz üretimi üzerine başlangıç pH'sının etkisi.....	94
Tablo 4. 6. <i>Aspergillus niger</i> UA-D'nin büyüme eğrisi.....	96
Tablo 4. 7. Amonyum sülfat çöktürme basamakları	100
Tablo 4. 8. <i>A. niger</i> UA-D fitazının saflaştırma adımları.....	101

Tablo 4. 9. <i>A. niger</i> UA-D ham fitaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	108
Tablo 4. 10. <i>A. niger</i> UA-D fitazının aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	110
Tablo 4. 11. <i>A. niger</i> fitazının 25 ve 37 °C sıcaklıkta stabilitesi.....	114
Tablo 4. 12. <i>A. niger</i> fitazının 60, 70 ve 80 °C sıcaklıkta stabilitesi.....	115
Tablo 4. 13. <i>A. niger</i> UA-D ham fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	116
Tablo 4. 14. <i>A. niger</i> UA-D fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	118
Tablo 4. 15. <i>A. niger</i> UA-D fitaz stabilitesi pH'nın etkisi	121
Tablo 4. 16. <i>A. niger</i> UA-D fitaz aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi.	123
Tablo 4. 17. <i>A. niger</i> UA-D fitaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	125
Tablo 4. 18. <i>A. niger</i> fitaz aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA'nın etkisi.....	132
Tablo 4. 19. <i>A. niger</i> fitaz aktivitesi üzerine inhibitörlerin ve denatürantların etkisi.....	137
Tablo 4. 20. Enzim aktivitesi üzerine inorganik fosfatın etkisi	139
Tablo 4. 21. <i>A. niger</i> UA-D sıcaklık stabilitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi.....	142
Tablo 4. 22. <i>A. niger</i> UA-D fitazının stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisi.....	144
Tablo 4. 23. <i>A. niger</i> UA-D fitazının substrat spesifikliğı	147

1. GİRİŞ

1.1. Mikrobiyal Enzimler

Enzimler, canlılarda kimyasal reaksiyonları çok yüksek hızda katalizleme gücüne sahip moleküllerdir. 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, canlıların doğal ürünleri olması nedeniyle, çevre ile uyumludur. Modern endüstride doğanın kendisine ait teknolojisinin kullanımı, geleneksel işlemlere oranla daha az miktarda atık oluşturarak daha az çevre kirliliğine yol açması, uygun ve ekonomik şartlarda gerçekleştirilebilmesi, enzim kullanımını daha cazip hale getirmektedir (Gümüşel, 2002; Bull vd., 2000; Van Beilen ve Li, 2002).

Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan enzimler genel olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bununla birlikte çok az bir kısmı da bitkisel ve hayvansal kaynaklardan sağlanmaktadır. Hayvansal kaynaklardan enzim üretiminin, pahalı olmasının yanında, arz ve talep gibi faktörler tarafından etkilenmektedir. Buna karşılık, birçok bitkisel kaynaklı enzim, nispeten daha kolay elde edilebilir. Fakat bitkisel kaynakların, endüstriyel ham madde olarak kullanılmaları, gıda ihtiyaçlarına bağlıdır.

Mikrobiyal enzimler yenilenebilir kaynaklardan üretilir ve biyolojik olarak bozulabilir. Enzimlerin üretiminden elde edilen atıklar, toprak verimini arttırmada gübre olarak tarımsal arazilerde kullanılabilir. Çeşitli sektörlerde çevre ve aletlere zararlı etkilere neden olan kimyasalların kullanıldığı eski metodların yerini, biyolojik olarak yıkıma uğrayan enzimlerin kullanıldığı yeni işlemler almaktadır. Enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların tercih edilmesinin diğer nedenleri ise, oluşturdukları yan ürünlerin az olması, 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 vd., 2002). Günümüzde endüstride 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 ksilanaz gibi) ve % 10 kadar ise analitik ve farmasötik enzimlerdir (Rao vd., 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 vd., 2002; Schallmey vd., 2004).

1.2. Enzimlerin Tarihçesi

İnsanlar binlerce yıl öncesinden bu yana enzimlerden yararlanmışlardır. Örneğin alkol fermentasyonu, bira ve ekmek yapımı gibi işlemler ilk biyoteknolojik işlemler olarak tanımlanabilirler. Şarap üretimi için mayaların kullanımı ilk olarak M.Ö. 2100 civarında Hammurabi Yasalarında bahsedilen çok eski bir tekniktir. Fakat aynı zamanda ham enzim preparatlarının kullanımı canlı organizmanın tamamının kullanımından daha eskidir. Homerus'un İlyada (Truva) destanında (MÖ 600) peynir üretiminde sütün kesilmesi için "ficin" denilen incir ağacından elde edilen sıvının (incir enzimi) kullanımından bahsedilmiştir (Buxbaum, 2007).

Binlerce yıl öncesinde enzimlerin ve enzim üreten organizmaların kullanılmasına karşılık, enzimler hakkında bilimsel denebilecek araştırma ve bulgular ancak geçtiğimiz yüzyılda gözlenmeye başlanmıştır. Fransız kimyager Reamur 18. yüzyılda atmaca mide suyunun eti sindirebildiğini, kemiği yumuşattığını fakat mide suyuna bırakılan bitki materyallerinin değişmediğini saptayarak, ilk kez enzim özgülüğünü kanıtlamıştır. Spallanzani 1783 yılında, mide suyunun aktif bileşeninin depolama sırasında aktivitesini kaybettiğini ve stabil olmadığını göstermiştir (Buxbaum, 2007). Kirchoff 1811 yılında, buğday nişastasının zamanla dekstrin ve şekerlere dönüştüğünü belirlemesi, 1830 yılında Robiquet, Boutron ve Chalan'ın amigdalinin acı badem tarafından hidrolizlendiğini keşfetmesi, enzimoloji konusundaki ilk çalışmalar olarak gösterilebilir (Telefoncu, 1986).

Fransız kimyagerler Payen ve Persoz 1833 yılında, nişasta hidrolizinde asitten daha etkili bir maddeyi filizlenmiş arpadan ekstrakte ettiler. Bu maddenin, ekstraktan etanol ile çöktürülerek elde edilmesi, enzimoloji alanındaki ilk saflaştırma girişimlerinden biri olmuştur. Alman bilim adamı Theodor Schwann

1834 yılında, mide suyundaki hidroklorik asit ve mide suyunun bilinen diğer tüm bileşenlerinden daha etkin bir şekilde, eti hidrolizleyebilen pepsini izole etti (Buxbaum, 2007). Berzelius 1835 yılında, bugün amilaz olarak bilinen diastaz ile nişastayı hidrolizlemeyi başarmış ve 1838 yılında ferment olarak adlandırılan enzimler için, katalizör (biyokatalizör) terimini kullanmıştır. Böylece canlı organizmalardaki katalizörlerin kimyasal reaksiyonları daha hızlı ve daha hafif şartlar altında gerçekleşmesine imkân verdiği ortaya çıktı.

Enzimlerin keşfinin başladığı ilk yıllarda pek çok araştırmacı, fermentasyon olaylarında mayalar ve mayaların etkilerini göz önüne aldıkları için, enzimleri tanımlamaya yönelik olarak ferment terimini kullanmışlardır. 1850'lerde Louis Pasteur şekerin, maya vasıtasıyla alkole fermentasyonunun "fermentler" aracılığıyla, katalizlendiği sonucuna varmıştır. Bu fermentlerin, canlı maya hücrelerinin yapısından ayrılmaz olduğunu kabul etmiştir. Hansen 1874 yılında, enzim preparatının (rennet) standart bir şekilde üretildiği ilk ticari firma olan C. Hansen Laboratuvarını kurmuştur. Frederick W. Kühne 1878'de bu moleküllere (fermentlere) "enzim" adını vermiştir (Nelson ve Cox, 2004; Whitehurst ve van Oort, 2010). Bugün enzimler ve mikroorganizmalar olarak ayrılan iki olgu, o tarihlerde organize edilmemiş fermentler ve organize fermentler olarak iki gruba ayrılmıştır. Enzim terimini ilk kullanan ise 1878 yılında Kühne olmuştur (Buxbaum, 2007). Fischer 1894 yılında, enzimlerin substratlarına olan spesifikliklerini ortaya koyarak, anahtar-kilit modelini tanımlamış ve bazı temel kavramların enzimoloji alanına girmesini sağlamıştır.

Alman bilim adamları Hans ve Eduard Buchner 1897 yılında, canlı organizma olmadan maya ekstratları ile şekerin alkole dönüşebildiğini keşfetmiş ve fermentasyonu sağlayan moleküllerin canlı hücre yapısından çıkarıldığında da fonksiyonuna devam ettiğini ispat etmiştir. Bununla beraber, yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerin doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda kullanılabilmesi düşüncesi, yeni enzimlerin izolasyonu ve onların katalitik özelliklerini inceleme çalışmalarına hız kazandırmıştır (Nelson ve Cox, 2004; Buxbaum, 2007). Croft-Hill 1898 yılında, maya ekstraktı (α -glukozidaz) kullanarak, enzimatik olarak ilk kez izomaltoz sentezlemiştir. Kastle ve Loevenhart 1900 yılında, yağ ve diğer esterlerin lipazlarla hidrolizlendiğini kanıtlamışlardır.

Willstaetter ve arkadaşları 1922-1928 yılları arasında, bugün anladığımız anlamda saflaştırma çalışmalarına başlamışlardır. James B. Sumner 1926 yılında, Cornell Üniversitesinde ilk kez üreaz enzimini fasulyeden izole ederek, kristalize etmeyi başarmıştır. Summer, üreaz kristallerinin tamamen proteinden oluştuğunu bulmuş ve bütün enzimlerin protein olduklarını ileri sürmüştür. Bu çalışması Summer'e 1947'de Nobel ödülünü kazandırmıştır (Bennet, 1969; Holum, 1968). John Northrop ve Moses Kunitz'ın 1930'larda pepsin ve tripsini kristalize etmeleri ve bunların protein olduklarını bulmalarından sonra, Summer'ın vardığı sonuç geniş çapta kabul görmüştür. Enzimlerin moleküler yapısı tam olarak anlaşılmamasına rağmen, Haldane katalitik reaksiyonlarda kullanılabilen enzim ve substrat arasındaki zayıf bağların etkileşimi ile ilgili dikkat çekici bir öneri ileri sürmüştür. 1940'larda saflaştırılmış enzim sayısı çok az iken, 1980'lerde 200 tanesi kristal formu oluşturabilecek saflıkta, 1500 tanesi ise yüksek düzeyde saflaştırılmıştır.

1900'lü yılların başlarında Svedberg tarafından geliştirilen ultrasantrifüj tekniği ile enzimlerin molekül kütlelerine göre ayırımının yapılabileceğinin belirlenmesi, ribonükleazın aminoasit dizisinin aydınlatılması (1960), lizozimin üç boyutlu yapısının X-ışınları kristalografisi ile belirlenmesi (1965) enzimlerin kimyası ve yapısı alanındaki ilk çalışmalar olmuştur. 1950-1960 yıllarında yapılan enzimolojik çalışmalarda, enzimlerin yapısal esnekliği ile ilgili bilgilerin elde edilmesi ile enzimlerin katalitik gücü ve spesifikliğini açıklamak üzere, Koshland 1958 yılında, indüklenmiş uyum (induced-fit) modelini önermiştir.

1950 yıllarında, enzimler çeşitli destek materyallerine immobilize edilmeye başlanmıştır. Immobilize enzimlerin ilk endüstriyel uygulamaları glukozun fruktoza izomerasyonu (yüksek fruktozlu mısır şuruplarının üretimi), optik saf aminoasitlerin üretimi, penisilin G'nin hidrolizidir.

1950-1960 yılları arasında enzimlerin deterjan ve nişasta endüstrisinde, tatlandırıcılar ve optik saf aminoasitlerin üretiminde kullanılmaları, enzim teknolojisinin daha da ilerlemesine neden olmuş ve çok sayıda enzim saflaştırılarak karakterize edilmiştir.

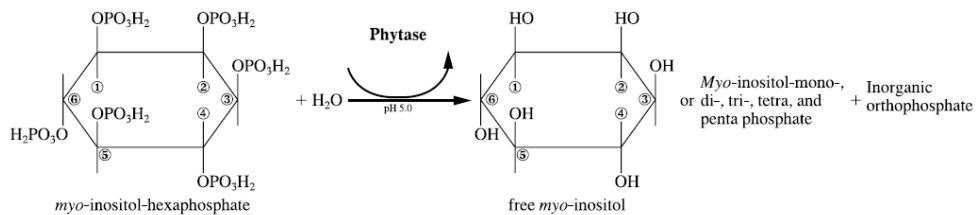
Merrifield ve arkadaşları tarafından 1969 yılında, ribonükleaz enziminin aminoasit öncüllerinden kimyasal olarak sentezlendiği bildirilmiştir. O zamandan beri binlerce enzim, X-ışını kristalografisi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) teknikleri ile incelenmiştir. Genetik mühendisliği tekniklerinin uygulanması enzim

üretimi verimliliğini arttırmış ve hatta protein mühendisliği ve evrimsel tasarım sayesinde, enzimlerin spesifik özelliklerinin iyileştirilmesine olanak sağlamıştır. 2004’de ilk bilgisayarda tasarlanmış enzim bildirilmiştir (Whitehurst ve van Oort, 2010).

Thomas R. Cech ve Sidney Altman 1980’lerde, protein yapısında olmayan enzim benzeri aktivite gösteren ribozimleri ilk defa keşfederek, tüm enzimlerin protein olduğu fikrini değiştirmişlerdir. Thomas R. Cech ve Sidney Altman 1989 yılında, ‘‘RNA katalitik özelliklerinin keşfi’’ ile kimya alanında Nobel Ödülü kazanmışlardır.

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

Fitazlar son yirmi yılda insan sağlığı, beslenme ve çevrenin korunmasında dikkat çeken enzimlerden biri olmuştur. Fitazlar, bitki tohumlarında fosfatın temel depo formu olan fitatın inositol çekirdeğinden, ortofosfat gruplarını ayırarak *myo*-inositol fosfatlar, *myo*-inositol ve inorganik fosfata hidrolizini katalizleyen enzimlerdir (Şekil 1.1). Fitazlar genelde histidin asit fosfataz ailesine ait olup, fosforil transfer reaksiyonunda, fosfohistidin ara ürünlerini kullanan fosfotazların alt sınıfıdır (Van Etten, 1982; Pasamontes vd., 1997; Lei vd., 2007).



Şekil 1.1. Fitatın fitaz ile hidrolizi (Liu vd., 1998)

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). İlk olarak fitaz aktivitesinin Suzuki vd. (1907) tarafından buğday kepeğinde ve McCollum ve Hart (1908) tarafından buzağuların kanında bulunduğu

bildirilmiştir. Daha sonra bitki, maya, bakteri ve funguslarda varlığı belirlenmiştir. Ayrıca insan ve hayvanlarda ince barsak mukozası ve kalın barsaklarda bulunan mikroflora tarafından endojen olarak üretildiği tespit edilmiştir. Fakat bitki ve mikrobiyal fitaz aktivitesinin aksine, insan ve hayvanlarda bulunan endojen fitazın aktivitesinin daha önemsiz olduğu saptanmıştır (Weremko vd., 1997; Kumar vd., 2010).

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

İlk ticari fitaz enzimi olan Natuphos, ilk olarak *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 vd., 1993; Han ve Lei 1999) ve 1991'de piyasaya çıkmıştır.

Fitazlar bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan izole edilmiştir. Optimum pH (alkali ya da asit fitazlar), katalitik mekanizmaları (histidin asit fosfataz (HAP), β -propeller fitaz, sistein fosfataz ya da purple asit fosfataz) ya da fitatın hidrolizinin stereospesifliğine (3- ya da 6-fitaz) göre gruplandırılmıştır.

Fitazlar genelde 45-60 °C aralığındaki sıcaklıklarda aktif ve geniş pH aralığında termostabildirler. Fitazlar, 2.2-8.0 arasında değişen optimum pH'ya sahiptir. Mikrobiyal fitazların çoğu özellikle fungal kökenli fitazlar, 4.5-5.6 arasında optimum pH'ya sahiptir. Bazı bakteri fitazları, özellikle *Bacillus* suşlarından elde edilen fitazlar, 6.5-7.5 arasında optimum pH'ya sahiptir. Bitki tohumlarından elde edilen fitaz enzimlerinin optimum pH'sı, 4.0-7.5 aralığında iken, genelde optimum pH'ları 4.0-5.6 arasındadır (Dvorakova, 1998).

Escherichia coli, *Klebsiella terrigena* (Greiner vd., 1993; Greiner vd., 1997), *Bacillus subtilis* (natto) (Shimizu, 1992) bakterilerinden ve funguslardan (Dvorakova vd., 1997) elde edilen fitazlar, monomerik enzimlerdir ve izole edildikleri kaynaklara bağlı olarak moleküler ağırlığı 35-700 kDa arasında değişmektedir. Bunların aksine *Klebsiella aerogenes*'den izole edilen fitaz enzimi, 10-13 kDa ağırlığında kısa bir peptidten oluşmaktadır (Liu vd., 1998). Bakteri ve funguslardan elde edilen fitazlar, Michaelis-Menten sabiti (K_m), optimum pH ve

ısı stabilitesi gibi fizikokimyasal özelliklerinde farklılık göstermektedir (Liu vd., 1998; Tambe vd., 1994). Bakteriye fitazlar genelde funguslardan elde edilen fitazlara göre, daha küçük moleküler ağırlığa sahiptir. Fungal fitazların öngörülen moleküler ağırlıkları genelde 50 kDa iken, deneysel sonuçlarda elde edilen verilerin 65-70 kDa arasında olması, fungal fitazların glikozillenmiş olduğu göstermektedir (Choi vd., 2001; Golovan vd., 2000).

Son zamanlarda yapılan fitaz araştırmalarının amacı, tek mideli hayvanların besinlerindeki fitata bağlı fosforun kullanımını arttırarak, gübrelerinde çevreye fosfor atılımını azaltmaktır. Ayrıca, insanların beslenmesinde fitazın kullanılması besinle alınan fitata bağlı minerallerin serbest kalmasını ve insan sağlığına faydalı özel inositol fosfatların oluşumunu sağlar (Lei vd., 2007).

1.3.1. Fitazların Optimum pH'ya Göre Sınıflandırılması

Fitaz enzimleri, optimum pH'ları esas alınarak histidin asit fosfataz ve alkali fitaz olarak iki sınıfa ayrılır. Histidin asit fosfataz, pH 5.0 civarı optimum aktivite gösterirken, alkali fosfataz pH 8.0 civarında aktivite göstermektedir (Baruah vd., 2007). *Bacillus* dışında bir çok bakteri, fungus ve bitki fitazları geniş substrat özgülüğü olan histidin asit fosfataz (Selle vd., 2007; Van Etten vd., 1991) sınıfına ait olması nedeniyle, gıda endüstrisinde alkali fitazdan daha çok araştırılmıştır (Kumar vd., 2010).

Histidin asit fosfataz sınıfının bütün üyeleri aktif bölgelerinde korunan RHGXRP motiflerine sahiptirler (Van Etten vd., 1991). Histidin asit fosfataz sınıfı geniş bir substrat spesifikliği gösterdiği asidik pH aralıklarında, metal içermeyen fitata hidrolizlediği ve hidroliz sonucunda son ürün olarak *myo*-inositol monofosfatı oluşturduğu bildirilmiştir. Histidin asit fosfatazlara göre, substrat spesifikliği daha az olan alkaline fosfataz enzimleri, kalsiyum fitata karşı oldukça spesifiktir ve hidroliz sonucu son ürün olarak *myo*-inositol trifosfatları oluşturduğu bildirilmiştir (Oh vd., 2004).

Escherichia coli (Greiner vd., 1993), *Klebsiella terrigena* (Greiner vd., 1997), *Aspergillus niger* (Skowronski, 1978), *Aspergillus fumigatus* (Ullah vd., 2000), konola tohumları (Houde vd., 1990) ve buğdaydan (Konietzny vd., 1995) elde edilen histidin asit fosfatazların optimum pH'sı 4.5-5.5 aralığında olduğu bildirilmiştir.

Bacillus (Powar ve Jagannathan, 1982; Shimizu, 1992; Kerovuo vd., 1998; Kim vd., 1998; Choi vd., 2001; Idriss vd., 2002) ve bazı bitki tohumları, *Typha latifolia* L. poleni (Hara vd., 1985) ve *Lilium longiflorum* poleninden (Scott ve Loewus, 1986) elde edilen alkalın fitaz enzimleri 6.5-8.0 aralığında optimum pH'ya sahiptir.

1.3.2. Fitazların Katalitik Merkeze Göre Sınıflandırılması

Bitki, hayvan ve mikrobiyal yaşamın çeşitli formlarında bulunan farklı fitazların canlıların kendine özgü beslenme gereksinimlerini karşılamak için evrimleştiği açıktır. Enzimin katalitik etkisi ve özgülüğü ile moleküler yapısal bileşenleri arasında doğrudan bir bağlantı olduğu bilinmektedir. Bu yüzden, evrimsel süreçte fitazın temel spesifik yapısal bileşenleri ile diğer kısımları, çeşitli substratları katalizlemek için yapısal olarak değişmiştir. Doğada fitatın hidrolizinin evrimleştiği katalitik mekanizmaların kesin sayısı, gelecekte yapılacak çalışmalar ile tespit edilecektir. Bugün için fitik asidi hidrolizleyebilen dört fosfataz enzimi bilinmektedir: (1) Histidin Asit Fosfataz (HAP), (2) β -Propellar Fitaz (BPPHy), (3) Sistidin Fosfataz (CP) and (4) Purple Asit Fosfataz (PAP). Bunların her birinin, çeşitli ortamlarda fitik asidi substrat olarak kullanan, farklı katalitik mekanizmalara sahiptir ve kendine özgü yapısal özellikleri vardır (Lei vd., 2007).

1.3.2.1. Histidin asit fosfataz (HAP)

HAP'ın tüm üyeleri ortak bir katalitik mekanizma ve spesifik bir aktif bölge bileşenine sahiptir. N-terminal aktif bölge bileşeni RHGXRXR ve C-terminal bileşeni HD'dir (Wodzinski ve Ullah, 1996). Polipeptid zincirinin bu uzak dizileri uygun bir şekilde katlandığında, iki aşamalı reaksiyon olan fosfomonoesterlerin hidrolizini başlatan, tek katalitik merkezi oluşturacak şekilde birleşir (Van Etten vd., 1991).

Asit fosfotazların geniş bir grubu olan HAP'lar, türüne göre bir dizi farklı substratları hidrolizleyebilir. Bu nedenle, bütün HAP'ların etkin bir şekilde fitatı hidrolize etmediklerini belirlemek önemlidir. Fitat oldukça negatif yüklü bir substrat olması nedeniyle, enzimin aktif bölgesi katalitik mekanizma için substratın bu özelliğine uyum sağlayabilmelidir. Bu nedenle, hem ökaryot hem de prokaryotlarda, fitatı etkin bir şekilde hidrolizleyen HAP'ların aktif bölgesi

substratın bağlanmasını kolaylaştırmak için, asidik pH'larda ağırlıklı olarak pozitif yüklüdür. Oh vd. (2004) fitatı hidrolizleyebilen HAP'ları etkin bir şekilde belirlemek için, histidin asit fitaz (HAPhy) terimini önermişlerdir. Hem ökaryotik hem de prokaryotiklerde histidin asit fitazlar HAPhy'ler olarak bilinir. En iyi karakterize edilen prokaryotik HAPhy *E. coli* fitazıdır (Greiner vd., 1993). Bu enzimin yapısının 3 boyutlu moleküler modeli mevcuttur (Lim vd., 2000). HAPhy'ler ökaryotlarda birçok fungus izolatlarından ve mısırdan klonlanmıştır (Mullaney vd., 2000). En çok çalışılan fungal fitazlar *Aspergillus niger* ve *Aspergillus fumigatus*'tur.

HAPhy'lerin yapısının belirlenmesinde ve stabilize edilmesinde en önemli faktör glikozilasyondur. Proteinlere polisakkarit eklenen bu işlem enzime kararlılık kazandırır ve enzimin doğru katlanmasına yardımcı olur. Bugüne kadar karakterize edilmiş ekstraselüler fungus fitazların çoğu glikoprotein yapısındadırlar. HAPhy'lerde diğer önemli yapısal bileşen, fitazlarda katalitik aktiviteye olanak sağlayan, uygun 3 boyutlu yapının kazandırılmasında önemli rol oynayan disülfid köprüleridir (Wang vd., 2004; Mullaney ve Ullah, 2005; Kostrewa vd., 1997). *A. niger* ve *A. fumigatus* PhyA'larında mevcut 10 sistein kalıntılarının tümü, disülfid köprülerin oluşumunda yer alırlar. *E. coli* fitazında sekiz sisteinin tümü, disülfid bağları içinde yer alırlar (Lim vd., 2000). Bunun yanında bu fitazlarda alan-hedefli mutajenez, bir disülfid köprüsü çıkarmak için kullanıldığında, önemli ölçüde aktivite artışı elde edilmiştir (Rodriguez vd., 2000). Disülfid köprüsünün kaldırılması çalışma alanının esnekliğinin artmasına izin verdiğinden dolayı enzimin katalitik etkinliğini arttırdığı ileri sürülmüştür.

Enzimdeki yeni aktif bölgenin yapısal karakterizasyonu ve katalitik çalışmaları farklı substratlar ile etkileşmesini kolaylaştıran önemli bir rol üstlenmiştir (Lei vd., 2007). Kostrewa vd. (1999) *A. niger* PhyA molekülünde enzimin aktif bölgesini çevreleyen ve "gatekeeper" olarak görev alan substrat spesifik bölgesinde (SSS), çeşitli amino asit kalıntıları tanımlamışlardır. *A. niger* NRRL 3135'in substrat spesifik bölgesinde iki asidik ve dört bazik amino asit kalıntıları (E228, D262, K91, K94, K300 ve K301) saptanmıştır (Kostrewa vd., 1999; Mullaney vd., 2000). *A. niger* SSS'de pH 2.5'de dört bazik amino asitin (K91, K94, K300 ve K301) hepsi pozitif yüklüdür ve fitat molekülüne bağlanmaktadır. Ayrıca SSS'nin bölgesel elektrostatik alanı pH 5.0'e yükseldiğinde bile fitat için uygun olmaya devam etmektedir.

Wyss vd. (1999a) bütün bilinen mikrobiyal HAPhy'ları substrat spesifikliğine dayanarak iki sınıfa ayırmışlardır. İlk sınıfın substrat spesifikliği geniş, fakat fitat için düşük substrat spesifikliğine sahiptir. İkinci sınıf ise, substrat spesifikliği daha sınırlı iken, fitata karşı oldukça spesifiktir. Enzimin SSS bileşenindeki 300. amino asit kalıntısı ile fitat için substrat özgülüğü arasında bir bağıntının mevcut olduğu belirlenmiştir (Mullaney vd., 2002). Bu çalışmada ayrıca, 300. amino asit kalıntısı değişken iken, 301. kalıntı lizin (K) olarak kesin korunduğu ortaya çıkmıştır. Wyss vd. (1999a) fitatı hidrolizleyebilen enzimlerin, fitata karşı yüksek spesifik aktiviteye sahip olanlarında, 300. amino asit kalıntısının ya bazik ya da asidik olduğunu, fitata karşı düşük spesifik aktivite gösteren fitazların aynı pozisyonadaki amino asit kalıntısının nötral olduğunu saptamışlardır. SSS bölgesinde ve enzimin fitik asite yüksek spesifitesinde, lizin kalıntısının önemi, alan-hedefli mutajenez ile saptanmıştır (Mullaney vd., 2002).

Optimum pH ve substrat özgülüğünün belirlenmesinde SSS'nin önemi, ikinci ekstraselüler *A. niger* fitazı, PhyB'nin karakterize edilmesi ile açıkça anlaşılmaktadır (Ullah ve Cummins, 1987). PhyB sadece *A. niger* izolatından mevcut olduğu bildirilmiştir. PhyB'nin optimum pH'sı 2.5 olup, PhyA'nın aksine pH 5'de fitatı hidrolizleyemez. PhyB ve PhyA HAP'ların aktif bölge özellikleri ile benzerlik gösterirken, SSS'leri farklıdır. Kostrewa vd. (1999) PhyB'nin SSS'nin sadece iki asidik amino asitten (D75 ve E272) oluştuğunu saptamışlardır. Bu durum, PhyB'nin PhyA'dan neden farklı bir pH profiline sahip olduğunu açıklar. pH 2.5'de asidik amino asitler yüksüz olurken, pH 5.0'de PhyB'nin SSS'indeki asidik amino asitler negatif yüklenir. Fitat gibi bütün negatif yüklü substratlar, bu nedenle yüksek pH'larda geri itilecektir. PhyB'nin SSS'i daha nötr elektrik alanına sahip olduğundan, PhyA'dan daha geniş çeşitlilikteki fosfomonoesterleri katalizleyebilir. *A. niger* PhyA SSS'inin oldukça pozitif elektrik alanı, fitat gibi negatif yüklü substratların bağlanması için optimize edilmiştir.

1.3.2.2. β - Propeller fitazı (BPPHy)

β -Proller fitaz (BPPHy) yeni bir sınıfı temsil etmektedir, diğer bilinen fosfotazlar ile bir benzerlik sergilememektedir (Kim vd., 1998; Kerovuo vd., 1998; Ha vd., 2000). β -propeller fitaz (BPPHy) ismi, moleküler yapısının belirlenip aydınlatılmasından sonra, yapısında bulunan β -tabakalar ve altı kanatlı bir pervaneye benzemesinden dolayı verilmiştir (Ha vd., 2000; Shin vd., 2001).

BPPHy'ler ilk olarak *Bacillus* ve ilgili türlerinde olduğu bildirilmiştir. Yapılan bütün çalışmalar bu enzimlerin hem katalitik faaliyetleri hemde termostabilitesi için Ca^{2+} 'a gerek duyduğu bildirilmiştir. Bu gereksinim Ca^{2+} 'nin fitata bağlanarak elektrostatik etkileri meydana getirdiği şeklinde açıklanmıştır. Böylece HAPHy'lerde olduğu gibi substrat biyokatalitik dönüşümünün meydana gelmesi için katalitik bölgeye bağlanır. Kinetik çalışmalar pH 7.0-8.0 aralığında gerçekleştirilmiş ve BPPHy'lerin bu pH aralıklarında kalsiyum fitatı hidrolizleyebildiği saptanmıştır (Oh vd., 2001). BPPHy'ler katalitik mekanizmalarında iki temel bileşen içermektedir. Biri substrata atakta bulunan "affinite bölgesi" diğeri ise fosfat gruplarını hidrolizlendiği "ayırma bölgesi"dir (Shin vd., 2001).

Bacillus amyloliquefaciens termostabil fitazının (TS-phy) moleküler yapısı tanımlanmıştır. Fitatı hidroliz eden bu enzim, histidin asit fosfotaz sınıfının bir üyesi değildir ve bilinen herhangi bir fosfataz sınıfına belirgin bir benzerlik göstermek yerine, tamamen yeni bir enzim sınıfı temsil ettiği saptanmıştır. HAPHy'in aksine, oldukça çalışılan bir enzim sınıfıdır (Ha vd., 2000).

1.3.2.3. Sistidin fosfataz (CP)

Rumendeki belirli mikroorganizmalarda tespit edilmiştir. Bu nedenle, ruminantlar fitik asidi hidrolizleyebilirken, tek mideli hayvanlar fitik asidi hidrolizleyemezler. Bu enzim anaerobik rumen bakterisi *Selenomonas ruminantium*'da saptanmıştır. Monomerik bir enzim olup, 46 kDa molekül ağırlığında, pH 4.0-5.5 ve 50-55 °C sıcaklıkta aktif olan bir enzimidir. Bu enzimin yapısı ne HAP'a ne de BPP'ye benzemektedir. Çünkü aktif bölgesinde HCXXGXXR(T/S) amino asit kalıntıları içermektedir (Lei vd., 2007).

1.3.2.4. Purple asit fosfataz (PAP)

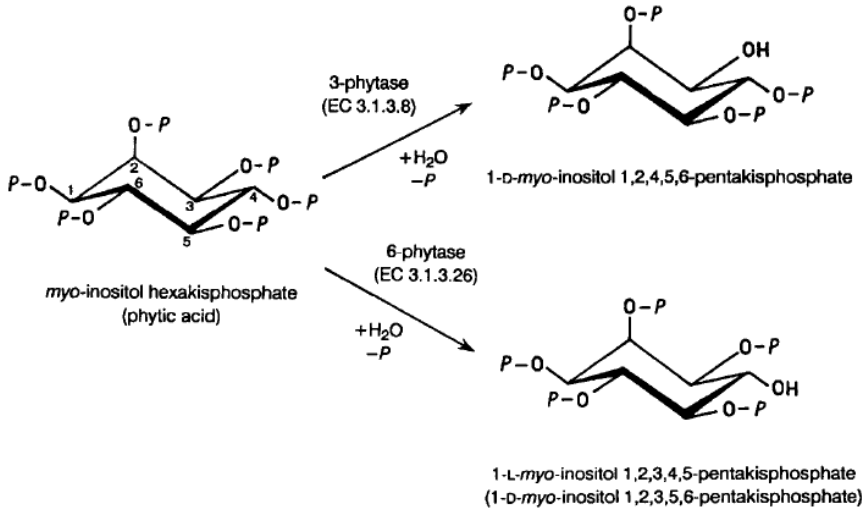
Purple asit fosfataz, çimlenmekte olan soya fasülyesi kotiledonlarından izole edilmiştir. PAP'lar aktif bölgesinde DXG..GDXXY.GNH(E,D)..VXXH..GHXH dizisine sahip olup, 7 tane metal bağlayan aminoasit kalıntısı içeren (D, D, Y, N, H, H, H) metaloenzimlerdir. Ayrıca; bitkilerde, hayvanlarda, funguslarda ve bakterilerde de saptanmıştır. Bitkilerde küçük monomerik proteinler (~35 kDa) ve büyük homodimerik proteinler (~55 kDa) olarak iki sınıfa ayrılmıştır. Diğer

fitazlarla karşılaştırıldığında fitatı hidrolizleme yeteneği oldukça düşüktür (Lei vd., 2007).

1.3.3. Fitazların Stereospesifikliğine Göre Sınıflandırılması

IUPAC-IUB (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği ve Uluslararası Biyokimya Birliği) fitazın, fitat molekülünün hidrolizini başlatan bölgeye bağlı olarak, iki sınıfa ayrılmasına karar vermiştir (Selle vd., 2007). Bunlar, 3-fitaz (EC 3.1.3.8. veya *myo*-inositol hegzafosfat 3- fosfohidrolaz) ve 6- fitazdır (EC 3.1.3.26 veya *myo*-inositol hegzafosfat 6- fosfohidrolaz) (Şekil 1.2).

3-Fitaz, *myo*-inositol hegzafosfat halkasındaki C 3 pozisyonundaki fosfor kalıntısını öncelikli olarak hidrolizleyerek, *D*-*myo*-Ins-1,2,4,5,6-pentafosfat ve ortofosfat oluşturur. 6-Fitaz ise, *myo*-inositol hegzafosfat halkasındaki C 6 pozisyonundan fosfatı öncelikli olarak hidrolizler ve hidroliz sonucunda *D*-*myo*-Ins-1,2,3,4,5-pentafosfat ve ortofosfat oluşur (Selle ve Ravindran, 2007). Mikrobiyal fitazlar genellikle 3-fitaz sınıfında yer alırken, bitkisel kökenli fitazlar 6-fitaz sınıfında yer almaktadır (Konietzny ve Greiner, 2002). Fakat *A. niger*'den izole edilen fitaz, 3- fitaz aktivitesi gösterirken, *Peniophora lycii* ve *E. coli* 6-fitaz aktivitesi gösterir (Kumar vd., 2010).



Şekil 1.2. Fitik asidin 3-fitaz ve 6-fitaz ile hidrolizi (Dvorakova, 1998)

1.4. Fitaz Enziminin Kaynakları

1.4.1. Bitkisel Fitazlar

Fitaz aktivitesi hububat, bakliyat ve yağlı tohumlarda (Viveros vd., 2000) ya da avokado ve taze soğan yaprakları gibi oldukça tüketilen meyve ve sebzelerde tespit edilmiştir (Phillippy ve Wyatt, 2001). Bazı tahıl taneleri (buğday, kavuzlu buğday, çavdar, arpa, tritikale) 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 vd., 1997).

Bitkilerden elde edilen fitazlar genelde optimum pH'sı 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 μ M; k_{cat} 43-704 s^{-1} ve spesifik aktivite 43-636 U/mg protein). Moleküler ağırlıkları 47-76 kDa'dur (Lei vd., 2007).

Histidin asit fosfotaz ailesindeki bitkisel fitazlar, genellikle 6-fitaz olarak kabul edilir. Ancak, yapılan çalışmalarda bitkisel fitazların bazılarının (Lupin LP11 and LP12) ortofosfatı hidrolizlemeye, inositol halkasının D-3 pozisyonundan başladığı belirlenmiştir (Greiner vd., 2002). Bazı bitkisel fitazların alkalik fosfataz ya da purple asit fosfataz olduğu saptanmıştır. Zambak poleni fitazının optimum pH'sının 8.0 ve sıcaklığının ise, 55 °C olduğu bildirilmiştir (Jog vd., 2005). Enzimin kalsiyum tarafından aktive olduğu, EDTA tarafından inhibisyona uğradığı ve son ürün olarak *D-myo-Ins-1,2,3-trifosfat* açığa çıktığı ve dar bir substrat spesifikliğine sahip olduğu bildirilmiştir. Hegeman (2001) çimlenmiş soya fasüyesinden izole edilen fitaz geninin, histidin asit fosfataza hiçbir benzerlik göstermediğini, fakat iki çekirdekli Fe(III)-Me(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.

Optimum pH'sı asidik olan bitki fitazlarının yanısıra alkali ortamda optimum aktivite gösteren bitki fitazları da mevcuttur. 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.

Asidik fitazlara soya fasülyesi tohum fitazı (Gibson ve Ullah, 1988), buğday kepeğinin F₁ fitazı (Lim ve Tate, 1973), *Lilium longiflorum* polen fitazı, (Baldi vd., 1988) ve *Petunia hybrida* polen (Jackson ve Linkens, 1982) fitazları örnek verilebilir. Asidik fitazlar, fosforlanmış çeşitli substratlara karşı aktivite göstermektedir (Gibson ve Ullah, 1990). Buğday kepeği fitazının, fitik asit ve bütün *myo*-inositol fosfatın ara ürünlerinin *myo*-inositol-2-fosfata hidrolizlediği bildirilmiştir. Mung fasulyesi kotiledon fitazının, optimum pH'sının 7.5 olmasına rağmen, asidik grubun enzimatik özelliklerini sergilemektedir (Laboure vd., 1993).

Alkali fitazlar *Lilium longiflorum* (Baldi vd., 1988) ve *Typha latifolia* (Hara vd., 1985) bitkilerinin farklı iki polen türünde tanımlanmıştır. Alkali fitazlar, asidik fitazdan farklı olarak, fitata oldukça spesifiktir ve üç ya da daha az ester grupları içeren *myo*-inositol fosfatları katalizleyemediği bildirilmiştir (Baldi vd., 1988).

1.4.2. Hayvansal Fitazlar

Fitaz aktivitesi çeşitli hayvan türlerinin dokularında tespit edilmesine (Bitar ve Reinhold, 1972) rağmen, hayvansal kaynaklı fitazların hiçbirinin moleküler karakterizasyonu tamamlanmamıştır. Bu enzimlerin çoğu 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 vd., 2002).

Fitazlar bağırsak epitel hücre membranından izole edilmiş olsa da (Maenz ve Classen, 1998; Ellestad vd., 2002), tek mideli hayvanlarda besinsel fitat fosforunun kullanılabilirliğini arttırmak için, düşük maliyetli ekzojen fitazın ilave edilmesi hayvansal fitazın araştırılmasını gölgede bırakmıştır. Kalın bağırsak veya rumende bulunan fitaz aktivitesi esasen mikrobiyal kökenlidir (Wise ve Gilbert, 1982; Yanke vd., 1998).

1.4.3. Mikrobiyal fitazlar

Fitazlar bugüne kadar birçok fungus, maya, bakteri ve protozoalardan izole edilmiştir. Bu enzimlerin çoğu, histidin asit fosfotaz ya da alkali fitazın alt familyasına aittir. Kinetikleri, stereospesifiklikleri ve biyokimyasal özelliklerinde önemli farklılıklar gösterir. Çeşitli mikrobiyal fitazlar, hayvan yemi ilavesi olarak ticarileştirilmiştir (Lei vd., 2007).

1.4.3.1. Bakteri fitazları (PhyC)

Bakterilerden izole edilen fitazlar glikolizasyona uğramayan histidin asit fosfataz yada β -propeller yapılı alkali fitazlardır (Lei vd., 2007). Bakteriyal fitazların enzim aktiviteleri 200-388 U.ml⁻¹ arasında olduğu bildirilmiştir (Quan vd., 2001). Bazı bakteriyal fitazlar, özellikle *Bacillus* türlerinden elde edilenlerin, çoğunun optimum pH'ları 7.0-7.5 ve sıcaklıkları ise 50 °C olduğu bildirilmiştir.

Aerobacter aerogenes (Greaves vd., 1967), *Pseudomonas* sp. (Irving ve Cosgrove, 1971), *Bacillus subtilis* (Powar ve Jagannathan, 1982), *Klebsiella* sp. (Shah ve Parekh, 1990), *Bacillus subtilis* (natto) N-77 (Shimizu, 1992), *Escherichia coli* (Greiner vd., 1993), *Klebsiella aerogenes* (Tambe vd., 1994), *Enterobacter* sp. (Yoon vd., 1996) ve *Bacillus* sp. DS11 (Kim vd., 1998) gibi birçok bakteri türünde fitaz aktivitesi tespit edilmiştir. *Klebsiella terrigena* (Greiner vd., 1993, 1997) ve *B. subtilis* (natto) N-77 (Shimizu, 1992) bakterilerinden elde edilen fitazlar monomerik enzimlerdir ve izole edildikleri kaynaklara bağlı olarak moleküler ağırlığı 35-700 kDa arasında değişmektedir. Bunun dışında *Klebsiella aerogenes*'den izole edilen fitaz enzimi diğer fitazlardan farklı olarak, 10-13 kDa olup kısa bir peptitden oluşmaktadır (Liu vd., 1998).

Escherichia coli AppA fitazı yaklaşık 42 kDa molekül ağırlıklı periplazmik bir proteindir. Asidik optimum pH'sı nedeniyle, pepsin hidrolizine karşı oldukça dirençli ve fitik asit için spesifik aktivitesi yüksektir. *E. coli* AppA fitazı fitata bağlı fosforun salınımında domuz ve kümes hayvanları besinlerinde *A. niger* fitazından daha etkilidir (Augspurger vd., 2003).

Yanke vd. (1998) sığır rumeninde fitaz üreten birçok anaerobik bakteri tanımlamışlardır. *Mitsuokella multiacidus* suşundan sonra, en yüksek enzim üretimi yapan *Selenomonas* bakterisi bulunmuştur. Cho vd. (2003) *Pseudomonas syringae*'den izole ettikleri fitazın moleküler ağırlığını 45 kDa, spesifik aktivitesini 649 U/mg protein, optimum pH'sını 5.5 ve optimum sıcaklığını 40 °C olarak bulmuşlardır. Kim vd. (2003) *Citrobacter braaki* bakteri fitazının optimum pH ve sıcaklığını sırasıyla 4.0 ve 50 °C ve fitik asite diğer fosforlanmış substratlardan daha yüksek spesifite gösterdiğini saptamışlardır. Fitazlar ayrıca, *Obesumbacterium proteus* (Zinin vd., 2004) toprak bakterisi *Klebsiella* spp. ASR1 (Sajidan vd., 2004) ve *Bifidobacterium* genusunun birçok türlerinden izole edilmiştir (Haros vd., 2005).

1.4.3.2. Fungus ve maya fitazları

Fungus ve mayalardan izole edilen fitazların çoğu histidin asit fosfatazlardır, genelde 3-fitaz olarak sınıflandırılırlar. Glikozillenmiş enzimlerdir ve çeşitli substratlara karşı aktiftir (Wyss vd., 1999b). *Aspergillus niger* PhyA, iyi karakterize edilmiş ve ticarileştirilmiş ilk fitazdır. 1.4 kb'lık bir DNA parçası tarafından kodlanmış bir enzimdir. pH 2.5 ve 5.0-5.5 olan iki optimum pH'ya sahiptir. Optimum sıcaklığı 55-60 °C olan ve fitik asite yüksek afinite gösteren, yaklaşık 80 kDa molekül ağırlıklı monomer bir enzimdir (Han vd., 1999). *Aspergillus fumigatus* fitazı, *Aspergillus niger* PhyA fitazı ile % 66 dizi homolojisini paylaşır, fakat çok daha iyi termotolerantlık gösterir. *Aspergillus fumigatus* fitazının termotolerantlığı, ısı denatürasyonundan sonra, tekrar katlanmasının oldukça etkin olması ve ayrıca ısı uygulamasında kullanılan tamponların uygun özellikte olması ile açıklanabilir. Enzim geniş pH aralığına sahiptir ve düşük düzeyde fosforillenmiş inositol fosfatlara karşı oldukça aktiftir. Bununla birlikte fitata karşı spesifik aktivitesi düşüktür (Lei vd., 2007). *Peniophora lycii* PhyA mikroorganizmasından elde edilen fitaz enzimi de ticarileştirilmiştir. *Peniophora lycii* PhyA 6-fitaz enziminin optimum pH'sı 4.0-4.5 ve optimum sıcaklığı 50-55 °C'dir ve dimerik konformasyona sahiptir (Lassen vd., 2001). Isı uygulamaları ve proteazlar ya da düşük pH'ya duyarlı olduğu saptanmıştır (Simon ve Igbasan, 2002).

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

Nakamura vd. (2000) 738 maya izolatında yaptıkları tarama sonucunda, 35 izolatta geniş aralıkta optimum pH ve sıcaklığı olan fitaz aktivitesi saptamışlardır. *Arxula*

adenivorans tek fosfat kaynağı olarak fitat içeren ortamda gelişmiş ve sentezlenen fitaz enziminin 4.5-5.0 aralığında optimum pH ve 75 °C civarında ise, optimum sıcaklığa sahip olduğu bildirilmiştir (Sano vd., 1999). Quan vd. (2002) tarafından topraktan izole edilen *Candida Krusei* WZ-001 mayasından fitaz üretildiğini bildirmişlerdir. İzole edilen fitaz enzimi 116 ve 31 kDa moleküler ağırlıklı iki farklı alt ünite içermektedir, yaklaşık % 35 glikozilasyon oranına sahiptir ve optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 4.6 ve 40 °C'dir. Fitaz aktivitesi ayrıca *Pichia anomala* (Vohra ve Satyanarayana, 2001), *Saccharomyces cerevisiae* (Türk vd., 2000), *Schwanniomyces castellii* (Segueilha vd., 1992) mayalarında saptanmıştır. Bu enzimler 60-74 °C optimum sıcaklık ile asidik pH aralığında aktiftir.

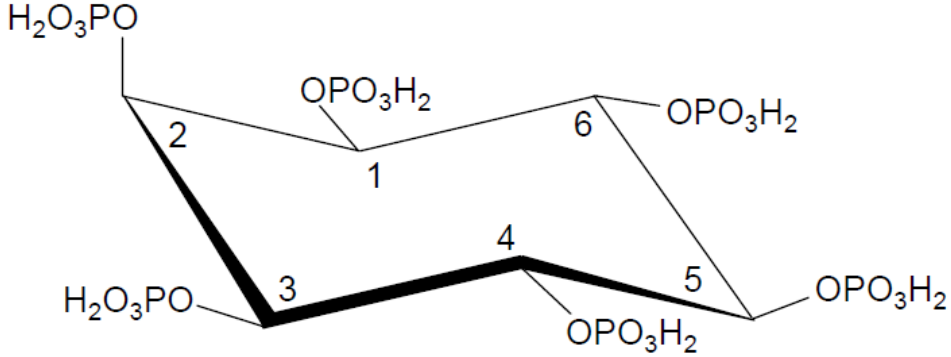
1.4.3.3. Diğer mikroorganizmalar

Freund vd. (1992) protozoan *Paramecium tetraurelia*'da fitaz enziminin bulunduğunu bildirmişlerdir. Optimum pH'sı 7.0 olan enzimin 240 kDa moleküler ağırlıklı heksamer bir enzimdir ve aktivite için divalent katyonlara gereksinim duymaz ve ardışık olarak 6, 5, 4 ve 1 konumundaki fosfatlar için stereospesifiktir (Van der Kaay ve Van der Haastert, 1995). Cheng (2005) psikrofil *Shewanella oneidensis* MR-1'dan izole edilen β -propeller fitaz gen dizisinin, *Basillus* spp fitazının peptid dizileri ile % 30 benzerlik gösterdiğini bildirmiştir. Bu türden izole edilmiş soğukta aktif protein-tirozinaz fosfatazların varlığına bağlı olarak, su ürünleri yetiştiriciliğinde yeni fitaz enziminin potansiyel uygulamaları, bu çalışmayı önemli kılmaktadır.

1.5. Fitat ve Yapısı

Fitazın substratı olan fitik asit (*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hekzafosfat) (Şekil 1.3) baklagiller, tahıl, yağlı tohum, polen ve sert kabuklu meyvelerde % 1-5 oranında bulunan bir bileşendir. Tuz formu fitat, tahıl ve baklagillerde fosforun depo formudur ve toplam fosforun % 80'den fazlasını oluşturur (Laboure vd., 1993). Fitatın önemli bir miktarı tahıl ve baklagiller tohumlarının olgunlaşması sırasında birikmektedir (Honke vd., 1998). Tohumların yanı sıra yan ürünlerinde de % 1-2 oranında fitik asit bulunmaktadır ve bu oran tohumlardaki toplam fosforun % 60'dan fazlasını oluşturmaktadır (Reddy vd., 1982). Bununla birlikte birçok bitki türünün köklerinde, yumrularında, spor ve polenlerinde de daha düşük miktarlarda

bulunabilmektedir (Feil, 2001). Mısır tohumları, örneğin % 0.89 fitik asit içermektedir ki, total fosforun % 88'ini oluşturur. Bu nedenle fitin genellikle fosfor ve *myo*-inositol depo şekli gibi kabul edilir. Her ikisi de tohumun çimlenmesi için gereklidir (Laboure vd., 1993).



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

Fitat pH 0.5-9.0 aralığında ikinci pozisyonda bulunan karbona, bir fosfat grubu aksel pozisyondan, diğer beş fosfat grubu da ekvatoryal pozisyondan bağlanarak yapıyı sterik olarak kararlı hale getirmektedir (Shamsuddin, 2002). Fitik asitin kimyasal yapısı hakkındaki çalışmalar 1855 yılında başlamıştır. Fitik asitin tanınması ise, 1856 yılında Hartig adlı araştırmacının çeşitli bitkisel tohumlardan, bitkinin büyümesinde depo işlevi gördüğü düşünülen küçük vezikülleri izole etmesi ile saptanmıştır. Araştırmacı bu veziküllerin nişasta içermediğini, ancak tohumun gelişmesinde önemli rolü olduğunu bildirmiştir. 1872 yılında Pfeffer, fitatı ilk kez bitki tohumlarından izole etmiş ve kalsiyum, magnezyum ve fosfor içeren, ancak azot içermeyen organik bir kompleks olduğunu belirtmiştir (Reddy vd., 1982).

Fitin içeren protein kalıntılarının bulunduğu organeller, hububatlarda alevronda, bakliyat ve yağlı tohumlarda endosperm ve çeneklerde bulunmaktadır. Mısır monokotillerde tipik lokalizasyon, bu tip yapıların dışındadır. Çünkü fitik asidin % 88'i alevron tabakasından ziyade embriyoda bulunduğu bildirilmiştir (Labaure vd., 1993).

Fitik asit, merkezinde *myo*-inositol halkasından uzanan altı fosfat grubu ile negatif yüklüdür. Bu özelliğinden dolayı K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} ve Fe^{2+} gibi katyonlara mükemmel bir şelatlayıcı olarak rol oynar. Fitik asit ile divalent katyonların oluşturduğu kompleks, normal gastrointestinal pH da, yani pH 4.0-8.0 arasında en az çözünlüktedir. Bu durum, hayvanlar ve insanlarda bu minerallerin absorpsiyonu ve sindirimini olumsuz etkiler (Raboy, 2001). Fitik asit besinlerin besinsel değerini azaltır. Bu sebeplerden dolayı, insanlar ve hayvanlar için anti besinsel faktör olarak kabul edilir (Kumar vd., 2010; DeBoland vd., 1975; Sandberg, 2002; Reddy vd., 1982; Erdman vd., 1989; Fox ve Tao, 1989; Bhandari ve Kawabata, 2004).

Fitik asit, fosfor ve *myo*-inositolün depo formu olmasının yanı sıra, diğer bir fonksiyonunun serbest demir şelatlaması nedeniyle, güçlü bir doğal antioksidan olduğunu bildirmiştir (Laboure vd., 1993). Antioksidan özelliği nedeniyle fitat içeren besinlerin tüketimi, insanları çeşitli kanserlere karşı korur, hücrel sinyal iletimini keser, hücre döngüsü inhibisyonu ve hücrelerin doğal bağışıklık aktivitesinin arttırılmasını sağlar. Diabetes mellitus, damar sertleşmesinin bir türü olan ateroskleroz ve koroner kalp hastalığına karşı tedavi edici özelliğe sahiptir. Böbrek taşı oluşumu, HIV-1 ve ağır metal toksisitesini azaltır, ancak yararlı etkileri ortaya çıkarmak için dozaj hakkında bilgi sınırlıdır (Kumar vd., 2010).

1.6. Fitaz Enziminin Endüstride Kullanım Alanları

1.6.1. Fitaz Enziminin Yemlerde Kullanılması

Son yıllarda, hayvan yemlerine ekzojen enzimlerin ilavesi, yemlerin besleyici değerini arttırdığı için uygulamada oldukça önem kazanmıştır. Domuz ve kümes hayvan atıklarında büyük miktarlarda fosfor içeriğinin bulunması, bitkisel kaynaklı yem maddelerinde fitata bağlı fosforun kullanılabilirliğinin zayıf olduğunu göstermektedir (Selle vd., 2000). Yapılan bir çok çalışma, besine fitaz enziminin ilavesi ile fitik asitten fosfat kullanımının arttığını ve inorganik fosfat atılımının % 50'ye varan bir oranda azaldığını göstermiştir (Li vd., 1997).

Fitatın defosforilasyonu için, besinlere ekzojen mikrobiyal fitaz ekleme araştırmaları yeni değildir (Nelson vd., 1968). Geçmişte mikrobiyal fitaz üretim maliyetinin yüksek olması, fitazın kullanımını engellemesine rağmen, rekombinant

DNA teknolojisi, domuz ve kümes hayvanlarında fosfor kullanımını arttıran ve fosfor atılımını azaltan yeni olanaklar sağlamıştır. Sonraki yıllarda yem enzimi fitazının Hollanda'da ticari uygulamasından sonra bu alana ilgi yoğunlaşmıştır (Lenis ve Jongbloed, 1999). Mikrobiyal fitazların optimum pH'sının düşük olması nedeniyle, fitatın en çok çözünür olduğu mide koşullarına uyumlu olmasından dolayı, yem uygulamalarına oldukça uygundur (Campbell ve Bedford, 1992). Tek mideli hayvanlarda, fitata bağlı fosforu serbest bırakan mikrobiyal fitaz kullanımı, başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Kullanılabilir fosforun geliştirilmesi, genelde % 20-45 aralığında olduğu saptanmıştır. Fitata bağlı fosforun serbest kalan miktarı eklenen fitazın kaynağından, substrat ile birlikte fitata bağlı olmayan fosfordan, Ca, kolekalsiferol ve Ca:P oranından etkilenir (Ravindran vd., 1995).

Domuz, kümes hayvanları, kuş ve balık gibi monogastrik hayvanlar sindirim sistemlerindeki düşük fitaz seviyesinden dolayı, fitik asidi metabolize edemezler, dışkı ile atarlar (Han vd., 1999). Fakat fosfor hayvanların büyüme, üreme ve kemiklerinin kalsifikasyonu için gerekli minerallerden biridir (Pandey vd., 2001). Bu nedenle, inorganik fosfat fosfor ihtiyacını karşılamak için, diyetlere ilave edilir. Diyetlere ilave edilip absorbe edilemeyen inorganik fosfor ile kümes hayvanları ve domuz tarafından sindirilmeyen fitat, dışkı ile çevreye atılır. Toprakta ya da suda fitaz aktivitesine sahip mikroorganizmalar tarafından fitat, enzimatik olarak hidrolizlenir. Serbest kalan fosfor, nehir ve göllere taşınarak sucul ortamlarda ötrofikasyona ya da aşırı alg çoğalmasına neden olur. Bu durum ise, suda çözünür oksijen eksikliğine neden olur. Sonuç olarak, hidrolizlenmeden gübre yolu ile atılan fitat yada yemlere ilave edilip absorbe edilmeyen inorganik fosforun toprağa karışması, sadece fosfor kirliliğine değil, aynı zamanda toprak veya sulak alanlarda ekolojik çevrenin bozulmasına yol açar. Bu nedenle, monogastrik hayvanların bağırsaklarında fitik asidin fosforlu *myo*-inositol türevlerine enzimatik hidrolizi gereklidir (Kumar vd., 2010; Mitchell vd., 1997; Lee vd., 2005; Zhao ve X. Qu, 2006; Han vd., 1999). Böylece doğada var olan fosfor kaynağının tekrar doğaya kontrollü bir şekilde kazandırılması ile hem ekolojik kontrol sağlanmış, hem de fosforun kullanılabilir formlarının ilavesinin ekonomik maliyeti ortadan kaldırılmış olur. Özellikle yüksek verimlilikte canlı hayvan üretimi yapılan alanlarda açığa çıkan ciddi fosfor miktarı, çevre için ciddi bir potansiyel tehlikedir. Yemin besleyici değerini arttırmak ve hayvanlar tarafından atılan fosfor miktarını azaltmak için, fitik asidin enzimatik hidrolizine yönelik birçok girişim gerçekleştirilmektedir.

Ayrıca fitat, mineralleri şelatlamasından dolayı, hayvan yemlerinde anti-besinsel faktör olarak rol oynar (Deboland vd., 1975; Reddy vd., 1982). Fitazın besine eklenmesi, bu anti-besinsel faktörlerin uzaklaştırılmasını sağlayarak yemin ekonomik değerini de arttıracaktır (Mitchell vd., 1997). Fitaz enzimi ilavesi ile yemlerin içerdiği fosforun kullanımının artması kalsiyumun kullanımını da arttırmaktadır, çünkü her ikisi de kemikte depolanmaktadır (Simons vd., 1990).

1.6.2. Fitaz Enziminin Myo-İnositol Eldesindeki Önemi

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. Ayrıca C₆ alkollerinin sadece biyolojik olarak aktif izomeri olarak bilinmektedir. Memeli hücrelerinde *myo*-inositolün metabolizması ve fonksiyonu yaygın olarak incelenmiş olup, özellikle hücre membranlarında *myo*-inositol içeren fosfolipidlerin biyosentezi ve yıkımı ilgi odağı olmuştur (Liu vd., 1999).

Myo-inositolün farklı çok düşük fosfat esterlerinin bazı izomerleri, özellikle I(1,4,5)P₃ ve I(1,3,4,5)P₄ gibi hücre içi ikincil haberci görevinde önemli rol oynayan fosfotidilinositol siklusunda bulunur. Son zamanlarda elde edilen veriler, fitatın antikanser etkilerinin sinyal iletim yollarında, hücre döngüsü düzenleyici genlerinde, farklılaşmış genlerde, onkogenler ve belki de tumor baskılayıcı genlerde önemli rol oynadığını düşündürmektedir (Shamsuddin, 1999; Selle vd., 2000; Greiner vd., 1997).

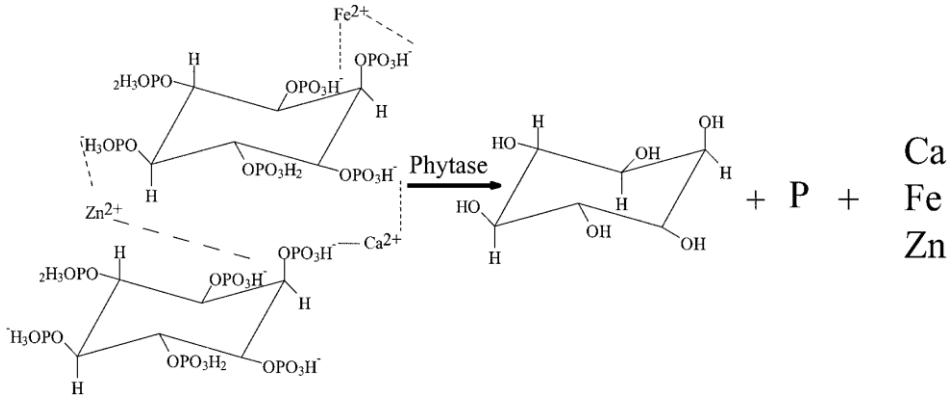
1.6.3. Fitaz Enziminin Minerallerden Yararlanmaya Etkisi

Fitik asit minerallere bağlanarak, tek mideli hayvanlar tarafından tüketilen bitkisel kaynaklı besinlerdeki P, Ca, Zn ve Fe'in sindirimi ve absorpsiyonunu azaltır. Besinlerdeki minerallerin biyolojik önemi, yaklaşık 150 yıl önce fitik asidin keşfinden bu yana dikkati çekmiştir (Kornegay vd., 1996). Fitat, yapısı nedeniyle pH'nın bazik veya nötr olduğu ortamlarda ve sindirim kanalında güçlü bir şekilde negatif yüklüdür. Bu nedenle Zn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺ ve Ca²⁺ gibi katyonlara bağlanarak kararlı bileşikler oluşturur. Sonuçta oluşan bileşik, minerallerin kullanım verimliliğini azaltmaktadır (Persson vd., 1998). Fitat-

mineral bileşikleri sıvıda çözünen şelatlar halinde veya sıvılarda çökelti oluşturan bileşikler halinde bulunmaktadır (Maenz, 2001).

İnsanlarda minerallerin kullanılabilirliğine ilişkin, besinle fitat alımının sonuçları, bazı tartışmalara neden olmuştur. Bazı araştırmacılar, fitat içeriği fazla olan besinlerde, Zn ve Ca eksikliği riskinin olduğunu savunurken (Sandstead, 1992), diğer araştırmacılar bu gibi iddiaların abartılı olduğunu savunmuşlardır (Walker ve Walker, 1992).

Buğday kepeği ve bütün hububat ürünleri ciddi miktarda fitat içermektedir. Fitat kalsiyum, demir, çinko gibi mineraller ile çözünmeyen kompleks oluşturma kapasitesine sahip olup, bu minerallerin biyolojik kullanımını azaltır. Fitatın fitazla hidrolizi, minerallerin serbest kalmasını sağlayarak canlıların mineralleri kullanma kapasitesini artırır. Fitatın hidrolizi, bağırsakta absorpsiyondan önce sindirim yolunda meydana gelebilirse, böylece mineral absorpsiyonu olumlu etkiler.

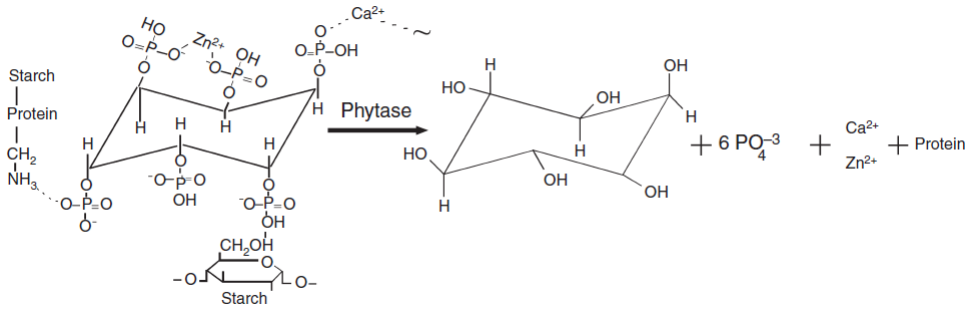


Şekil 1.4. Mineraller ile kompleks oluşturmuş fitatın hidrolizi

Ham buğday kepeğinde (içerdiği fitaz aktivitesi neden ile) fitatın % 60'ının mide ve ince bağırsağa geçişi esnasında hidrolizlendiğini, fakat fitazın aktivitesi önlenmiş buğdayla beslenildiğinde, hidrolizin gerçekleşmediği kanıtlanmıştır (Sandberg ve Andersson 1988, Sandberg vd., 1987). Bu çalışmalar, insan endojen fitaz aktivitesinin ihmal edilebilir olduğunu, fakat besinsel fitazın sindirimde önemli bir faktör olduğunu göstermiştir. Ayrıca, araştırmalar insan ince bağırsağında fitaz aktivite seviyesinin düşük olduğunu kanıtlamıştır.

1.6.4. Fitaz Enziminin Protein Sindirimine ve Metabolik Enerjiye Etkisi

Fosfor ve diğer besinlerden yararlanmada, fitatın olumsuz etkileri yıllar önce saptanmıştır (Cosgrove, 1966). Fitatlar hem yüksek hemde düşük pH değerlerinde proteinlerin bazik amino grupları ile çözünmez kompleks oluşturduğu bildirilmiştir. Bu durum, proteinlerin aktivitesini ve proteazların sindirimdeki fonksiyonlarını olumsuz etkiler (Kumar vd., 2010). Yem enzimi olarak fitazın birincil görevi, fitata bağlı fosforun kullanılabilirliğini arttırmak iken, fitaz enzimi fitatın antibesinsel özelliklerine yeni bir anlayış getirmiştir. Protein ile fitat etkileşimi hayvan beslenmesinde ekonomik ve pratik bir öneme sahiptir (Selle vd., 2000).



Şekil 1.5. Fitazın fitata bağlı fosfat gruplarının hidrolizi ile metalleri, metal bağlı enzimleri ve proteinleri serbest bırakması

Yem maddelerinde doğal olarak meydana gelen protein-fitat komplekslerinden proteinin fitaz eklendiğinde serbest kalması, bağırsakta ikili ve üçlü protein fitat komplekslerinin oluşumunun engellenmesi, sindirim enzimleri üzerinde fitatın olumsuz etkisinin azaltılması, endojen amino asit kayıpların azalmasına önemli katkıda bulunan faktörlerdir (Selle vd., 2000).

Protein-fitat komplekslerinin varlığı ilk olarak, pamuk tohumunun ekstraktlarında saptandı (Jones ve Csonka, 1925). Rojas ve Scott (1969) bu komplekslerin kümes hayvanlarının beslenmesinde olumsuz etkilerinin olduğunu ileri sürdüler. Fitatın, pH değerine bağlı olarak proteinler ile iki farklı kompleks oluşturduğu kabul edilmektedir (Cosgrove, 1966; Anderson, 1985). Asidik pH değerlerinde ikili protein-fitat kompleksleri ve nötrale yakın pH değerlerinde katyonik köprü vasıtasıyla üçlü protein-mineral-fitat kompleksleri oluşturur. Teorik olarak, fitatın hidrolizi ile açığa çıkan fitata bağlı protein ve fosfor, hayvanlar tarafından kullanılabilir.

Etlik piliçlerde tam defitinizasyon yapılmış mısır ve soya fasulyesi küspesine dayalı rasyonlarla beslemede, sindirilen protein miktarının % 12–29 oranında arttığı belirlenmiştir (Zyla vd., 1995).

İnsanlarda, fitatlı besinler kan şekeri seviyesini azaltır (Lee vd., 2006). Fitatın yemdeki karbonhidratlar ile kompleks formu çözünürlüğünü azaltır, böylece sindirimi olumsuz etkiler. Fitat hidrojen bağları aracılığıyla direk olarak, nişasta ile ya da nişasta ile ilişkili proteinler aracılığıyla dolaylı olarak bağlanabilir (Laboure vd., 1993). Ayrıca fitatın, Ca^{2+} iyonu ile kompleks oluşturması, amilaz aktivitesini inhibe ettiği düşünülmektedir (Selle vd., 2000).

Karbohidratın biyolojik kullanılabilirliği üzerindeki olumsuz etkisinin yanı sıra, lipit kullanımını da negatif etkiler. Fitat, lipit ve lipit türevleri ile kompleks oluşturarak, lipofitin formunu oluşturur. Kümes hayvanlarının bağırsak lümeninde lipit ve Ca-fitatın oluşturduğu kompleksler, lipit elde edilen enerji kullanımı için önemli bir kısıtlama oluşturur (Laboure, 1993; Vohra ve Satanarayana, 2003).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Fitazların Saflaştırılması

Enzimlerin saflık dereceleri uygulama alanlarına bağlı olarak, ham enzimlerden oldukça saf enzime kadar değişmektedir. Enzimin saflaştırılması için metodun seçimi enzimlerin hücredeki lokalizasyonuna bağlıdır. Hücre içi enzimlerin izolasyonu, çoğunlukla kompleks biyolojik karışımlardan ayrılmasıdır. Diğer taraftan hücre dışı enzimler, genellikle sadece birkaç bileşen içeren bir ortama salınırlar. Enzimler çok kompleks proteinlerdir ve katalizör olarak sahip oldukları yüksek spesifiklik, sadece enzimlerin doğal formlarında mevcuttur. Bu doğal konformasyona sadece belirli pH, sıcaklık ve iyon şiddetinde ulaşılır. Bu nedenle enzim izolasyonu için sadece ılımlı ve spesifik yöntemler kullanılabilir. Daha ileri saflaştırma tekniklerine geçmeden önce uygulanan birincil ayırma teknikleri hücre parçalanması, berraklaştırma, santrifüjleme, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz aşamalarıdır. Ancak amino asit dizisi ve X-ışını kristalografik çalışmalarında ya da kullanılacağı alana bağlı olarak çok miktarda saf enzime ihtiyaç duyulduğundan, amonyum sülfat çöktürmesinden sonra jel filtrasyonu, iyon değiştirme veya afinite kolon kromatografisi gibi çok daha ileri saflaştırma tekniklerine ihtiyaç vardır.

Bacillus subtilis bakterisi tarafından sentezlenen fitaz enzimi üzerine yapılan çalışmada fitaz enzimi etanol çöktürmesi ve aseton çöktürmesinin ardından uygulanan iki farklı iyon değişim kromatografisi ile 39 kat ve % 32 verimle saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı ultrasantrifüj ile sedimentasyon yönteminden yararlanarak 3.5 kDa olarak saptanmıştır (Powar ve Jagannathan, 1982).

Ullah ve Gibson (1987) *Aspergillus ficuum* NRRL 3135'dan hücre dışı sentezlenen fitaz enzimini sırasıyla uygulanan iki farklı iyon değişim kromatografisi ve kromatofokusing adımlarının ardından % 58 geri kazanım ile 22 kat saflaştırmışlardır. Monomer olan doğal enzimin moleküler ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile 90-100 kDa olarak belirlerken, denatüre enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 85-100 kDa olarak belirlemişlerdir. Saf fitaz enziminin karbohidrat kalıntısı endoglikozidaz H enzimi tarafından uzaklaştırıldıktan sonra moleküler ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile 76 kDa olarak saptanmışlardır.

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

Aspergillus niger fungusu tarafından hücre dışı sentezlenen fitaz enzimi üzerine yapılan çalışmada enzim sırasıyla jel filtrasyonu, art arda uygulanan iki farklı iyon değişim kromatografisi ile 4.1 kat saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 100 kDa olarak saptanmıştır (Dvořáková vd., 1997).

Klebsiella terrigena bakterisinden doğal ve denatüre enzimin moleküler ağırlığı 40 kDa olarak saptanan fitaz enzimi sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, art arda uygulanan üç farklı iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi ile 410 kat ve % 28 verimle saflaştırılmıştır (Greiner vd., 1997).

Klebsiella oxytoca MO-3 tarafından üretilen fitaz enzimi % 33 geri kazanımla ısı uygulaması, iyon değişim, jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisi adımlarının ardından 424 kat saflaştırılmıştır (Jareonkitmongkol vd., 1997).

Bacillus subtilis VTT E-6813 fitaz enzimi sırasıyla etanol çöktürmesi, amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografisi ile % 22 verimle 3.7 kat

saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 43 kDa olarak saptanmıştır (Kerovuo vd., 1998).

Topraktan izole edilen *Bacillus* sp. DS11 termostabil fitaz enzimi aseton çöktürmesi, hidrofobik etkileşim, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Enzim, saflaştırma adımlarının ardından % 10 verimle 77 kat saf olarak elde edilmiştir. Monomerik olan enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ve jel filtrasyon kromatografisi ile 40 kDa olarak saptanmıştır (Kim vd., 1998).

Aspergillus niger SK-57 fitazı üzerine yapılan çalışmada enzim art arda uygulanan iki farklı iyon değişim, jel filtrasyon kromatografisi ve kromatofokusing ile 11 kat ve % 2.5 verimle saflaştırılmıştır. Denatüre enzimin moleküler ağırlığı 60 kDa olarak saptanmıştır. Saf fitaz enziminin karbohidrat kalıntısı endoglikozidaz H enzimi tarafından uzaklaştırıldıktan sonra moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 55 kDa olarak saptanmıştır (Nagashima vd., 1999).

Penicillium simplicissimum fitaz enzimi ultrafiltrasyon, iki farklı iyon değişim kromatografisi, hidrofobik etkileşim ve jel filtrasyon kromatografisi işlemlerinin ardından 38.2 kat saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile 65-67 kDa, denatüre proteinin moleküler ağırlığı ise SDS-PAGE ile 65 kDa olarak saptanmıştır (Tseng vd., 2000).

Haşlanmış pirinçten izole edilen *Bacillus* sp. KHU-10 tarafından sentezlenen termostabil fitaz aseton çöktürmesi, iyon değişim ve hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Enzim saflaştırma adımlarının ardından % 21.1 verimle 105.8 kat saf olarak elde edilmiştir. Monomerik olan doğal enzimin moleküler ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile 46 kDa ve denatüre enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 44 kDa olarak saptanmıştır (Choi vd., 2001).

Topraktan izole edilen *Candida krusei* WZ-001 tarafından sentezlenen fitaz enzimi sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon, hidrofobik etkileşim, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi ile % 5.9 verimle 33.9 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan doğal fitaz enziminin moleküler ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile 330 kDa olarak bulunmuştur. İki alt birimden oluştuğu saptanan denatüre enzimin alt birimlerinden birinin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 116 kDa, jel filtrasyon kromatografisi ile 120 kDa olarak saptanmıştır. Diğer alt birimin ise

SDS-PAGE ile 31 kDa, jel filtrasyon kromatografisi ile 30 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu saptanmıştır (Quan vd., 2002).

Pichia anomala tarafından sentezlenen fitaz enzimi aseton çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. % 19.4 verimle 21.8 kat saflaştırılan fitaz enzimi SDS-PAGE ile 64 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu saptanmıştır (Vohra ve Satyanarayana, 2002).

Lactobacillus sanfranciscensis CB1 bakterisinden SDS-PAGE ile 50 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu saptanan fitaz enzimi sırasıyla iyon değişim, jel filtrasyon ve tekrar farklı bir iyon değişim kromatografisi ile % 18 geri kazanımla 160 kat saflaştırılmıştır (Angelis vd., 2003).

Casey ve Walsh (2003) *Aspergillus niger* ATCC 9142'dan fitaz enzimini sırasıyla ultrafiltrasyon, iyon değişim, jel filtrasyon kromatografisi ve kromatofocusing adımlarından geçirerek % 26 verimle, 24.89 kat saflaştırmışlardır. Denatüre enzimin moleküler ağırlığı 84 kDa olarak bulmuşlardır.

Pseudomonas syringae MOK1 tarafından sentezlenen fitaz enzimi uygulanan anyon ve katyon değiştirici kromatografiler ile iki adımda saflaştırılmıştır. % 44.2 verimle 101 kat saflaştırılan fitaz enziminin SDS-PAGE ile 45 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu saptanmıştır (Cho vd., 2003).

Kim vd. (2003) deniz suyundan izole edilen *Citrobacter braakii* YH-15'dan fitazı amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik etkileşim kromatografisi, art arda üç farklı iyon değişim kromatografisi uygulayarak % 28 verimle, 12800 kat saflaştırmışlardır. Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 47 kDa olarak belirlemişlerdir.

Rhizopus oligosporus ATCC 22959 fungusu tarafından sentezlenen fitaz enzimi ultrafiltrasyon, iyon değişim, jel filtrasyon kromatografisi ve kromatofocusing ile saflaştırılmıştır. Enzim saflaştırma adımlarının ardından % 32.92 verim, 10.94 kat saf olarak elde edilmiştir. Monomerik olan doğal enzimin moleküler ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile 124 kDa ve denatüre enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 120 kDa olarak saptanmıştır (Casey ve Walsh, 2004).

Havadan izole edilen *Cladosporium* sp. FP-1 fungusu tarafından üretilen fitaz enzimi sırasıyla ultrafiltrasyon, etanol çöktürmesi, iyon değişim ve jel filtrasyon

kromatografisi uygulanarak 6.3 kat, % 22.9 verimle elde edilmiştir. Doğal enzimin moleküler ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile 31 kDa olarak belirlenirken, denatüre enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 32.6 kDa olarak belirlenmiştir (Quan vd., 2004).

Klebsiella pneumoniae subsp. *pneumoniae* XY-5 bakterisi tarafından sentezlenen fitaz enzimi üzerine yapılan çalışmada, enzim sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon kromatografisi ile tuz giderme işleminin ardından iki farklı iyon değişim kromatografisi uygulanarak % 16.7 verimle, 181 kat saflaştırılmıştır. Doğal enzimin moleküler ağırlığı 61 kDa, denatüre enzimin moleküler ağırlığı 41.7 kDa olarak bulunmuştur (Wang vd., 2004)

Sariyska vd. (2005) bu çalışmada fitazı *Aspergillus niger* 307 fungusundan sırasıyla ultrafiltrasyon, jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisi yardımıyla 30 kat, % 3.81 verimle geri elde etmişlerdir. Enzimin moleküler ağırlığını SDS-PAGE ile 39 kDa olarak belirlemişlerdir.

Aspergillus niger van Teighem tarafından hücre dışına sentezlenen fitaz enzimi sırasıyla ultrafiltrasyon, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi ile % 76 verimle, 1.8 kat saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 66 kDa olarak saptanmıştır (Vats ve Banerjee, 2005).

Aspergillus niger 307 tarafından hücre dışına sentezlenen fitaz enzimi ultrafiltrasyon, jel filtrasyonu ve ard arda uygulanan iki farklı iyon değişim kromatografisi yardımıyla % 1.29 verimle, 37.5 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 70 kDa olarak belirlenmiştir (Gargova vd., 2006).

Boyce ve Walsh (2007) *Mucor hiemalis* Wehmer tarafından üretilen fitaz enzimini saflaştırmayı sırasıyla ultrafiltrasyon, diafiltrasyon, iyon değişim, jel filtrasyon ve hidrofobik etkileşim kromatografisi olmak üzere 5 basamakta gerçekleştirmişlerdir. 14.1 kat saflaştırılan enzimi % 51 geri kazanımla elde etmişlerdir. Monomerik olan doğal enzimin moleküler ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile 30 kDa ve denatüre enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 45 kDa olarak belirlenmiştir.

Atık sulardan izole edilen gram negatif bakterisi tarafından üretilen fitaz enzimi sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, art arda uygulanan iki farklı iyon değişim

kromatografisi, jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisi ile 173 kat ve % 10 verimle saflaştırılmıştır. Doğal enzimin moleküler ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile 42 ± 1.5 kDa, denatüre enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 41.5 ± 2.5 kDa olarak saptanmıştır (Greiner ve Farouk, 2007).

Termofil bir bakteri olan *Bacillus laevolacticus* tarafından sentezlenen fitaz enzimi farklı iyon değişim kromatografisi uygulanarak iki adımda 6.5 kat, % 24.4 verimle saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ile enzimin 41 kDa ve 46 kDa moleköl ağırlığına sahip iki alt birimden oluştuğu belirlenmiştir (Gulati vd., 2007a)

Mucor indicus MTCC 6333 tarafından üretilen fitaz enzimi sırasıyla iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi uygulanarak 21.9 kat, % 36.1 verimle elde edilmiştir. SDS-PAGE ile enzimin 39.8 kDa ve 37.2 kDa moleköl ağırlığına sahip iki alt birimden oluştuğu belirlenmiştir (Gulati vd., 2007b).

Thermomyces lanuginosus TL-7 termofilik fungusu tarafından sentezlenen fitaz enzimi sırasıyla iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi ile % 3.44 verimle, 40.75 kat saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 54 kDa olarak belirlenmiştir (Gulati vd., 2007c).

Aspergillus niger NCIM 563 tarafından sentezlenen iki farklı fitaz enzimi (Phy I ve Phy II) amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografisi ile tuz giderimi işleminin ardından % 95 verimle, 3 kat saf olarak elde edilmiştir. Doğal Phy I ve Phy II enzimlerinin moleküler ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile sırasıyla 304 kDa ve 183 kDa olarak saptanmıştır (Soni ve Khire, 2007).

Kodamaea ohmeri BG3 mayası tarafından sentezlenen fitaz enzimi üzerine yapılan çalışmada, enzim sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisi ile 7.2 kat ve % 10.4 verimle saflaştırılmıştır. Doğal enzimin moleküler ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile 92.9 kDa olarak belirlenirken, denatüre enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 95 kDa olarak belirlenmiştir (Li vd., 2008).

Debaryomyces castellii CBS 2923 mayası tarafından sentezlenen fitaz enzimi üzerine yapılan çalışmada, enzim hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulanarak % 59 verimle, 13.6 kat saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 77 kDa, kütle spektrometrisi ile 74.46 kDa olarak bulunmuştur. Deglikozilasyon

işleminin ardından enzimin moleküler ağırlığı ise SDS-PAGE ile 51 kDa, kütle spektrometrisi ile 52.98 kDa olarak bulunmuştur (Ragon vd., 2008).

Aspergillus niger 11T53A9 fungusu tarafından hücre dışı sentezlenen fitaz enzimi üzerine yapılan çalışmada, enzim sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, ard arda uygulanan iki farklı iyon değişim, jel filtrasyonu ve tekrar uygulanan iyon değişim kromatografisi ile 51 kat, % 20.3 verimle saflaştırılmıştır. Denatüre ve doğal enzimin moleküler ağırlığı 85 kDa olarak saptanmıştır (Greiner vd., 2009).

Termofil bir fungus olan *Sporotrichum thermophile* tarafından hücre dışına sentezlenen fitaz enzimi aseton çöktürmesi, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi uygulanarak 13.72 kat, % 4.31 verimle saflaştırılmıştır. Beş alt birimden oluştuğu saptanan fitaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile doğal enzimin moleküler ağırlığı 456 kDa, SDS-PAGE ile denatüre enzimin molekül ağırlığı 90 kDa olarak belirlenmiştir (Singh ve Satyanarayana, 2009).

Aspergillus niger NCIM 563 tarafından hücre dışına sentezlenen optimum pH'sı 2.5 olan Phy I ve optimum pH'sı 5.0 olan Phy II iki farklı fitaz enzimi konsantre edildikten sonra sırasıyla hidrofobik etkileşim ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. % 30.24 verimle 16.67 kat saflaştırılan tetramer Phy I fitaz enzimi jel filtrasyon kromatografisi ile 264 kDa, denatüre Phy I enziminin SDS-PAGE ile 66 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu saptanmıştır. % 26.55 verimle 14.29 kat saflaştırılan monomer Phy II fitaz enzimi jel filtrasyon kromatografisi ile 150-160 kDa, denatüre Phy II enziminin SDS-PAGE ile 150-160 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu saptanmıştır (Soni vd., 2010).

Aspergillus ficuum NTG-23 tarafından sentezlenen fitaz enzimi, sırasıyla iki farklı iyon değişim ve ardından jel filtrasyon kromatografisi ile % 23.8 verimle, 71.5 kat saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ve SDS-PAGE ile 65.5 kDa olarak saptanmıştır (Zhang vd., 2010).

Aspergillus niger NCIM 563 fungusu tarafından sentezlenen fitaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografisi ile tuz giderimi işleminin ardından % 69 verimle, 2.5 kat saf olarak elde edilmiştir. Doğal enzimin moleküler ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile 87 kDa olarak saptanmıştır (Bhavsar vd., 2010).

Sığır dışkılarından izole edilen *Bacillus subtilis* CF92 tarafından üretilen fitaz enzimi, 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 vd., 2011).

Mitsuokella jalaludinii bakterisi tarafından sentezlenen fitaz enzimi üzerine yapılan çalışmada, enzim sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi ve ard arda iyon değişim kromatografisi, adımlarından geçirerek 119.5 kat saflaştırılmıştır (Lan vd., 2011).

Toprakdan izole edilen *Aspergillus niger* FS3 fungusu tarafından üretilen fitaz enzimi sırasıyla katyon değişim, anyon değişim kromatografisi ve kromatofocusing uygulanarak 10.1 kat, % 6.35 verimle elde edilmiştir. Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 108 kDa olarak belirlenmiştir (Spier vd., 2011).

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

2.2. Fitazların Aktivitesi ve Stabilitesi Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi

Klebsiella terrigena fitazının optimum koşulları pH 5.0 ve 58 °C'dir. Farklı sıcaklıklarda 1 saat inkübe edilen enzim 40 °C'ye kadar aktivitesinin tamamını, 50 °C'de aktivitesinin % 80'ini korurken 60°C'de ise tamamen inaktive olduğu bildirilmiştir. Fakat 20 mg/L sığır serum albümini varlığında 30 °C ile 50 °C sıcaklık aralığında 5 saat inkübasyonun ardından aktivite kaybı olmazken 60 °C'de aktivitesinin % 70'ini kaybetmiştir. 70 °C'de ise 5 saatin ardından aktivite gözlenmemiştir. Enzim pH 7.5'in üzerindeki pH değerlerinde inaktif iken 3.0-9.0 pH aralığında 4 °C'de 10 gün boyunca aktivite kaybetmemiştir. Fakat pH 2.0 ve pH 1.0'de 24 saat inkübasyonun ardından başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 45 ve % 85'ini kaybetmiştir. Enzimin aktivasyon enerjisi ise 35 kJ.mol⁻¹ olarak hesaplanmıştır (Greiner vd., 1997).

Bacillus sp. DS11 fitazının optimum sıcaklığı 70 °C'dir. Enzim CaCl₂'ün olmadığı koşullarda 10 dakika farklı sıcaklıklarda inkübasyonun ardından 50 °C ve üzeri

sıcaklıklarda aktivitede ciddi bir düşüş olduğu, fakat 5 mM CaCl₂'ün olduğu durumlarda ise 90 °C'de 10 dakika inkübasyonun ardından aktivitesinin % 50'sini koruyabilmiştir. Optimum pH'ı 7.0-8.0 olan enzimin 4.0-8.0 pH aralığında oldukça stabil olduğu belirlenmiştir (Kim vd., 1998).

Selenomonas ruminantium JY35 mikroorganizmasından elde edilen ham fitaz enzimi maksimum aktivitesini 50-55 °C'de ve kullanılan tamponun yapısına bağlı olarak pH 4.0-5.5 aralığında göstermektedir. Enzim 39 °C'den sonra bir hızlı bir artış gösterirken, 60 °C'de aktivitede ciddi bir düşüş gözlenmiş ve 60 °C üzerindeki sıcaklıklarda aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir (Yanke vd., 1999).

Aspergillus niger SK-57 fitazı optimum pH'sı 5.5 olan enzimin pH 2.5'de optimum aktivitesinin % 60'ını sergilemekte, pH 7.0 ve üzerindeki değerlerde ise inaktif olduğu saptanmıştır. Çeşitli pH'larda 37 °C'de 60 dakika inkübe edilen enzimin pH 5.0-7.0 aralığında stabil olduğu belirlenmiştir. Optimum sıcaklığı 50 °C olan enzim, farklı sıcaklıklarda 60 dakika inkübasyonun ardından 0-30 °C arasında aktivitenin tamamını korurken, 50 °C'de aktivitesinin % 30'unu koruyabilmiştir (Nagashima vd., 1999).

Arxula adenivorans fitazının 60 °C'de, optimum pH'sı 4.5-5.0 olarak, 37 °C'de ise, optimum pH'sı 3.0-3.5 olarak belirlenmiştir. Enzimin optimum sıcaklığı ise 75-82 °C olduğu bildirilmiştir. Enzimin 75 °C'de 20 dakika inkübasyonun ardından aktivitesinin % 90'ını kaybettiği bildirilmiştir (Sano vd., 1999).

Penicillium simplicissimum W46 fitazı optimum pH'ı 4.0 olan enzimin pH 7.5 ve üzerindeki değerlerde ise inaktif olduğu saptanmıştır. Enzimin pH 3.5-6.0 aralığında 7 gün stabil olduğu belirlenmiştir. Optimum sıcaklığı 55 °C olan enzim, 60 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda aktivite göstermemiştir. Enzim 12 saat 55 °C'de inkübasyonun ardından orjinal aktivitesinin sadece % 20'sini kaybetmiştir (Tseng vd., 2000).

Optimum sıcaklığı 40 °C olan *Bacillus* sp. KHU-10 fitazının 40 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda 10 dakika stabil olduğu belirlenmiştir. Enzimin 10 mM CaCl₂ içerdiği koşullarda ise optimum sıcaklığının 60 °C olduğu ve 60 °C'de 10 dakika inkübasyonun ardından orjinal aktivitesinin % 95'ini koruduğu saptanmıştır. Optimum pH aralığı 6.5-8.5 olan enzim 6.5-8.5 pH aralığında oldukça stabil olduğu 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 (Choi vd., 2001).

Candida krusei WZ-001 fitazı optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 4.6 ve 40 °C'dir. Enzimin pH 2.0-5.0 aralığında aktivitesinin % 80'ini koruyarak stabil olduğu bildirilmiştir. Farklı sıcaklıklarda 1 saat inkübe edilen enzimin 20 °C ve altındaki sıcaklıklarda stabil olduğu, 50 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise aktivitesini tamamen kaybettiği belirlenmiştir. Enzim 30 µg/mL sığır serum albumini varlığında 1 saat inkübasyonun ardından 40 °C'nin altındaki sıcaklıklarda oldukça stabil olduğu, 50 °C'de aktivitesinin % 40'ını koruyabildiği belirlenmiş ve 70 °C'de tamamen aktivitesini kaybetmiştir (Quan vd., 2002).

Vohra ve Satyanarayana (2002) *Pichia anomala* fitazının optimum koşullarının pH 4.0 ve 60 °C olduğunu ve 80 °C'de optimum aktivitesinin % 85'ini, 100 °C'de ise optimum aktivitenin sadece % 7'sini gösterdiğini belirlemişlerdir. 60 °C'de 5 gün boyunca aktivitesinin tamamını koruyan enzimin aynı sıcaklıkta yarılanma ömrü ise 7 gün olarak bulunmuştur. Enzim 70 °C'de 30 saat stabildir ve yarılanma ömrü 48 saat olarak belirlenmiştir. 70 °C'de stabil olmasına rağmen 80 °C'de yarılanma ömrü 5 dakika olarak bulunmuştur. Enzimi sıcaklık ile denatürasyona karşı koruyucu etkisi olan ve stabilizasyonu arttıran sukroz, laktoz ve arabinoz (% 10) ilavesi ile 80 °C'de yarılanma ömrü 5-30 dakika arasında bir artış göstermiştir. *Pichia anomala* fitazı oda sıcaklığında pH 4.0'de 6 gün boyunca stabildir ve yarılanma ömrü 8 gün olarak belirlenmiştir. Enzim pH 8.0'de yarılanma ömrü 60 saat olarak belirlenmiş ve daha az stabil olduğu gözlenmiştir.

Kim vd. (2003) *Citrobacter braakii* YH-15'in fitazının optimum aktivitesini pH 4.0 ve 50 °C'de gösterdiğini bildirmişlerdir. Optimum sıcaklığının 50 °C olmasına rağmen 55 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda aktivitede hızlı bir düşüş olduğunu belirlemişlerdir. Enzimin pH 4.0'de 25-65 °C sıcaklık aralığında 30 dakika inkübasyonu sonucu 25-50 °C'de aktivitesinin tamamını korumuştur. Farklı tamponlarda 37 °C'de 7 gün boyunca inkübe edilen enzim pH 3.0-5.0 arasında aktivitesinin % 50'den fazlasını korumuştur.

Casey ve Walsh (2003) *Aspergillus niger* ATCC 9142 fitazının optimum sıcaklığının 65 °C olduğunu ve domuzlar için fizyolojik sıcaklık olan 39 °C'de optimum aktivitesinin % 39'unu gösterdiğini belirlemişlerdir. Enzim 80 °C'de 3 saat inkübasyonun ardından aktivitesinin % 22'sini koruyabilmiştir. Geniş pH

aralığında aktivite gösteren enzimin optimum pH'ı 5.0'dir. Fakat pH 2.5 ve 11.0'de optimum pH'daki optimum aktivitesine yakın bir aktivite gösterdiği için birden fazla optimum pH'ının olabileceğini bildirmişlerdir. Enzim pH 3.0'de 12 saat stabil olduğunu belirlemişlerdir.

Cho vd. (2003) optimum pH'sı 5.5, sıcaklığı ise 40 °C olan *Pseudomonas syringae* MOK1 fitazının pH 7.0 ve 70 °C'nin üzerindeki değerlerde inaktif olduğunu bildirmişlerdir.

Klebsiella pneumoniae subsp. *pneumoniae* XY-5 fitaz enzimi 37 (297 U/mg protein) ve 55 °C (318 U/mg protein) olmak üzere iki optimum sıcaklığa sahip olduğu saptanmıştır. Optimum sıcaklıklarda pH çalışması yapılmış ve iki sıcaklıkta pH 3.7 ve 5.5 olmak üzere iki optimum pH'ya sahip olduğu bildirilmiştir. Enzimin pH 3.0'den 5.0'e kadar oldukça stabil olduğu, pH 2.0'de ise enzimin orijinal aktivitesinde % 20 kayıp olduğu belirlenmiştir. Enzim pH 6.0 ve üzerindeki değerlerde ise aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. Enzim 60 °C ve pH 5.0 koşullarında 4 saate kadar stabil, 65 °C ve 68 °C'de ise 10 dakika inkübasyonun ardından orijinal aktivitesinin sırasıyla % 50 ve 80'ini kaybetmiştir (Wang vd., 2004).

Casey ve Walsh (2004) *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959 fitazının optimum aktivitesini 65 °C'de gösterdiğini bildirmişlerdir. Enzimin domuzların fizyolojik sıcaklığı olan 39 °C'de orijinal aktivitesinin % 68'ini koruyarak ticari enzimlere göre daha kararlı olduğunu belirlemişlerdir. Enzimin 80 °C'deki termal kararlılığı 5 dakika boyunca belirlenmiş ve 120 saniye sonunda aktivitesinin % 48'ini korurken, 4 ve 5 dakika sonunda sırasıyla aktivitesinin % 34 ve % 20'sini koruduğu belirlenmiştir. Optimum pH'sı 5.0 olan enzim, pH 5.5'de optimum aktivitesinin % 61'ini göstermektedir. Düşük pH değerlerinde oldukça kararlı olduğu belirlenen enzim pH 2.0'da 6 saat aktivitesinin tamamını korumuştur.

Quan vd. (2004) *Cladosporium* sp. FP-1 fitazının optimum aktivitesini pH 3.5 ve 40 °C'de gösterdiğini bildirmişlerdir. Enzimin pH 3.5'de 10-90 °C sıcaklık aralığında 60 dakika inkübasyonu sonucu 10-60 °C sıcaklıklarında aktivitesinin % 80'ini korumuştur. Farklı tamponlarda 37 °C'de inkübe edilen enzim pH 3.5-4.5 arasında aktivitesinin % 80'den fazlasını korumuştur.

Optimum pH'ı 5.4 olan *Rhizomucor pusillus* fitazı pH 3.0-7.8 aralığında optimum aktivitesinin % 80'ini sergilediği bildirilmiştir. Enzimin optimum sıcaklığı ise 70 °C olduğu belirlenmiştir (Chadha vd., 2004).

Lactobacillus pentosus fitazının pH 3.5'ten 6.0'ya kadar olan pH aralığında aktif olduğu belirlenmiş ve optimum aktivitesini pH 5.0'de sergilediği bildirilmiştir. Enzim pH 4.5 ve 5.5'da optimum aktivitesinin % 50'sini, pH 4.0 ve 6.0 değerlerinde ise optimum aktivitesinin % 20'sini sergilemektedir. Optimum aktivitesi 50 °C olan enzim 37'den 60 °C'ye kadar optimum aktivitesinin % 40'ını sergilemektedir (Palacios vd., 2005).

Aspergillus oryzae AK9 mikroorganizmasından elde edilen ham fitaz enzimi maksimum aktivitesini pH 5.0 ve 70-75 °C'de göstermektedir. Enzim 2.0- 3.6 ile 5.0-7.0 pH aralıklarında 2 saat boyunca stabildir. Enzim 40-70 °C aralığında 2 saat inkübasyon sonucunda aktivitesinin % 80'den fazlasını, 80 °C'de ise aktivitesinin % 66'sını koruyabilmiştir (Chantasartasamee vd., 2005).

Aspergillus niger 307 tarafından ekstraselüler olarak üretilen enzimin 2.62 (% 80) ve 5.05 olmak üzere iki optimum pH'ya sahip olduğu ve pH 2.0-2.5 aralığında aktivitesinin % 50'sini gösterdiği bildirilmiştir. Optimum sıcaklığı ise, pH 2.62'de 58 °C ve pH 5.05'de ise 55 °C olduğu belirlenmiştir. Aktivasyon enerjisi 59.16 kJ/mol olarak hesaplanmıştır (Sariyska vd., 2005).

Aspergillus niger van Teighem fitazının optimum pH'ı 2.0-2.5 aralığında olduğu belirlenmiştir. Enzimin pH 5.0-5.5 aralığında aktivite kaybının başladığı, nötral pH değerlerine doğru ise, aktivitesini tamamen kaybettiği bildirilmiştir. Enzim pH 1.5'da orijinal aktivitenin % 49'unu (384 nkat/mL) gösterdiği bildirilmiştir. Sıcaklık arttıkça aktivitesi artan enzimin optimum sıcaklığı, 55 °C olarak belirlenmiştir. Enzim 30, 37 ve 45 °C'de 24 saat inkübasyonun ardından aktivitesini koruyabilmiştir. Enzim 24 boyunca 55 °C'de hiçbir stabilizasyon ajanı olmadan aktivitesinin % 89'unu, 10 mM CaCl₂ varlığında aktivitesinin % 93 ve 10 mM glisin varlığında ise, aktivitesinin % 97'sini koruyabilmiştir. Enzim 65 °C'de 30 dakikada inkübasyonun ardından aktivitesinin % 50'sini gösterebildiği, 4 saat sonunda ise, aktivitesinin ancak % 25'ini gösterebildiği bildirilmiştir. Enzim pH 2.0-7.0 aralığında 24 saat boyunca aktivitesinin tamamını koruyabilmiştir.

Enzimin deaktivasyon ve aktivasyon enerjisi sırasıyla 384 ve 1.438 cal.mol⁻¹ olarak hesaplanmıştır. (Vats ve Banerjee, 2005).

Kodamaea ohmeri BG3 tarafından ekstraselüler olarak üretilen fitaz enziminin optimum koşulları pH 5.0 ve 65 °C'dir. Farklı sıcaklıklarda 1 saat inkübe edilen enzim 60 °C'ye kadar aktivitesinin tamamını korurken, 70°C'de ise tamamen inaktive olduğu bildirilmiştir. Enzim 3.0-9.0 pH aralığında 4 °C'de 6 saat boyunca aktivitesini koruyabilmiştir (Li vd., 2008).

Mucor indicus MTCC 6333 fitazı, optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla, 6.0 ve 70 °C'dir. Enzim pH 3.0-8.0 aralığında aktiftir ve optimum aktivitesinin % 81'ini göstermektedir. Farklı pH'larda (3.0, 5.0, 7.0) ve sıcaklıklarda (50, 60, 70 °C) 4 saat inkübe edilen enzimin 60 °C'de ve pH 3.0'da 1.5 saat oldukça stabil olduğu ve pH 5.0 ve 7.0'da aktivitesinin % 80'ini koruduğu belirlenmiştir (Gulati vd., 2007b).

Greiner ve Farouk (2007) gram negatif bir bakteri tarafından sentezlenen fitazın optimum pH ve sıcaklığını sırasıyla, 4.5 ve 65 °C bulmuşlardır. pH 7.0 ve üzerindeki değerlerde inaktif olduğunu bildirmişlerdir. Enzim pH 3.0'de optimum aktivitesinin % 40'ını gösterirken, pH 2.5'de ise optimum aktivitesinin % 20'sini sergilemiştir. Enzim 4 °C'de pH 3.0-8.0 aralığında 14 gün boyunca aktivitesinin tamamını koruyabilmiştir, fakat pH 2.0 ve altındaki değerlerde ciddi bir aktivite kaybı gözlenmiştir. Enzim 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra, pH 1.5'de aktivitesinin % 72'sini kaybederken, pH 9.0'da ise orijinal aktivitesinin % 65'ini kaybetmiştir. Enzimin sıcaklık stabilitesi denemelerinde ise, enzimin 10-65 °C aralığında 10 dakika inkübasyondan sonra aktivitesinin tamamını koruduğu bildirilmiştir. Enzim 70 °C'de 10 dakika inkübasyonun ardından ise, orijinal aktivitesinin % 50'sini, 80 °C'de ise aktivitenin % 12'sini koruyabilmiştir. Aktivasyon enerjisi ise 37.5 kJ/mol olarak hesaplanmıştır.

Cryptococcus laurentii ABO 510 fitazı pH 2.5-7.5 ve 24-80 °C sıcaklık aralığında aktiftir. Enzimin optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 5.0 ve 62 °C'dir. Enzim 70 °C'de 3 saat inkübasyonun ardından aktivitesinin % 40'ını kaybetmiştir. Farklı konsantrasyonlarda polietilen glikol, gliserol, sorbitol ve mannitolün ilave edilmesi stabiliteyi etkilememiştir (Staden vd., 2007).

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 göstermektedir. Enzim 60 °C ve pH 8.0'de CaCl₂ varlığında/yokluğunda 3 saat inkübasyonun ardından aktivitesinin % 80'ini koruyabilmiştir. Enzim ayrıca 5 mM CaCl₂ varlığında/yokluğunda pH 8.0 ve 80 °C'de inkübasyonunun ardından aktivitesinin tamamını koruduğu belirlenmiştir (Gulati vd., 2007a).

Aspergillus niger 11T53A9 tarafından ekstraselüler olarak üretilen fitaz enziminin optimum koşulları pH 5.0 ve 55 °C'dir. Enzimin pH 7.0 ve üzerindeki değerlerde ise inaktif olduğu saptanmıştır. Enzim 4 °C'de pH 3.0-8.0 aralığında 14 gün boyunca stabil olduğu bildirilmiştir. Düşük pH değerlerinde de stabil olan enzim, pH 2.0, 4 °C'de 24 saat inkübasyonun ardından aktivitesinin tamamını, 37 °C'de ise aktivitesinin % 95'ini koruyabilmiştir. Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen enzim, 55 °C'ye kadar 10 dakika süresince aktivitesinin tamamını korurken, 70 °C de ise 10 dakika sonra aktivitesinin % 45'ini koruyabilmiştir. Enzimin 80 °C'de 5 dakika inkübasyonun ardından orjinal aktivitesinin ancak % 8'i geriye kalmıştır. Enzimin fitatı hidrolizlemesi için gerekli aktivasyon enerjisi, 39.1 kJ mol⁻¹ olarak hesaplanmıştır (Greiner vd., 2009).

Aspergillus ficuum NTG-23 fitazının optimum pH'sı 1.3 olarak belirlenmiş ve pH 5.2'den sonra nötral pH değerlerinde aktivite göstermediği belirlenmiştir. Enzimin optimum sıcaklığının 67 °C olduğu, 70 ve 80 °C aralığında aktivitesinde ciddi bir düşüş olduğu bildirilmiştir. Enzim 70 °C'de 20 dakika inkübasyonun ardından aktivitesinin % 2'sini, 40 dakika sonra % 40'ını, 60 dakikanın ardından ise % 14'ünü kaybettiği belirlenmiştir (Zhang vd., 2010).

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

Metal iyonları, proteinlerin çoğunda üç boyutlu yapılarının oluşumunda ve aktif merkezde substratların katalizlerinde doğrudan veya dolaylı olarak önemli rol oynamaktadırlar. EDTA ise divalent iyonların şelatlayıcı ajanıdır ve metalloproteinlerin ve aktivasyonları için divalent katyonlara ihtiyaç duyan enzimlerin bir inhibitörüdür (Zubay, 1988; Odibo ve Ulbrich-Hofmann, 2001).

Klebsiella terrigena fitazının 15 dakika 35 °C'de, 10⁻⁴ ve 10⁻³ M arasındaki konsantrasyonlarda metal iyonları ile inkübe edildikten sonra, Mg²⁺ ve Hg²⁺ iyonlarının aktivite üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Mn²⁺ ve

Ca^{2+} iyonlarına karşı aktivitesini büyük oranda korurken, Zn^{2+} ve Cu^{2+} iyonları tarafından kuvvetle inhibe edilmiştir. Fe^{2+} ve Fe^{3+} varlığında fitaz aktivitesinin azalması, Fe-fitat çökeleğinin meydana gelmesinden dolayıdır. EDTA'nın aktivite üzerinde önemli inhibisyon etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Greiner vd., 1997).

Kim vd. (1998) *Bacillus* sp. DS11 fitazının Mn^{2+} , Cd^{2+} iyonları ve EDTA tarafından önemli ölçüde inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Enzimin Mg^{2+} , Hg^{2+} , Ba^{2+} ve Cu^{2+} (5 mM) varlığında aktivitesinin yaklaşık % 50'sini koruduğunu belirlemişlerdir.

Selenomonas ruminantium JY35 fitazının aktivitesi üzerinde 5 mM Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} ve Zn^{2+} iyonları ciddi bir inhibisyona neden olurken, Pb^{2+} varlığında ise enzim aktivitesinde yaklaşık % 50 bir artış gözlenmiştir (Yanke vd., 1999).

Penicillium simplicissimum W46 10 mM Ca^{2+} , K^{+} ve Ag^{+} varlığında önemli ölçüde inhibe olmamış, aktivitesinin % 90'dan fazlasını korumuştur. Enzim aktivitesi üzerine Mg^{2+} , Mn^{2+} ve Cu^{2+} iyonları sırasıyla % 35, 34 ve 13 inhibisyona neden olmuştur. Fe^{2+} (% 89), Fe^{3+} (% 60) ve Zn^{2+} (% 62) iyonlarının ise, aktivite üzerinde ciddi bir inhibisyona neden olduğunu gözlemişlerdir. Metal şelatlayıcı ajanlar EDTA, okzalit ve tartaratın aktivite üzerinde önemli inhibisyon etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Tseng vd., 2000).

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 Ba^{2+} (% 65), Cd^{2+} (% 100), Co^{2+} (% 40), Cr^{2+} (% 55), Cu^{2+} (% 41), Hg^{2+} (% 57) ve Mn^{2+} (% 83) aktiviteyi düşürmüştür. Metal iyonlarından Cd^{2+} hariç diğerlerinin inhibisyon etkisi, aynı oranda Ca^{2+} ilave edilmesi ile ortadan kaldırıldığı bildirilmiştir (Choi vd., 2001).

Pichia anomala fitazının aktivitesi üzerine 1 mM Co^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} katyonları ve EDTA bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Enzimin Hg^{2+} , Zn^{2+} ve Cu^{2+} katyonlarının varlığında, aktivitesinin % 50'sini koruyabildiği, Fe^{3+} katyonunun ise, enzimi güçlü bir şekilde inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Vohra ve Satyanarayana, 2002).

Candida krusei WZ-001 fitazı Mg^{2+} katyonu tarafından önemli ölçüde inhibe olduğu, Zn^{2+} katyonu varlığında ise aktivitesini tamamen kaybettiği bildirilmiştir. Ba^{2+} ve Pb^{2+} varlığının enzim aktivitesi üzerinde önemli bir inhibisyona neden olmadığı bildirilmiştir. Enzim 1 mM Fe^{2+} varlığında orijinal aktivitesinin % 30'unu kaybederken, Fe^{2+} 'nin 5 mM'a kadar artan konstrasyonlarında ise, orijinal aktivitesine ulaştığı belirlenmiştir. EDTA ve oksalat gibi şelatlayıcı ajanların aktivite üzerinde önemli inhibisyon etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Quan vd., 2002).

Lactobacillus sanfranciscensis CB1'den elde edilen fitazın 45 °C'de 30 dakika inkübasyonunun ardından, 2 mM Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} ve EDTA varlığında aktivitesinin % 90'dan fazlasını, Cu^{2+} ve Ni^{2+} varlığında ise % 75'den fazlası korunmuştur. 2 mM Fe^{2+} (% 99) ve Hg^{2+} (% 92) tarafından önemli ölçüde inhibe edilmiştir. EDTA enzim aktivitesi üzerinde önemli bir inhibisyona yol açmamıştır (Angelis vd., 2003).

Citrobacter braakii fitazının metal iyonları ile 37 °C'de 2 saat inkübasyonun ardından, 10 mM'a kadar EDTA ve Cd^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Na^+ katyonlarının aktivite üzerine bir etkisinin olmadığı, çok düşük konsantrasyonlarda bile Fe^{3+} , Zn^{2+} ve Cu^{2+} katyonlarının enzimi güçlü bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur (Kim vd., 2003).

Aspergillus niger ATCC 9142 fitaz 200 mM Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , F^- ve Zn^{2+} iyonları tarafından aktivitede artış sağlar iken, Ca^{2+} iyonu inhibisyona neden olmuştur. Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarının ise, aktivite üzerine herhangi bir etkisi olmadığı bildirilmiştir (Casey ve Walsh, 2003).

Pseudomonas syringae MOK1'den elde edilen fitaz enzimi metal iyonları ile 40 °C'de, 15 dakika inkübe edilmesinin ardından, 5 mM Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} iyonları ve EDTA tarafından önemli ölçüde inhibe edildiği bildirilmiştir ve orijinal aktivitesinin % 70'inin kaybına neden olmuştur (Cho vd., 2003).

Klebsiella pneumoniae subsp. *pneumoniae* XY-5 fitazı metal iyonları içermeyen ortam ile karşılaştırıldığında, 5 mM Al^{3+} tarafından % 125, Co^{2+} tarafından % 120 aktive edilmesi, enzim ile metallerin etkileşimi sonucu, enzim konformasyonundaki değişimlerin, enzimi daha aktif bir hale getirmiş olabileceği

şeklinde açıklanmıştır. Ayrıca, enzimin EDTA tarafından aktive edildiği ve muhtemelen eser miktardaki ağır metalleri ortamdan uzaklaştırarak enzim aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. Ba^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} ve Fe^{2+} iyonları aktivite üzerinde önemli bir inhibisyona neden olmazken, Mg^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} iyonları ve NaN_3 'in ise % 15-20 oranında inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir. Enzimin 5 mM Hg^{2+} varlığında tamamen inhibe olduğu gözlenmiştir (Wang vd., 2004).

Rhizopus oligosporus ATCC 22959 fitazı 200 mM Ca^{2+} varlığında önemli ölçüde inhibe olmamış, aktivitesinin % 86'sını korumuştur. Enzim aktivitesi üzerine Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , F^- iyonlarının etkisi olmazken, bazılarının aktiviteyi artırıcı etkisi olduğu saptanmıştır (Casey ve Walsh, 2004).

Cladosporium sp. FP-1 fitazı Ba^{2+} ve Pb^{2+} varlığında tamamen inhibe olduğu, 1 mM Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , K^+ ve Na^+ varlığında aktivitesinin ancak % 50'ini koruyabilmiştir. Şelatlayıcı ajan olan EDTA ve oksalat varlığında ise enzim aktivitesi sırasıyla % 53 ve % 52 oranında azaldığı bildirilmiştir (Quan vd., 2004).

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

Aspergillus niger van Teighem fitazı, 0.5 mM Al^{3+} varlığında nerdeyse tamamen aktivitesini kaybettiği bildirilmiştir. Enzim 1 mM Ca^{2+} ve K^+ dışındaki diğer iyonların (Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Hg^+ , Co^{2+} , Zn^{2+}) aktivitesini % 90 oranında koruyabildiğini, Ca^{2+} ve K^+ iyonlarının aktiviteyi artırıcı etkisi olduğu belirlenmiştir. EDTA, sitrat, oksalat ve tartarat gibi şelatlayıcı ajanlar 2 mM'a kadar enzim aktivitesi üzerinde etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Vats ve Banerjee, 2005).

Aspergillus niger 307 fitazı Hg^+ , Hg^{2+} ve Cu^{2+} varlığında tamamen aktivitesini kaybettiği bildirilmiştir. Enzim Zn^{2+} tarafından aktivitesinin büyük bir kısmı inhibisyona uğrarken, Fe^{2+} , Fe^{3+} ve Al^{3+} iyonlarının aktivite üzerindeki etkisinin daha az olduğu belirlenmiştir. Enzim Pb^{2+} ve Ag^+ ağır metal iyonları tarafından

aktive edilmesi, iyonların enzim ile etkileşerek aktiviteyi arttıran bir konformasyon oluşturduğu görüşü ile açıklanmıştır. Bu sonuç, enzimin ağır metaller tarafından kontamine olan toprakların iyileştirilmesinde kullanılabileceği fikrinin doğurmuştur (Sariyska vd., 2005).

Cryptococcus laurentii ABO 510'dan elde edilen fitazın 1 mM ve 5 mM Li^+ , Na^+ , K^+ ve Mg^{2+} varlığından etkilenmediği, fakat Cd^{2+} , Hg^{2+} ve Zn^{2+} varlığında aktivitesinin % 50'sini koruyabildiği gözlenmiştir. Enzimin 1 mM Cu^{2+} tarafından önemli ölçüde inhibe edildiği belirlenmiştir (Staden vd., 2007).

Bacillus laevolacticus fitazı Cu^{2+} ve Zn^{2+} varlığında, orijinal aktivitesinin % 50'den fazlasını koruyabilmiştir. Enzim aktivitesi üzerine Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , K^+ , Ba^{2+} ve Co^{2+} katyonlarında önemli ölçüde inhibisyona neden olmadığı bildirilmiştir. Enzim 1 mM EDTA varlığında aktivitesinin % 90'ını kaybederken, 5 mM EDTA tarafından tamamen inhibe edilmesi, enzim aktivitesi üzerinde metal iyonlarının önemli rol oynadığı şeklinde açıklanmıştır (Gulati vd., 2007a).

Mucor indicus MTCC 6333 fitazı, 5 mM B^{2+} (% 43), Mg^{2+} (% 23), Mn^{2+} (% 31), EDTA (% 26), Zn^{2+} (% 25), Na^+ (% 20), K^+ (% 23), Cu^{2+} (% 30) varlığında oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyondan sonra, enzim aktivitesi üzerinde farklı düzeylerde inhibisyona neden olduğu belirlenmiştir. Enzimin aktivitesinde en az etkili olan iyonun ise, Fe^{2+} (% 10) olduğu gözlenmiştir (Gulati vd., 2007b).

Greiner ve Farouk (2007) gram negatif bir bakteri tarafından sentezlenen fitazı, 37 °C'de, 15 dakika metal iyonları ile inkübasyonun ardından, 10^{-4} ve 10^{-3} konsantrasyonlarında Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} ve Cu^{2+} iyonlarının aktivite üzerine çok az ya da bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Fe^{2+} , Fe^{3+} ve Zn^{2+} iyonlarının ise aktivite üzerinde ciddi bir inhibisyona neden olduğunu gözlemişlerdir. EDTA'nın aktivite üzerinde önemli inhibisyon etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Kodamaea ohmeri BG3 fitazın aktivitesi üzerinde 5.0 mM Mn^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Li^+ , Na^+ , Ba^{2+} , Mg^{2+} ve Co^{2+} katyonlarının aktiviteyi arttırıcı etkisi olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında 5.0 mM Zn^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Fe^{3+} ve Fe^{2+} katyonlarının ise enzim aktivitesi üzerinde inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir. Enzimin 1.0 ve 5.0 mM Hg^{2+} varlığında aktivitesini tamamen kaybettiği bildirilmiştir.

EDTA'nın aktivite üzerinde önemli inhibisyon etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Li vd., 2008).

Aspergillus niger 11T53A9 fitazı, 15 dakika, 37 °C'de 10^{-4} ve 10^{-3} M arasındaki konsantrasyonlarda metal iyonları ile inkübe edildikten sonra Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} ve Hg^{2+} iyonlarının aktivite üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Aynı konsantrasyonlarda Zn^{2+} , Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonları tarafından enzimin güçlü bir şekilde inhibe edilmesi, Fe^{2+} ve Fe^{3+} varlığında azalan fitaz aktivitesi, Fe-fıtat çökeleğinin meydana gelmesinden dolayı azalan fıtat konsantrasyonuna dayandırılmaktadır. EDTA, *o*-fenantrolin, oksalat, sitrat ve tartarat gibi şelatlayıcı ajanların enzim aktivitesi üzerinde önemli inhibisyon etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Greiner vd., 2009).

Aspergillus ficuum NTG-23 fıtağı, 10.0 M'a kadar K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} ve Fe^{3+} katyonlarının aktivite üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. EDTA ise, 1.25-10.0 konsantrasyonlarında enzim aktivitesi üzerinde % 10'luk bir artışa yol açtığı belirlenmiştir (Zhang vd., 2010).

2.4. Fıtağların Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin Etkisi

Klebsiella terrigena fıtağının 15 dakika 35 °C'de 10^{-4} ve 10^{-3} M arasındaki konsantrasyonlarda, inhibitörler ile inkübasyonundan sonra, *o*-fenantrolin, oksalat, sitrat ve tartarat şelatlayıcı ajanlarının aktivite üzerinde önemli inhibisyon etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Bunun yanında siyanür, azid ve arsenat aktivite üzerine hiçbir etkide bulunmamıştır. Arsenatın aktivite üzerine etkisinin olmayışı, enzimin aktif merkezinde sülfidril gruplarının olmadığına işaret etmiştir. Bu öneri, enzim aktivitesinde etkisi olmayan daha spesifik sülfidril inhibitörleri 2-merkaptetanol ve iyodoasetat denenerek doğrulanmıştır. Serin inhibitörü olan fenilmetilsülfonil florür (PMSF), önemli bir inhibisyona yol açmamıştır. Florür, fosfat, molibdat ve vanadatın enzimi kuvvetle inhibe ettiği bildirilmiştir (Greiner vd., 1997).

Bacillus sp. DS11 fıtağının 1 mM ve 5 mM PMSF ve 1,4- dithiothreitol (DTT) tarafından inhibe edilmediği bildirilmiştir (Kim vd., 1998).

Penicillium simplicissimum W46 fıtağının 10 mM serin inhibitörü PMSF tarafından inhibe edilmediği bildirilmiştir (Tseng vd., 2000).

Pichia anomala fitazı % 1 veya 1 mM sodyum azid, β -merkaptetoanol, PMSF, gliserol, toluen, DTT, iyodoasetat ve N-bromosüksinamid (NBS) varlığı enzim aktivitesi üzerinde bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Enzimin 2,3- bütandion (% 90) tarafından kuvvetle inhibe edilmiştir ve bu nedenle aktif bölge arjinin amino asidinin bulunduğu ileri sürülmüştür. Enzim anyonik deterjanlardan % 0.1'lik SDS (% 80) tarafından kuvvetle inhibe edildiği fakat noniyonik deterjan olan % 0.1'lik Triton X-100, Tween 80 ve Tween 20 tarafından % 30 aktivite kaybı ile hafif bir inhibisyonun gözlemlendiği bildirilmiştir (Vohra ve Satyanarayana, 2002).

Candida krusei WZ-001 fitazının, sülfidril grubu inhibitörleri olan pCMB (*p*-kloromerküri benzoat) ve iyodoasetat tarafından inhibe edildiği, fakat 2-merkaptetoanol ve DTT tarafından ise stimüle edilmesi enzimin aktif merkezinde -SH gruplarının bulunduğunu göstermektedir şeklinde açıklanmıştır. Serin inhibitörü olan PMSF enzim aktivitesi üzerinde önemli bir inhibisyona yol açtığı gözlenmiştir (Quan vd., 2002).

Lactobacillus sanfranciscensis CB1'den elde edilen fitazın 2 mM NEM, iodoasetamid, PMSF, DL-penisilamin, DTT varlığında 45 °C'de 30 dakika inkübasyonunun ardından, serin inhibitörü olan PMSF tarafından kuvvetle inhibe edildiği bildirilmiştir. DL-penisilamin tarafından fitaz aktivitesi çok az etkilenirken, diğer inhibitörler enzim aktivitesi üzerinde önemli bir inhibisyona yol açmamıştır (Angelis vd., 2003).

Citrobacter braakii fitazının 2-mercaptoetanol ve DTT tarafından inhibe edilmediği bildirilmiş ve bu nedenle enzimin aktivitesinde molekül içi disülfid köprülerinin etkisinin olmadığı ileri sürülmüştür. Triton X-100'ün enzim aktivitesini % 150 arttırdığı, fakat % 0.0025 SDS ve 8 M üre ile inkübe edilen enzimin tamamen aktivitesini kaybettiği bildirilmiştir (Kim vd., 2003).

Cladosporium sp. FP-1 fitazının sülfidril grubu inhibitörleri olan iyodoasetat ve pCMB tarafından inhibe edildiği, fakat 2-merkaptetoanol ve DTT tarafından ise stimüle edilmesi, enzimin aktif merkezinde -SH gruplarının bulunduğunu göstermektedir şeklinde açıklanmıştır. Serin inhibitörü olan PMSF enzim aktivitesi üzerinde önemli bir inhibisyona yol açtığı gözlenmiştir (Quan vd., 2004).

Lactobacillus pentosus fitazı sülfidril grubunu bloke eden iyodoasetik asit ile inhibe olurken, genelde fitazları inhibe eden L-askorbik asit (1.0 mM) ise, enzim aktivitesini arttırıcı etkisi olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan, katalitik aktivite için sülfidril gruplarının gerekli olduğu şeklinde açıklanmıştır. Serin inhibitörü olan PMSF, özellikle yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında aktivitede ciddi inhibisyonlar gözlenmiştir. Şelatlayıcı ajanlardan EDTA ve *o*-fenantrolinin enzim aktivitesine etkisinin konsantrasyona bağlı olduğu, 10 mM da aktivitesini neredeyse tamamen kaybettiği, 1 mM EDTA varlığında ise aktivitede % 30 artış meydana geldiği bildirilmiştir. Fosfotazların spesifik inhibitörü olan disodyum pirofosfat 1 ve 10 mM varlığında enzimin inhibe olduğu bildirilmiştir (Palacios vd., 2005).

Aspergillus niger van Teigham fitazı, sülfidril grubu inhibitörü olan β -merkoptoetanol ve iyodoasetat, serin ve sistein kalıntılarına spesifik inhibitör olan PMSF, *p*HMB (*p*-hidroksimerkürbenzoik asit) ve fosfomisin 2 mM'a kadar olan konsantrasyonlarında, bir inhibisyon olmadığı saptanmıştır. Enzim aktivitesi üzerinde katotropik ajanlardan guanidinyum hidroklorür, üre ve potasyum iyodür 0.5-8.0 M aralıklarında etkisi araştırılmış ve aktivite üzerinde ciddi inhibisyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Vats ve Banerjee, 2005).

Gulati vd. (2007b) *Mucor indicus* MTCC 6333 fitazı, 5 mM DTT ve SDS varlığında oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra enzim aktivitesinde % 20 inhibisyona neden olduğunu bildirmişlerdir.

Greiner ve Farouk (2007) gram negatif bir bakteri tarafından sentezlenen fitaz enzimi 37 °C'de, 15 dakika 10^{-4} ve 10^{-3} konsantrasyonlarında *o*-fenantrolin, oksalat, sitrat ve tartarat gibi denaturant ve şelatlayıcı ajanlar ile inkübasyonun ardından, aktivite üzerine bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Birçok bakteriyel fitazın inhibitörü olan, hidroliz ürünü fosfatın yapısal analogu florürün, aktivite üzerinde ciddi bir inhibisyona neden olduğunu gözlemişlerdir. Florün yanında molibdat, vanadat ve wolframat gibi diğer fitaz enzimi inhibitörlerinin de, aktiviteyi kuvvetle inhibe ettiği bildirilmiştir.

Kodamaea ohmeri BG3 fitazının aktivitesi üzerine 1,10-fenantrolin bir etkisinin olmaması, enzimin metaloenzim olmamasının bir göstergesi olarak yorumlanmıştır. Serin inhibitörü olan PMSF ve iyodoasetat varlığında enzim

aktivitesi üzerinde önemli bir inhibisyon gözlenmemiştir. Enzimin histidin asit fosfotazın spesifik inhibitörü olan fenilglikoyoksal tarafından kuvvetli bir şekilde inhibe olduğu belirtilmiştir (Li vd., 2008).

Aspergillus niger 11T53A9 fitazı, fitaz inhibitörü olan F^{-1} , hidroliz ürünü olan fosfatın yapısal analogu olan molibdat, wolframat ve vanadat ile 10^{-4} ve 10^{-3} M arasındaki konsantrasyonlarda, 15 dakika $37^{\circ}C$ 'de inkübe edildiğinde, kuvvetli bir şekilde inhibe edildiği bildirilmiştir. Florid fitat hidrolizini K_i $158 \mu\text{mol L}^{-1}$ ile inhibe ettiği belirlenmiştir (Greiner vd., 2009).

2.5. Fitazların Stabilitesi Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi

Pichia anomala fitazı % 1 veya 1 mM gliserol ve toluen varlığının, enzim aktivitesi üzerinde bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Vohra ve Satyanarayana, 2002).

Aspergillus niger van Teighem fitazı % 10 (v/v) hekzan, bütanol, dimetilsülfoksit (DMSO), dimetilflorür (DMF), ve benzil alkol ile $25^{\circ}C$ 'de, 2 saat boyunca inkübasyona bırakıldığında, DMSO ve DMF enzim aktivitesini etkilemez iken, benzil alkol ve bütanol ile aktivitenin % 83 ve 88'inin korunabildiği saptanmıştır (Vats ve Banerjee, 2005).

2.6. Fitazların Substrat Spesifitesi

Klebsiella terrigena fitazının fitata karşı oldukça spesifik olduğu ve fitata karşı en yüksek turnover sayısına sahip olduğu saptanmıştır. NADP (% 57) ve *p*-nitrofenilfosfat (% 24) dışında, diğer fosforillenmiş bileşiklerin ise ancak fitatın hidrolizleme hızının maksimum % 10'una ulaşabildiği saptanmıştır. Fitatın hidroliz ürünlerinin I (1,2,4,5,6) P_5 ve I (1,2,5,6) P_4 olduğu belirlenmiştir. Sodyum fitatın hidrolizi için kinetik parametreleri K_m 300 mM ve k_{cat} 180 s^{-1} olarak hesaplanmıştır (Greiner vd., 1997).

Kim vd. (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 değerini 0.55 mM olarak hesaplamışlardır.

Aspergillus niger SK-57 mikroorganizmasından saflaştırılmış fitazın pH 5.5 ve 37 °C'de fitik asit ile K_m değeri $18.7 \pm 4.6 \mu\text{M}$ ve spesifik aktivitesi 158 U/mg olarak hesaplanmıştır. Fitik aside oldukça spesifik olan bu enzimin, diğer fosforillenmiş bileşikleri hidrolizlenme hızının, fitatın ancak % 2'si kadar olabildiği belirlenmiştir (Nagashima vd., 1999).

Penicillium simplicissimum W46 fitazının geniş substrat spesifikliğine sahip olduğunu ve dodecasodyum fitatın substrat olarak kullanıldığında en düşük aktiviteye sahip olmasına rağmen, dodeka sodyum fitat ($\text{Na}_{12}\text{IP}_6$) substrat olarak kullanıldığında enzimin K_m değeri 813U/mL olarak hesaplanmıştır. Enzimin aşırı substrat varlığında ($>2 \text{ mmol/L}$) inhibe olduğu bildirilmiştir (Tseng vd., 2000).

Bacillus sp. KHU-10 fitazı sodyum fitat dışında kullanılan diğer substratlara karşı hiç aktivite göstermemiştir. Enzimin pH 7.0'de sodyum fitat için, k_{cat} 26.6 s^{-1} ve K_m değeri $50 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır (Choi vd., 2001).

Pichia anomala fitazı *p*-nitrofenil fosfat ve ATP'ye karşı, fitik aside benzer aktiviteye sahiptir. Ayrıca, ADP ve glukoz-6-fosfat gibi fosfat esterleri içeren bileşiklere karşı da, aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Fitat için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.20 mM, $6.34 \mu\text{mol/mg protein/dk}$ olarak belirlenmiştir (Vohra ve Satyanarayana, 2002).

Candida krusei WZ-001 fitazı, fosforillenmiş birçok bileşiği hidrolizleyen oldukça geniş substrat spesifikliği göstermesine rağmen, fitatı hidrolizleme hızının oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. D-fruktoz-1,6-difosfat hariç, substrat spesifikliği için kullanılan diğer bileşikleri hidrolizleme hızı, fitata göre maksimum % 24 iken, D-fruktoz-1,6-difosfat ise, hidrolizlenme hızı % 49 olarak saptanmıştır. Sodyum fitat için K_m 0.03 mM olarak hesaplanmıştır. Enzimin 10 mM'dan daha yüksek substrat konsantrasyonlarında substrat tarafından inhibe olduğu belirlenmiştir. Fitatın hidroliz sonucu oluşan ürünlerin 1D ve 2D NMR analizleri ile *myo*-inositol 2-monofosfat olduğunu tespit edilmiştir (Quan vd., 2002).

Kim vd. (2003) *Citrobacter braakii* YH-15'in fitazının sodyum fitat dışında kullanılan diğer substratlara karşı, oldukça düşük aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Enzimin sodyum fitat için spesifik aktivitesi $3457 \text{ unit. mg}^{-1}$, K_m değeri 0.46 mM, V_{max} ise 6027 U. mg^{-1} olarak hesaplamışlardır.

Aspergillus niger ATCC 9142 fitazı fitik asidin kalsiyum tuzuna, sodyum tuzundan daha fazla spesifik iken, fitat olmayan fosforillenmiş substratlara karşı daha az aktivite göstermektedir. Enzimin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 100 mM ve 7 nmol/s olarak bildirilmiştir (Casey ve Walsh, 2003).

Fitik aside karşı oldukça spesifik olan *Pseudomonas syringae* MOK1 fitazının *p*-nitrofenil fosfat, glukoz-1-fosfat, fruktoz-6-fosfat, gliserofosfat, sodyum pirofosfat, α -naftil fosfat ve ATP gibi çeşitli fosfat içeren konjugatları hidrolizleme hızının oldukça düşük (% 5) olduğu bildirilmiştir. Optimum koşullar altında fitik asit için, K_m ve V_{max} kinetik parametreleri sırasıyla, 0.38 mM ve 769 U/mg protein olarak hesaplanmıştır (Cho vd., 2003).

Quan vd. (2004) *Cladosporium* sp. FP-1 fitazının çeşitli fosfat esterlerine karşı aktivitesini belirlemiş ve enzimin *myo*-inositol monofosfat dışında, *myo*-inositol fosfatlara da oldukça yüksek ilgi gösterdiğini bildirmişlerdir. Asit fosfataz enzimlerinin genel substratı olan *p*-nitrofenil fosfat ve β - gliserofosfata karşı bir aktivite saptanmamıştır. Diğer mono- ve difosfat içeren bileşiklere karşı çok az aktivite gösterdiği, fitat için K_m değerininin $15.2 \pm 3.1 \mu\text{M}$ olduğu hesaplanmıştır. Fitatın hidroliz sonucu oluşan ürünlerin, 1D ve 2D NMR analizleri ile *myo*-inositol 1,2,5-trifosfat olduğunu belirlemişlerdir.

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

Casey ve Walsh (2004) *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959 fitazının fosforillenmiş substratlara karşı oldukça geniş bir özgülüğe sahip olduğunu saptamışlardır. Na-fitat ve Ca-fitata karşı aynı özgülüğe sahip olup, 2-naftil fosfat, 1-naftil fosfat, fenil fosfat, gliserol-2-fosfat ve glukoz-1-fosfata karşı sodyum fitata göre % 85 ve üzerinde aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Sodyum fitat için k_{cat} değeri 51 s^{-1} , K_m değeri $10.4 \mu\text{M}$, V_{max} ise 1.32 nmol.s^{-1} olarak hesaplamışlardır.

Lactobacillus pentosus fitazı monofosfatlı bileşikleri ve fitatı hidrolizlemesine karşın, en yüksek hidrolizleme hızını *p*-nitrofenil fosfata karşı göstermiştir.

Enzimin *p*-nitrofenil fosfatı hidrolizleme hızını sırasıyla, D-fruktoz-6-fosfat ve D-glukoz-6-fosfatın takip ettiği bildirilmiştir. Enzim asetil fosfat ve *O*-fosfo-DL serin gibi monofosfatlara karşı oldukça düşük aktivite göstermiştir. *p*-Nitrofenil fosfat için, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla, $2.44 \mu\text{mol L}^{-1}$ ve $820.0 \mu\text{mol.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır (Palacios vd., 2005).

Aspergillus niger 307 fitazının fitat için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla $0.929 \mu\text{M}$ ve 52.36 nkat/cm^3 olarak hesaplanmıştır. Fitik aside oldukça spesifik olan enzim, diğer fosforillenmiş bileşikleri hidrolizlenme hızı, fitatın maksimum % 3'ü kadar olduğu belirlenmiştir (Sariyska ve ark. 2005).

Vats ve Banerjee (2005) *Aspergillus niger* van Teighem fitazının sodyum fitat dışında kullanılan diğer substratlara karşı, oldukça düşük aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Sodyum fitat için spesifik aktivitesi $22.592 \text{ U.mg protein}^{-1}$, K_m değeri $130 \mu\text{M}$, katalitik turnover sayısı ise 628 s^{-1} olarak hesaplamışlardır.

Cryptococcus laurentii ABO 510 fitazının ATP (% 77), D-glukoz 6-fosfat (% 74), D-glukoz-1-fosfat (% 77), D-fruktoz-1,6-difosfat (% 202) ve *p*-nitrofenil fosfat (% 153) substratlarına karşı, aktif olduğu belirlenmiştir. Sodyum fitat için K_m değeri, 0.021 mM olarak hesaplanmıştır (Staden vd., 2007).

Gulati vd. (2007b) *Mucor indicus* MTCC 6333 fitazının geniş substrat spesifikliğine sahip olduğu, dodekasodyum fitat substrat olarak kullanıldığında enzimin K_m değeri 200 nmol/L ve V_{max} 'ı 113 nmols^{-1} olarak hesaplanmıştır.

Greiner ve Farouk (2007) gram negatif bir bakteri tarafından sentezlenen fitazın sodyum fitat dışında kullanılan diğer substratlara karşı oldukça düşük aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Enzimin pH 4.5 ve $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de sodyum fitat için k_{cat} 1164 s^{-1} , K_m değeri 0.15 mmol/L olarak hesaplamışlardır. Diğer bakteriyel enzimler aşırı substrat varlığında ($>7 \text{ mM}$) inhibe olduğu bildirilmiştir.

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 $\text{NaDPH}_2.\text{Na}_4$ substratlarına karşı % 5.08-40 arasında aktivite gösterdiği bildirilmiştir. K_m ve

V_{max} kinetik parametleri sırasıyla 0.526 mM ve 12.3 $\mu\text{mol/dk/mg}$ olarak hesaplanmıştır (Gulati vd.,2007a).

Aspergillus niger 11T53A9 fitazının fitik aside karşı, en yüksek k_{cat}/K_m değerine sahip olması, fitik aside oldukça spesifik bir enzim olduğunu göstermiştir. Enzimin 37 °C ve pH 5.5'de, K_m ve k_{cat} kinetik parametleri sırasıyla, 54 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ve 190 s^{-1} olarak hesaplanmıştır. Diğer fungus fitazları gibi, aşırı substrat varlığında inhibe olduğu belirlenmiş ve inhibisyonun 2.5 mM konsantrasyondan fazla olduğunda gerçekleştiği saptanmıştır. Enzimin fitatı hidrolizlemesi sonucu oluşan son ürünün, *myo*-inositol monofosfat olduğu belirlenmiştir (Greiner vd., 2009).

Aspergillus ficuum NTG-23 fitazı ATP, D-glukoz-6-fosfat, D-fruktoz-6-fosfat substratlarını sodyum fitata göre iki katı daha fazla hızda hidrolizlediği bildirilmiştir. Enzimin K_m ve V_{max} kinetik parametreleri sırasıyla 0.295 mM ve 55.9 nmol olarak hesaplanmıştır (Zhang vd., 2010).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kimyasallar

4-nitrofenil-fosfat, 5-brom-4-klor-3-indol fosfat, $AlCl_3$, amonyum vanadat, borik asit, Coomassie Brilliant Blue G-250, cron step liquor, DEAE-Sefaroz CL-6B, Fenil Sefaroz CL-4B, D-fruktoz-1,6-bisfosfat, D-fruktoz-6-fosfat, D-glukoz-1-fosfat, D-glukoz-6-fosfat, etilasetat, glukoz, glutation, $MnSO_4 \cdot H_2O$, N,N'-metilen bis-akrilamid, NaF, sığır serum albumini, sodyum fitat, standart protein karışımı [Miyosin (tavşankanı, 205 kDa), β -Galaktozidaz (E.coli, 116 kDa), Fosforilaz B (tavşankanı, 97.4 kDa), Albumin (Bovine 66 kDa), Albumin (yumurta 45 kDa), Karbonik anhidraz (bovin eritrosit, 29 kDa)], sukroz, Tween 80, α -gliserofosfat, α -naftil fosfat, β -gliserofosfat ve β -naftil fosfat Sigma (Taufkirchen, Almanya) firmasından; Agar-agar, akrilamid, amonyum molibdat, amonyum persülfat, amonyum sülfat, aseton, $BaCl_2$, brom fenol mavisi, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $CoCl_2$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, etanol, etilen diamin tetraasetik asit ($EDTA-C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, gliserol, glisin, HCl, hekzan, Hg_2Cl_2 , izopropanol, KCl, maleik asit, metanol, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnCl_2 \cdot 2H_2O$, NaOH, n-bütanol, NH_4Cl , $NiCl_2$, sitrik asit, sodyum dodesil sülfat (SDS), sülfürik asit (H_2SO_4), TEMED, trikloroasetik asit, Tris baz, Triton X-100, üre, yeast ekstrakt (maya özütü), $ZnCl_2$, β - merkaptoetanol, Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından; 1,4-dithiothreitol (DTT), 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), fenil metil sülfonil florür (PMSF), iodoasetamid (İAA), metil-p-toluen-sulfonat (CMC), N-bromo suksinamid (NBS), *o*-fosforik asit, sikloheksil-N-(2-morfolinoetil)-karboimid ve tripton Fluka (Buchs, İsviçre) firmasından; 1,4-dioksan, dimetil sülfoksit (DMSO), etilen glikol, sodyum asetat, Panreac (Barcelona, İspanya) firmasından; asetonitril SDS (Peypin, Fransa) firmasından; askorbik asit Calbiochem (Amerika Birleşik Devletleri) firmasından; LiCl ve Na_2SeO_3 AVOKADO (Karlsruhe, Almanya) firmasından; KH_2PO_4 , NaCl ve sodyum sitrat CARLO ERBA (İtalya) firmasından; asetik asit, benzen, dietileter, propanol ve toluen Riedel-de Haën (Seelze, Almanya) firmasından; malt ekstrakt agar Lab M (Bury, İngiltere) firmasından; sorbitol ACROS (Geel, Belçika) firmasından; AFBA Oxoid (Hampshire, İngiltere) firmasından sağlanmıştır.

3.2. Fitaz Üreten Fungusların Taranması ve Seçimi

Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji laboratuvarı stok kültürlerinde kayıtlı havadan ve topraktan izole edildikten sonra tanısı yapılmış, malt ekstrakt agar ortamında 4 °C’de muhafaza edilen 165 adet fungus, çalışmaya başlamadan önce spor gelişimleri sağlandı. Bu fungusların fitaz üretme kapasitesi, fosfor kaynağı olarak sodyum fitatın kullanıldığı PSM (phytase screening medium) besiyerinde taranarak belirlendi. Ekstraselüler fitaz enzimi üreten funguslar besiyerinde şeffaf zon oluşturup oluşturmadıklarına bakılarak seçildi (Lee vd., 2005; Howson ve Davis, 1983).

Fungus örneklerinin fitaz üretme kapasiteleri, Lee vd. (2005) tarafından modifiye edilen fitaz tarama ortamı (PSM) (Howson ve Davis, 1983) ile petrilere gerçekleştirildi. İçeriği Tablo 3.1’de verilen PSM tarama ortamının pH’sı 1.0 M NaOH ile pH 5.0’e ayarlanarak, 121 °C’de, 15 dakika 1.5 psi atmosfer basınçta otoklavda (Hirayama HA-240 M IV, Japan) sterilize edildi. Besiyeri 40-50 °C’da kadar soğuduktan sonra hazırlanan tarama ortamı, aseptik koşullar altında steril petrilere dökülerek besiyerinin katılaşması beklenildi. Daha sonra malt ekstrakt agar ortamında spor oluşumu sağlanarak, stok fungus kültürlerinden PSM içeren petrilere tek nokta ekimi yapıldı. Petri plakları 30 °C’deki etüvde (Heraeus T6, Germany) 72 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, şeffaf zon oluşturan her koloninin mikroorganizma ve koloninin oluşturduğu zon çapları ölçüldü. Şeffaf zon oluşturan her koloninin fitaz enzimi aktivitesi, oluşan şeffaf zon çapının koloni çapına oranlanması ile belirlendi.

Fitaz aktivitesi gösteren funguslar yatık malt ekstrakt agar içerisinde üzerine mineral yağ eklenip hava ile teması kesilerek 4 °C’de saklandı. Stokların uzun süre muhafaza edilmesi için % 10’luk steril gliserol içerisine fungusun sporları alınarak -20 °C’de saklandı. Fitaz enzimi aktivite derecesi aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\text{Fitaz enzimi aktivite derecesi} = \frac{\text{Şeffaf zon çapı}}{\text{Koloni çapı}}$$

Suşların enzim üretim kapasitelerinin karşılaştırılmaları zon çapı ve mikroorganizma çapı oranlanarak yapıldı. En iyi fitaz üreten suşu belirlemek amacıyla, yukarıda açıklanan tarama yöntemine göre, fitaz aktivitesi bakımından

pozitif sonuç veren ve zon çapı ile mikroorganizma çapının birbirine oranı 3 ve üzerinde olan en iyi 25 suş seçildi. Bu 25 suşun fitaz üretme kapasitelerini daha iyi belirlemek için, sıvı besi ortamında kültüre alınarak, tekrar yeni bir taramaya tabi tutuldu. Bu suşlar, başlangıç pH'sı 5.5 olarak ayarlanan, içeriği Tablo 3.6'da verilen, 100 mL fitaz üretim ortamı içeren, 500 mL'lik erlenlere uygun seyreltmelerden spor sayısı 10^6 spor/mL olacak şekilde, inoküle edildi. Kùltürler 30 °C'deki inkübatörde (Newbrunswick Scientific Innova 43, USA) 110 rpm'de 10 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresince aseptik koşullar altında her gün alınan örnekte aktivite tayini yapıldı.

Aktivite tayini, pH ve sıcaklığın sırasıyla 5.5, 37 °C'de Tablo 3.2'de belirtilen koşullar altında gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda, reaksiyon karışımları 0.4 mL % 15 TCA (trikloro asetik asit) eklenerek reaksiyon durduruldu. Karışımlar $2.000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüjlendi, (Heraeus-Biofuge pico, Germany) ve süpernatanttan alınan 0.2 mL örnek, renk reaktifi ile muamele edilerek, 820 nm'de köre karşı absorbansları spektrofotometrede (Shimadzu UV-1700, Japan) ölçüldü. Kantitatif fitaz aktivitesi taraması sonucunda en yüksek aktiviteye sahip toprak izolatu, *Aspergillus niger* UA-D suşu fitaz üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu için seçildi.

Tablo 3.1. Fitaz tarama agar ortamının içeriği (PSM)

Kimyasal Madde	Miktarı (g/L)
Sodyum fitat	5
Sukroz	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
Trypton	3
Yeast ekstrakt	2
KCl	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	1
MnSO ₄ .H ₂ O	0.007
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.02
Triton X-100	1
Agar	15

Tablo 3.2. Kantitatif fitaz aktivitesi taramasında reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
Enzim çözeltisi	200 µL	200 µL
37 °C'de 5 dk ön inkübasyon		
% 15 TCA	400 µL	-
% 1 Sodyum fitat (0.2 M pH 5.5 sitrat tampon)	-	200 µL
37 °C'de 15 dk inkübasyon		
% 15 TCA	-	400 µL
% 1 Sodyum fitat (0.2 M pH 5.5 sitrat tampon)	200 µL	-
2.000 x g'de 10 dk santrifüj		
0.2 mL süpernatant + 1.8 mL ultrasaf su + 2 mL renk çözeltisi		
50 °C'de 15 dk inkübasyon		
820 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümü		

Enzim ünitesi: Belirli koşullarda, dakikada 1 µmol sodyum fitattan inorganik fosfatın serbestlenmesini sağlayan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir.

3.3. Fitaz Aktivitesinin Kantitatif Tayini

Fitaz aktivitesi tayininde Kim ve Lei (2005) tarafından modifiye edilmiş substrat olarak tamponda hazırlanan sodyum fitatın kullanıldığı kolorimetrik yöntem olan askorbik asit metodu kullanıldı. Substratın asidik tamponda hidrolize olması sebebiyle, denemelerden hemen önce taze olarak hazırlandı. Aktivite tayini optimum sıcaklık ve pH belirlenmeden önce Tablo 3.3'de belirtilen koşullar altında, optimum koşullar belirlendikten sonra ise Tablo 3.4'deki standart deney koşullarında gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda reaksiyon 0.4 mL % 15 (g/mL) trikloroasetik asit ile enzimin denatürasyonu sonucu durduruldu. Karışım 2.000 x g'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatanttan 0.2 mL örnek alınarak 1.8 mL ultrasaf su ile karıştırıldı. Karışıma 2 mL renk reaktifi ilave edilerek (3:1:1, 1 M sülfirik asit: % 2.5 amonyum molibdat: % 10 askorbik asit) 50 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra 820 nm'de köre karşı absorbansları spektrofotometrede (Shimadzu UV-1700, Japan) ölçüldü. Kör ise Han vd. (1999) tarafından çalışmalarında belirtildiği gibi hazırlanmış, fakat enzim ile TCA'nın inkübasyon süresi 30 dakikaya uzatıldı.

Tablo 3.3. Kantitatif fitaz aktivite tayini reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 3.0, 60 °C)	350 µL	350 µL
Enzim çözeltisi	20 µL	20 µL
60 °C'de 5 dk ön inkübasyon		
% 15 TCA	400 µL	-
100 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	-	30 µL
60 °C'de 30 dk inkübasyon		
% 15 TCA	-	400 µL
100 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	30 µL	-
2.000 x g'de 10 dk santrifüj		
0.2 mL süpernatant + 1.8 mL ultrasaf su + 2 mL renk çözeltisi		
50 °C'de 15 dk inkübasyon		
820 nm'de spektrofotometrede absorpsiyon ölçümü		

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

Tablo 3.4. Standart deney koşullarında kantitatif fitaz tayini reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 3.0, 70 °C)	350 µL	350 µL
Enzim çözeltisi	20 µL	20 µL
70 °C'de 5 dk ön inkübasyon		
% 15 TCA	400 µL	-
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	-	30 µL
70 °C'de 30 dk inkübasyon		
% 15 TCA	-	400 µL
100 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	30 µL	-
2.000 x g'de 10 dk santrifüj		
0.2 mL süpernatant + 1.8 mL ultrasaf su + 2 mL renk çözeltisi		
50 °C'de 15 dk inkübasyon		
820 nm'de spektrofotometrede absorpsiyon ölçümü		

Enzim ünitesi: Standart deney koşullarında dakikada 1 µmol sodyum fitattan inorganik fosfatın serbestlenmesini sağlayan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir. Enzim karakterizasyon çalışmalarının tümünde, bu enzim ünitesi kullanılmıştır.

Fitaz aktivitenin hesaplanması aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır;

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

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

- Pi : İnorganik fosfat konsantrasyonu
 V_T : Total reaksiyon hacmi
 t : İnkübasyon süresi
 V_E : Reaksiyon karışımındaki enzim miktarı

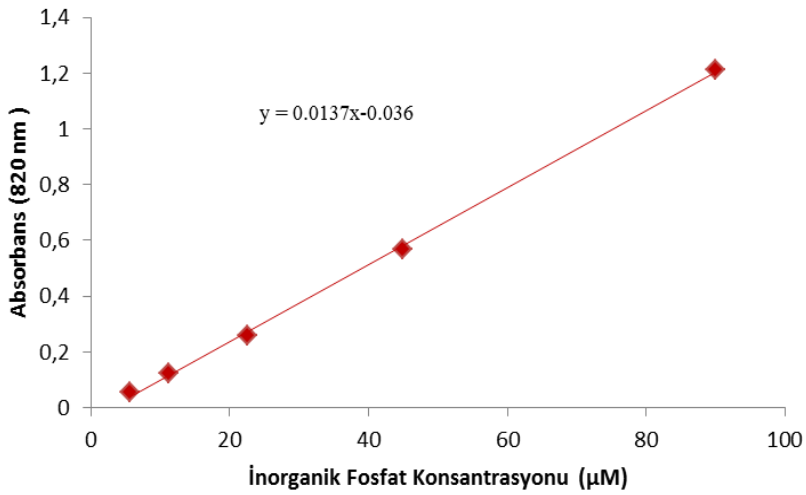
3.4. İnorganik Fosfat Standart Grafiği ve Hazırlanışı

Fitazın sodyum fitatı hidrolizlemesi sonucu açığa çıkan inorganik fosfatı belirlemek için askorbik asit metodu kullanıldı. İnorganik fosforu belirlemek için kullanılan renk reaktifi ise, 3:1:1 oranında sırasıyla 1 M H₂SO₄, % 2.5 amonyum molibdat, % 10 askorbik asit karıştırılarak hazırlandı. Reaktif denemelerden hemen önce hazırlandı. Askorbik asit metoduna göre, inorganik fosfor amonyum molibdat ile reaksiyona girerek, 12-molibdofosforik asidi oluşturur (Kasim ve Edwards, 1998). Oluşan 12-molibdofosforik asit H₂SO₄'in sağladığı asidik koşullarda, askorbik asit ile reaksiyona girerek, molibden mavisi meydana getirir (Lehrfeld ve Morris, 1992). Bu renk 820 nm'de maksimum absorbans verir.

İnorganik fosfor miktarını saptamak için farklı konsantrasyonlarda (5.625, 11.25, 22.5, 45, 90 μM) standart KH₂PO₄ çözeltileri hazırlandı. İnorganik fosfor miktarı, askorbik asit metodu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü (Tablo 3.5). Konsantrasyona karşı absorbans grafiği linear regresyon analiziyle çizilerek konsantrasyonu bilinmeyen örneğin inorganik fosfat konsantrasyonu, standart grafiğinden elde edilen doğru denkleminin formülünden hesaplandı (Şekil 3.1). Doğrunun denklemi $y = 0.0137x - 0.036$, regresyon katsayısı $R^2 = 0.999$ 'dir.

Tablo 3.5. İnorganik fosfor miktarının ölçümü

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

**Şekil 3.1.** İnorganik fosfat standart grafiği

3.5. Protein Tayini

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

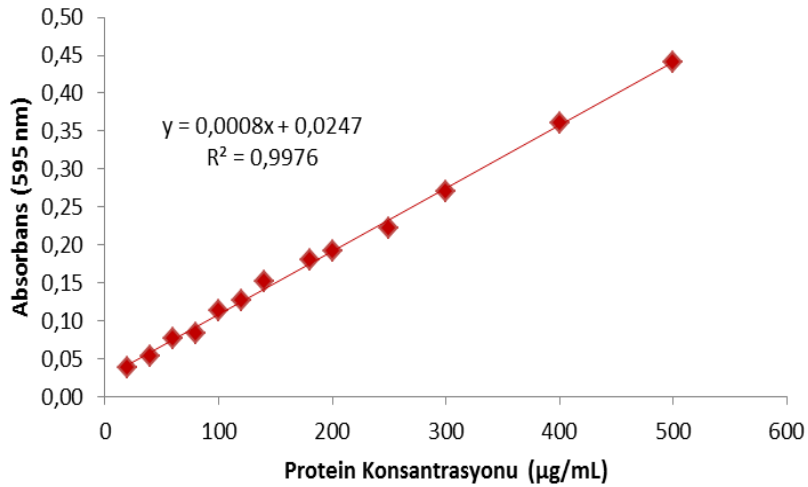
3.5.1. Coomassie Brilliant Blue G250 Çözeltisinin Hazırlanışı

Coomassie Brilliant Blue G250'nin 100 mg'ı 50 mL % 95'lik etil alkolde çözüldü. Hazırlanan çözelti 100 mL % 85'lik ortofosforik asitle karıştırıldı ve hacmi ultrasaf su ile 1 L'ye tamamlandı. Boya çözeltisi daha sonra çözünmeyen boya kalıntılarını uzaklaştırmak için filtre kâğıdından süzüldü.

3.5.2. Protein Standartlarının Hazırlanışı

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

Kültür ortamının ve saflaştırmanın her basamağında protein tayini yapıldı. Örneklerin protein konsantrasyonlarını saptamak için, standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılarak konsantrasyona karşı absorbanş grafiği linear regresyon analiziyle çizilip (Şekil 3.2), bilinmeyen protein konsantrasyonu bu standart grafiğinden elde edilen denklemin formülünden hesaplandı. Doğrunun formülü $y = 0.0008x + 0.0247$, regresyon katsayısı $R^2 = 0.9976$ 'dır



Şekil 3. 2. Protein standart grafiği

3.5.3. Yöntem

Hazırlanan standart çözeltilerden tüplere 100'er µl aktarıldı, köre ise 100 µl ultrasaf su eklendi. Bütün tüplere 5'er mL hazırlanan Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden eklendi ve karıştırıldı. İki dakika sonra standartlar 595 nm dalga boyunda köre karşı okundu ve protein standart grafiği çizildi (Şekil 3.2).

Örneklerin protein tayini denemeler boyunca yukarıdaki yöntem kullanılarak belirlendi, protein miktarları ise protein standart eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak belirlendi.

3.6. Aflatoksin Testi

Fitaz enzimi tarama sonuçlarında yüksek aktiviteye sahip 25 suşun aflatoksin üretilip üretilmediği Czapek Dox Agar, Hg Czapek Dox Agar, Glukoz Yeast Ekstrakt ve AFPA besiyerleri kullanılarak saptandı.

Czapek Dox Agar; 9.08 g Czapek-Dox 200 mL ultrasaf su içerisinde çözünerek hazırlandı.

Hg Czapek Dox Agar; 9.08 g Czapek-Dox agar, 0.0272 g HgCl₂, 2.0 g (NH₄)H₂PO₄ ve 0.1 mL Corn step likor 200 mL ultrasaf su içerisinde çözünerek hazırlandı.

Glukoz Yeast Ekstrakt; 4 g glukoz, 1 g yeast ve 4 g agar 200 mL ultrasaf su içerisinde çözünerek hazırlandı.

AFPA (*Aspergillus flavus-parasiticus* Agar); 9.1 g AFPA 200 mL ultrasaf su içerisinde çözünerek hazırlandı.

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

3.7. Sporulasyon ve Sporulasyon Ortamının Hazırlanışı

Aspergillus niger UA-D'yi üretmek için önce sporulasyon ortamında spor oluşumu sağlandı. Sporulasyon ortamı olarak, malt ekstrakt agar kullanıldı. 250 mL'lik erlene 50 mL % 2.4 olacak şekilde malt ekstrakt agar eklenerek ısı yardımı ile agarın iyice çözünmesi sağlandı, sonra 121 °C'de, 10 dakika otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan sonra yüzey alanını arttırmak amacıyla erlen, 45° eğimle katılaşıma bırakıldı. *A. niger* UA-D'nin stok kültüründen yatık malt agara üç nokta ekimi yapılarak, 30 °C'de etüvde 5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda sporulasyon ortamına % 0.1'lik steril Tween 80 ve cam bilye ilave edilerek sporların misellerden ayrılması ve çözeltiye geçmesi için 5 dakika yavaşça karıştırıldı. Sıvı ortama geçen sporlar ile spor süspansiyonu elde edildi. Uygun inokulum miktarını sağlayabilmek için spor solusyonun 1 mL'si, 9 mL steril fizyolojik tuzlu suya (% 0.9 NaCl) ilave edilerek 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} olacak şekilde seyreltme işlemi yapıldı. Her seyreltmede mililitredeki spor sayısı Thoma lamında sayım yapılarak belirlendi. Seyreltmelerdeki spor sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı.

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

A = 0.1 mm³ hacimde sayılan spor

SF = Seyreltme faktörü

10⁴ = mililitreye çevirme çarpanı

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

3.8. Enzim Üretimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi

İnokulum miktarının enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek için, 100 mL fitaz üretim ortamı (Tablo 3.6) içeren 500 mL'lik erlenlere, uygun seyreltmelerden 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 ve 10^9 spor/mL olacak şekilde inokule edildi.

İnkübatörde (New Brunswick Scientific Excella E24, New Jersey, USA) 30 °C'de, 110 rpm'de, 10 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon boyunca kültür ortamından aseptik koşullar altında her gün örnek alınarak enzim aktivite ölçümleri yapıldı. İnkübasyon sonunda kültür ortamı Buhner hunisinde önceden darası alınan filtre kâğıdı (Munktell, Almanya) kullanılarak vakum altında

süzüldü. Üstte kalan pelletler cam petriye alınarak 80 °C’de, 24 h bekletildi, elde edilen kuru ağırlıkların tartımı yapıldı. Süzüntü enzim kaynağı olarak kullanıldı.

3.9. *Aspergillus niger* UA-D’nin Fitaz Üretim Ortamı

Aspergillus niger UA-D fitaz üretim ortamının içeriği Tablo 3.6’da verildi. Başlangıç pH’sı 5.0 olarak ayarlandı.

Tablo 3.6. *Aspergillus niger* UA-D fitaz üretim ortamının içeriği

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

3.10. *Aspergillus niger* UA-D’nin Fitaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi

3.10.1. Fitaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

A. niger UA-D’nin en iyi fitaz ürettiği sıcaklığı belirlemek için, 500 mL’lik erlene 100 mL farklı sıcaklıklarda pH 5.5 olacak şekilde hazırlanan fitaz üretim ortamı eklendi. Ortama, 10⁸ spor/mL inoküle edildi. Kültür ortamı farklı sıcaklıklarda (20, 30, 40 ve 50 °C), 110 rpm’de, 15 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresince kültür ortamından aseptik koşullar altında her gün örnek alınarak, enzim aktivite ölçümleri yapıldı. İnkübasyon sonunda ise kuru ağırlıkları tayin edildi.

3.10.2. Fitaz Üretimi Üzerine Başlangıç pH’sının Etkisi

A. niger UA-D’nin en iyi fitaz ürettiği başlangıç pH’sını belirlemek için, 500 mL’lik erlene 30 °C’de farklı pH’larda (pH 2.0, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) 100 mL fitaz üretim ortamı eklendi. Daha sonra ortama, 10⁸ spor/mL inoküle edildi. Kültür ortamı inkübatörde 30 °C’de, 110 rpm’de, 12 gün

inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresince kültür ortamından aseptik koşullar altında her gün örnek alınarak enzim aktivite ölçümleri yapıldı. İnkübasyon sonunda kuru ağırlıkları tayin edildi.

3.11. *Aspergillus niger* UA-D'nin Büyüme Eğrisi

Büyüme eğrisi, eğer kesikli bir kültürde, kültür ortamı mikroorganizma ile aşılırsa, enzim aktivitesinin en yüksek olduğu evre büyüme eğrisi ile belirlenebilir. Çoğu durumda enzimler, maksimum seviyeye ulaştıktan sonra hızla kaybolurlar. Büyüme eğrisi kültür koşullarının optimize edilmesinden sonra belirlenen 30 °C ve pH 5.0'de yapıldı.

A. niger UA-D'nin üretimi için, 500 mL'lik erlene (24 adet) 100 mL fitaz üretim ortamı eklenmiştir. Ortama, 10^8 spor/mL inoküle edildi. İnoküle edilmiş kültür ortamı inkübatörde 30 °C'de, 110 rpm, 10 gün inkübasyona bırakıldı. *A. niger* UA-D'nin büyüme eğrisini saptamak için erlenlerden iki tanesi, 24 saatlik periyotlarda darası ölçülmüş filtre kâğıdı (398 nolu Filtrak, Almanya) kullanılarak Buhner hunisinde vakum altında süzüldü. Darası tartılmış filtre kâğıdında kalan miseller distile su ile yıkandı ve 80 °C'deki etüvde 24 saat kurutuldu. Hassas terazide (Scaltec SBA 31, Almanya) ağırlığı tartıldı ve filtre kâğıdının darası çıkarılarak biyokütle (g/100 mL) hesaplandı. Ayrıca kültür ortamı süzüntüsünün günlük pH (Senso Direct pH 200, Almanya), protein tayini ve enzim aktivite ölçümleri yapıldı. En iyi enzim aktivitesi gösteren süzüntü, enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere -20 °C'de derin dondurucuda (Bosch, Almanya) saklandı.

3.12. Fitazın Saflaştırılması

A. niger UA-D tarafından enzim üretimi için optimum sıcaklık, pH ve inkübasyon zamanı belirlendikten sonra saflaştırma işlemlerine geçildi. Optimum koşullarda (pH 5.0 ve 30 °C) enzim üretimi yapılarak belirlenen optimum günde kültür ortamı süzüldü ve süzüntü enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Saflaştırmada ilk adım olarak süzüntüde amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve tuzların giderilmesi için diyaliz işlemi uygulanarak DEAE Sefaroz CL-6B, Fenil Sefaroz CL-4B kolon kromatografisi adımlarına geçildi. Aksi belirtilmedikçe tüm saflaştırma adımları 4 °C'de yapıldı.

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

3.12.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Safılaştırmanın ilk adımlarında daha çok deriştirmeye yönelik teknikler kullanıldı. Enzim safılaştırmada en çok kullanılan tekniklerden biri, yüksek tuz konsantrasyonlarında çöktürmedir. Proteinlerin su içerisindeki çözünürlükleri çok azdır. Ortama bir miktar nötral tuz (NaCl ve (NH₄)₂SO₄ gibi) ilave edildiğinde (düşük iyonik kuvvet) proteinlerin yüzeyinde veya iç kısımlarında bulunan hidrofilik grupların su ile etkileşim derecesi artar, bu durumda proteinlerin çözünürlükleri de artar. Bu olaya **salting in** denir. Protein çözeltisine çok miktarda nötral tuz ilave edildiğinde, proteinlerin genellikle iç kısımlarında yer alan hidrofobik gruplar etrafındaki su molekülleri tuz iyonları tarafından uzaklaştırılır, bu durumda hidrofobik grupların birbirleri ile olan etkileşimleri artar ve proteinler çökerler. Bu olaya ise **salting out** denir. Protein çözeltisinde hidrofobik alanları büyük ve daha fazla olan proteinler, hidrofobik alanları küçük ve daha az olanlarınkine göre daha çabuk birbirleri ile etkileşerek çökerler. Böylece proteinlerin fraksiyonlanması sağlanmış olur (Metin, 2007)

Kültür ortamı süzöldükten sonra elde edilen süzöntü “ham ekstrakt” olarak adlandırıldı ve amonyum sülfat çöktürme denemeleri için kullanıldı. Ham ekstrakta sırasıyla % 0-40, % 40-60, % 60-80, % 80-95 aralıklarında 4 °C’de doymuş amonyum sülfat eklenerek çöktürme işlemleri yapıldı. İlk önce ham ekstrakta % 40 konsantrasyonlarda, amonyum sülfat eklenerek 2 saat manyetik karıştırıcıda yavaş yavaş karıştırılarak inkübe edildi. Süre sonunda çözelti 20.000 x g de 30 dakika santrifüjlendi. Süpernatant ve pelletler birbirinden ayrıldı. Pellet 20 mM asetat (4 °C, pH 4.5) tamponunda çözüldü ve diyaliz işleminden sonra aktivite ve protein tayini yapıldı. Süpernantanta sırasıyla diğer konsantrasyonlarda amonyum sülfat eklenerek işleme devam edildi. Bütün fraksiyonlar için spesifik aktivite, safılaştırma katsayısı ve % verim hesaplandı.

3.12.2. Diyaliz

Diyaliz yöntemi, iyonik olan ve olmayan tüm küçük molekülleri uzaklaştırmak için basit, ucuz ve etkin bir yöntemdir. Genellikle çözeltilerdeki tuzları ve diğer küçük molekülleri ortamdan uzaklaştırmakta kullanılır. Ayrıca biyolojik moleküllere zayıf bir şekilde bağlı olan küçük iyonları ve molekülleri de bu yöntemle ortamdan uzaklaştırmak mümkündür (Özler, 2009).

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen pellet uygun hacimde 20 mM asetat (pH 4.5) tamponunda geri çözüldü. Daha sonra yarı geçirgen bir membrandan oluşan diyaliz torbası (Selüloz membran, Sigma-Aldrich, MWCO-Molecular Weight Cut Off 12.000 Da, 25 mm x 16mm) uygun uzunlukta kesildi ve tek tip gözenek büyüklüğü sağlamak ve ağır metal kontaminantları gidermek için ön işlemden geçirildi (Tablo 3.7). Diyaliz torbasına örnek aktarıldı ve her iki ucu klipsler yardımı ile bağlandı. Daha sonra pelletlerin çözüldüğü aynı tampona karşı 36 saat süreyle tampon 3 defa (toplam 1500 mL) değiştirilerek diyaliz edildi. Diyaliz işlemi manyetik karıştırıcı üzerinde 4°C'de gerçekleştirildi. Diyalizat bir sonraki saflaştırma adımında kullanılmak üzere ayrıldı.

Tablo 3.7. Diyaliz torbasının ön işlemden geçirilmesi

1	% 0,3'lük sodyum sülfid çözeltisinde 80 °C' de 1 dakika bekletilir.
2	Sıcak su (60 °C) ile 2 dakika yıkanır.
3	% 0,2'lik sülfürik asitte 1 dakika bekletilir.
4	Sıcak su (60 °C) ile 2 dakika yıkanır.

3.12.3. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi proteinlerin elektrik yüküne bağlı olarak ayrılmasını sağlayan ve protein saflaştırma işlemlerinde çok sık kullanılan önemli bir tekniktir.

Bu metotta pozitif veya negatif yüke sahip maddelerin elde edilmesi sağlanır. Sabit faz yüzeyinde ya pozitif yada negatif yüklü gruplar bulunur. Eğer pozitif yüklü olanların elde edilmesi isteniyorsa, numune katyon değiştiren kolona uygulanmalıdır. Bu halde nötr ve negatif yüklü olanlar mobil fazda kalırlar ve pozitif yüklü olanlar sabit faza bağlanırlar. Aksine negatif yüklü olanların elde edilmesi gerekiyorsa, bu kez bir anyon değiştiricisi kolona ilave edilir. Böylece nötr ve pozitif olanlar, hareketli fazla kolondan geçip atılırlar. Sabit faza

bağlanmış olan türler, hareketli fazdaki iyon yoğunluğu artırılarak veya pH değiştirilerek kolondan ayrılırlar.

İyon değişim kromatografisinde negatif yüklü proteinlerin saflaştırılmasında kolon dolgu maddesi olarak pozitif yüke sahip DEAE Sefaroz CL-4B (35 mL yatak hacimli, 2.5 x 10 cm, Biorad, USA) kullanıldı. Diyaliz sonrası elde edilen 12 mL diyalizat, 10.000 MWCO ultrafiltrasyon membranı (Vivacell 250 ultrafiltrasyon, Sartorius, Almanya) ile 2.5 mL'ye kadar konsantre edilerek, 20 mM asetat (pH 4.5, 4 °C) tamponu ile dengeye getirilen DEAE Sefaroz CL-6B (2.5 x 10) kolonuna yüklendi. Daha sonra, kolon peristaltik pompa ile (ATTA AC-2110, Japonya) sağlanan 60 mL/saat akış hızında aynı tampon ile yıkanarak bağlanmayan proteinlerin kolondan çıkması sağlandı.

Bağlanmayan proteinler kolondan uzaklaştırıldıktan sonra, 20 mM asetat (pH 4.5, 4 °C) tamponu ile hazırlanan 100 mL 0-1 M NaCl ile linear tuz gradienti uygulanarak kolondaki tuz konsantrasyonu arttırıldı ve kolona bağlı proteinlerin çıkması sağlandı.

Kolondan çıkan örnekler fraksiyon kollektörü ile (Spectra/Chrom CF-1, USA) 3'er mL'lik hacimlerde toplandı. Kolondan proteinlerin çıkışı spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601, Japonya) 280 nm'deki absorbans ölçülerek izlendi. Kolondan çıkan her fraksiyonda enzim aktivitesi ölçüldü. Aktivitesi yüksek olan fraksiyonlar birleştirildi ve bu fraksiyonlar bir sonraki saflaştırma adımında kullanılarak saflaştırma işlemine devam edildi.

3.12.4. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

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

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kolon dolgu maddesi olarak Fenil Sefaroz CL-4B (16 mL yatak hacimli, 1 x 20 cm, Biorad, USA) kullanıldı. Kolon önce 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 20 mM asetat (pH 4.5, 4 °C) tamponu ile yıkanarak kolon kararlı hale (hidrofobik alanların açığa çıkması sağlandı) getirildi. DEAE Sefaroz CL-6B kolonundan elde edilen enzim kaynağına 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eklenerek örnekteki proteinlerin hidrofobik yüzeylerinin açığa çıkması sağlandı. Bu örnek kolona yüklendikten sonra, 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 20 mM asetat (pH 4.5, 4 °C) tamponu ile 60 mL/saat akış hızında kolon yıkandı ve kolona bağlanmayan proteinlerin kolondan uzaklaşması sağlandı. Kolondan çıkan fraksiyonlar 3'er mL'lik hacimlerde toplandı. Kolondan proteinlerin çıkışı spektrofotometrede 280 nm'deki absorbans ölçülerek izlendi. Kolon yıkama işlemine 280 nm'de absorbans düşene kadar devam edildi. Daha sonra kolona 2 M'dan 0 M'a kadar azalan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ters tuz gradienti uygulandı. Gradientin bitiminin hemen ardından, kolona bağlı muhtemel proteinlerin kolondan çıkması için, tuz içermeyen aynı tamponla yıkamaya devam edildi. Kolondan çıkan her fraksiyonda enzim aktivitesi ölçüldü. Aktivitesi yüksek olan fraksiyonlar birleştirildi. Birleştirilen bu fraksiyonlar daha sonra karakterizasyon çalışmaları için kullanıldı.

3.13. *Aspergillus niger* UA-D Fitazının Karakterizasyonu

3.13.1. PAGE ve SDS-PAGE ile Fitazın Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Saflaştırma boyunca elde edilen fraksiyonların saflığının kontrolü ve enzimin moleküler ağırlığı Laemmli yöntemine (1970) göre PAGE (poliakrilamid jel elektroforezi) ve SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) ile yapıldı. Standart olarak miyozin (205.000 Da), β -galaktozidaz (116.000 Da), fosforilaz B (97.400 Da), sığır albumini (66.000 Da), yumurta albumini (45.000 Da) ve karbonik anhidraz (29.000 Da) kullanıldı. SDS-PAGE ve PAGE aşağıda anlatıldığı gibi yapıldı.

3.13.1.1. SDS-PAGE için gerekli çözeltiler

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

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

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

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

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

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

Elektroforez tamponu (Yürütme tamponu): 3.0 g Tris-baz ve 14.4 g glisin ve 1 g SDS karıştırılarak hacmi ultra saf su ile 1 L'ye tamamlanarak pH'sı 8.3'e ayarlandı. PAGE için hazırlanan elektrot tamponunda SDS kullanılmadı. Hazırlanan tampon kullanılıncaya kadar 4 °C'de saklandı. Tampon 2-3 kez kullanıldıktan sonra yenilendi.

Coomassie Blue G-250 Çözeltisi: 0.10 g Coomassie blue, % 50 metanol ve % 10 asetik asit kullanıldı. Boya önce metanol ve su karışımında çözüldü daha sonra asetik asit eklendi.

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

3.13.1.2. Yöntem

Jelin Hazırlanışı: Protein kontaminasyonunu ve her türlü kirliliği önlemek için bütün işlemler eldiven giyilerek yapıldı. Elektroforez camları % 70'lik etanolle iyice temizlendikten sonra jelin sızmasını önlemek için standına yerleştirildi. Cam levhalar arasında sızıntı olup olmadığı kontrol edildikten sonra, hava kabarcığı

kalmayacak şekilde degaze edildi % 8'lik ayırma jeline TEMED ve amonyum persülfat ilave edildikten sonra karıştırıldı. Hazırlanan jeller mini elektroforez (Bio-Rad, Mini-PROTEAN, U.S) camları arasına döküldü. Ayırma jelinin içeriği Tablo 3.8'de verildi.

Jelin havayla temasını kesmek için, üzeri % 70'lik etanolle kapatıldı ve jelin polimerleşmesi için 1 saat beklendi. Süre sonunda ayırma jelinin üzerindeki alkol kurutma kâğıdı ile jele temas etmeden yavaş yavaş alındı ve üzerine % 4'lük yoğunlaştırma jeli döküldü. Tarak, jelle arasında hava kabarcığı kalmamasına ve ayırma jeline değmemesine dikkat edilerek jele yerleştirildi ve polimerleşmesi için 1-2 saat beklendi. Yoğunlaştırma jelinin içeriği Tablo 3.9'da verildi.

Tablo 3.8. % 8'lik ayırma jelinin içeriği

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

Tablo 3.9. % 4'lük yoğunlaştırma jelinin içeriği

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

3.13.1.3. Örneklerin hazırlanışı ve jele uygulanışı

Jele uygulanacak örnekler ve standart, örnek tamponuyla uygun seyreltmeler yapıldıktan sonra kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatıldı (PAGE için örnekler kaynatılmamıştır). Tarak jele zarar vermeden çekildi ve jel elektroforez tamponu ile yıkanarak polimerleşmeyen jel uzaklaştırıldı. Daha sonra kuyucuklar elektroforez tamponu ile dolduruldu ve uygun seyreltmeleri yapılan örneklerden 15 µl yüklendi. Örnekler jele yüklendikten sonra jel tankın içine yerleştirildi ve kuyucukların üzerini örtecek şekilde elektroforez tamponu ekledir. Güç kaynağı (UVP, Almanya) ile üst jele 100 V 20 mA, alt jele 200 V 40 mA elektrik akımı verilerek proteinlerin ayırma işlemi yapıldı.

3.13.1.4. Jelin boyanması

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

SDS-PAGE elektroforez sonucunda elde edilen tek bant ile fitaz enzimi belirlendi. SDS-PAGE jeline boyanın, standartların ve enzimin kat ettikleri mesafeler elektronik kumpas (Mitutoyo, CD-15CP, U.K.) yardımı ile ölçüldü. Standartların ve enzimin Rf değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

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

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

3.13.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi hem ham enzimde hemde saflaştırılmış enzimde, 5-85 °C arasındaki sıcaklıklarda yapıldı. Deneyde kullanılan tamponlar ham enzim için 5.5'e (0.2 M sitrat tamponu) saf enzim ile yapılan deneme için pH 3.0'e ayarlandı (0.2 M glisin-HCl tamponu). 100 mM stok sodyum fitat çözeltisi ham enzim için 0.2 M asetat (37 °C, pH 5.5), saf enzim için 0.2 M glisin-HCl (60 °C, pH 3.0) tamponunda hazırlanmış standart deney ortamına final konsantrasyonu 7.5 mM olacak şekilde konuldu. Saf enzim çözeltisi 0.2 M glisin-HCl (70 °C, pH 3.0) tamponu ile 5 kat seyreltildi. Enzim aktivitesi sadece sıcaklık parametresi değiştirilerek, standart deney koşullarında spektrofotometrik olarak tayin edildi.

3.13.3. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için, saflaştırılmış enzim stabilitenin belirleneceği sıcaklıklar olan 25 °C, 37 °C, 60 °C, 70 °C ve 80 °C'de hazırlanan 0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 3.0) ile 2 kat seyreltildi. 0.2 M glisin-HCl (70 °C, pH 3.0) tamponunda hazırlanan stok sodyum fitat çözeltisi (100 mM), final konsantrasyonu 7.5 mM olacak şekilde standart deney ortamına eklendi. Enzim bu sıcaklıklardaki su banyosunda (Poly science 911, USA) 24 saat boyunca inkübe edildi ve belirli aralıklarda örnekler alınarak standart deney koşullarında spektrofotometrik olarak aktivite tayini yapıldı. Her bir deneme için başlangıçtaki aktivite ölçümü kontrol (100) olarak kabul edildi ve aktivite değişimi kontrol değerine göre % değer olarak belirlendi.

3.13.4. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisinin belirlenmesi hem ham enzimde hem de saflaştırılmış enzimde yapıldı. Standart deney ortamının pH'sı 0.5 birimlik aralıklarla pH 1.5-7.5 aralığında ham enzim için 60 °C de, saf enzim için ise 70 °C de ayarlandı. Tampon çözeltileri olarak pH 1.0-3.0 için 0.2 M glisin-HCl tamponu, pH 3.5-5.5 için 0.2 M sitrat tamponu ve pH 6.0-7.5 için 0.2 M Tris-maleat tamponu kullanıldı. 100 mM stok sodyum fitat çözeltisi ham enzim için 0.2 M

glisin-HCl (60 °C, pH 3.0) tamponunda, saf enzim için ise, 0.2 M glisin-HCl (70 °C, pH 3.0) tamponunda hazırlandı final konsantrasyonu 7.5 mM olacak şekilde standart deney ortamına konuldu. Ham enzim, 0.2 M glisin-HCl (60 °C, pH 3.0) tamponu ile saf enzim ise 0.2 M glisin-HCl (70 °C, pH 3.0) tamponunda, 5 kat seyreltildi. Enzim aktivitesi standart deney koşullarında ölçüldü.

3.13.5. Enzim Stabilitesi Üzerine pH' nın Etkisi

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

3.13.6. Enzim Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisini incelemek için enzim optimum pH (pH 3.0) ve sıcaklıkta (70 °C), sabit substrat konsantrasyonunda (final konsantrasyon 7.5 mM) farklı sürelerde inkübe edilerek spektrofotometrik olarak aktivitesi tayin edildi.

3.13.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi optimum sıcaklık ve pH'da (70 °C, ve pH 3.0), sabit inkübasyon süresinde (30 dk) ve farklı konsantrasyonlarda (100, 111, 125, 143, 167, 200, 250, 333, 500, 1000 µM sodyum fitat) substrat kullanılarak enzim aktivitesinin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle belirlendi. Enzimin K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplandı.

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

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini incelemek için $AlCl_3$, $BaCl_2$, $CaCl_2$, $CoCl_2$, $CuCl_2$, $FeCl_3$, KCl , $LiCl$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, Na_2O_3Se , $NaCl$, NH_4Cl ,

NiCl₂, PbCl₂, ZnCl₂ ve EDTA kullanıldı. Metal iyonları 100 mM stok çözeltilerinden final konsantrasyonu 1 mM, 5 mM ve 10 mM olacak şekilde deney ortamlarına eklendi (Tablo 3.10, 3.11 ve 3.12). Hiçbir metali içermeyen deney ortamı, kontrol olarak kabul edildi. Standart koşullarda aktivite tayini yapıldı. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlendi.

Tablo 3.10. 1 mM metal iyonu içeren deney ortamı

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 3.0, 70 °C)	346 µL	346 µL
Metal İyonları	4 µL	4 µL
Enzim çözeltisi	20 µL	20 µL
70 °C'de 5 dk ön inkübasyon		
% 15 TCA	400 µL	-
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	-	30 µL
70 °C'de 30 dk inkübasyon		
% 15 TCA	-	400 µL
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	30 µL	-
2.000 x g'de 10 dk santrifüj		
0.2 mL süpernatant + 1.8 mL ultrasaf su + 2 mL renk çözeltisi		
50 °C'de 15 dk inkübasyon		
820 nm'de spektrofotometrede absorbens ölçümü		

Tablo 3.11. 5 mM metal iyonu içeren deney ortamı

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 3.0, 70 °C)	330 µL	330 µL
Metal İyonları	20 µL	20 µL
Enzim çözeltisi	20 µL	20 µL
70 °C'de 5 dk ön inkübasyon		
% 15 TCA	400 µL	-
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	-	30 µL
70 °C'de 30 dk inkübasyon		
% 15 TCA	-	400 µL
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	30 µL	-
2.000 x g'de 10 dk santrifüj		
0.2 mL süpernatant + 1.8 mL ultrasaf su + 2 mL renk çözeltisi		
50 °C'de 15 dk inkübasyon		
820 nm'de spektrofotometrede absorbens ölçümü		

Tablo 3.12. 10 mM metal iyonu içeren deney ortamı

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 3.0, 70 °C)	310 µL	310 µL
Metal İyonları	40 µL	40 µL
Enzim çözeltisi	20 µL	20 µL
70 °C'de 5 dk ön inkübasyon		
% 15 TCA	400 µL	-
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	-	30 µL
70 °C'de 30 dk inkübasyon		
% 15 TCA	-	400 µL
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	30 µL	-
2.000 x g'de 10 dk santrifüj		
0.2 mL süpernatant + 1.8 mL ultrasaf su + 2 mL renk çözeltisi		
50 °C'de 15 dk inkübasyon		
820 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümü		

3.13.9. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin ve Denatürantların Etkisi

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

PMSF n-propanolda, DTNB ise 0.1 M NaOH'de çözüldü.

İnhibitörler 100 mM'lık stok çözeltilerinden, deney ortamına final konsantrasyonu 1 ve 5 mM olacak şekilde eklendi ve standart koşullarda aktiviteleri tayin edildi (Tablo 3.13 ve 3.14). Hiçbir inhibitör veya denatürant içermeyen deney ortamı

kontrol olarak kabul edildi. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlendi.

Tablo 3.13.1 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı.

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 3.0, 70 °C)	342 µL	342 µL
İnhibe edici ajan (100 mM)	8 µL	8 µL
Enzim çözeltisi	20 µL	20 µL
70 °C'de 5 dk ön inkübasyon		
% 15 TCA	400 µL	-
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	-	30 µL
70 °C'de 30 dk inkübasyon		
% 15 TCA	-	400 µL
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	30 µL	-
2.000 x g'de 10 dk santrifüj		
0.2 mL süpernatant + 1.8 mL ultrasaf su + 2 mL renk çözeltisi		
50 °C'de 15 dk inkübasyon		
820 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümü		

Tablo 3.14. 5 mM inhibitör ve denatürant içeren deney ortamı.

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 3.0, 70 °C)	310 µL	310 µL
İnhibe edici ajan (100 mM)	40 µL	40 µL
Enzim çözeltisi	20 µL	20 µL
70 °C'de 5 dk ön inkübasyon		
% 15 TCA	400 µL	-
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	-	30 µL
70 °C'de 30 dk inkübasyon		
% 15 TCA	-	400 µL
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	30 µL	-
2.000 x g'de 10 dk santrifüj		
0.2 mL süpernatant + 1.8 mL ultrasaf su + 2 mL renk çözeltisi		
50 °C'de 15 dk inkübasyon		
820 nm'de spektrofotometrede absorbans ölçümü		

3.13.10. Enzim Aktivitesi Üzerine İnorganik Fosfatın Etkisi

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

3.13.11. Enzimin Sıcaklık Stabilitesi Üzerine Polihidrik Alkollerin Etkisi

Enzimin sıcaklık stabilitesini artırmak amacıyla çeşitli polihidrik alkollerin (etilen glikol, gliserol, sorbitol) etkisi incelendi. Polihidrik alkoller, 70 °C'de, pH'sı 3.0 olan 0.2 M glisin-HCl tamponu içerisinde 1 M, 2 M ve 3 M konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. Saflaştırılmış enzim bu çözeltilerle 3 kat seyreltilerek, 70 °C'deki su banyosunda, 2 saat inkübe edildi. Polihidrik alkol içermeyen enzim de kontrol olarak kabul edilerek, aynı koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda enzim aktiviteleri standart deney koşullarında tayin edildi. Her bir deneme için başlangıçtaki aktivite ölçümü kontrol (100) olarak kabul edildi ve 2 saat sonunda geri kalan aktiviteleri % değer olarak belirlendi.

3.13.12. Enzim Stabilitesi Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi

Enzim stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisini belirlemek için 1,4-dioksan, aseton, asetonitril, benzen, bütanol, dietileter, dimetilsülfoksit (DMSO), etanol, etilasetat, gliserol, hekzan, isopropanol, metanol, siklohekzan ve toluen kullanılmıştır. Organik çözücüler final konsantrasyonları % 0.5 ve % 1 olacak şekilde saflaştırılmış enzimle karıştırıldı ve 25 °C'deki inkübatörde 150 rpm hızda çalkalamalı olarak 1 saat inkübe edildi (Tablo 3.15 ve 3.16). Hiçbir organik çözücü içermeyen enzim de kontrol olarak kabul edilerek ve aynı koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 370 µl karışımın üzerine 30 µl substrat eklenerek reaksiyon başlatıldı. Kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlendi.

Tablo 3.15. % 0.5 organik çözücü içeren deney ortamı

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 3.0, 70 °C)	348 µL	348 µL
Organik çözücü	2 µL	2 µL
Enzim çözeltisi	20 µL	20 µL
70 °C'de 5 dk ön inkübasyon		
% 15 TCA	400 µL	-
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	-	30 µL
70 °C'de 30 dk inkübasyon		
% 15 TCA	-	400 µL
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	30 µL	-
2.000 x g'de 10 dk santrifüj		
0.2 mL süpernatant + 1.8 mL ultrasaf su + 2 mL renk çözeltisi		
50 °C'de 15 dk inkübasyon		
820 nm'de spektrofotometrede absorban ölçümü		

Tablo 3.16. % 1 organik çözücü içeren deney ortamı

Reaksiyon bileşenleri	Kör	Örnek
0.2 M glisin-HCl tamponu (pH 3.0, 70 °C)	346 µL	346 µL
Organik çözücü	4 µL	4 µL
Enzim çözeltisi	20 µL	20 µL
70 °C'de 5 dk ön inkübasyon		
% 15 TCA	400 µL	-
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	-	30 µL
70 °C'de 30 dk inkübasyon		
% 15 TCA	-	400 µL
20 mM Sodyum fitat (0.2 M glisin-HCl tampon)	30 µL	-
2.000 x g'de 10 dk santrifüj		
0.2 mL süpernatant + 1.8 mL ultrasaf su + 2 mL renk çözeltisi		
50 °C'de 15 dk inkübasyon		
820 nm'de spektrofotometrede absorban ölçümü		

3.13.13. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi

Enzimin substrat spesifitesini belirlemek amacıyla pH'sı 3.0 olan 0.2 M glisin-HCl tamponunda hazırlanan 20 mM 4-nitrofenil-fosfat, 5-brom-4-klor-3-indol fosfat, D-fruktoz-1,6-bisfosfat, D-fruktoz-6-fosfat, D-glukoz-1-fosfat, D-glukoz-6-fosfat, α -gliserofosfat, β -gliserofosfat, α -naftil fosfat, β -naftil fosfatın çözeltileri substrat olarak kullanıldı. Enzim aktivitesi standart deney koşulları altında ölçüldü. Sodyum fitat için ölçülen değer kontrol olarak (100) kabul edildi ve aktivite değişimleri % değer olarak hesaplandı.

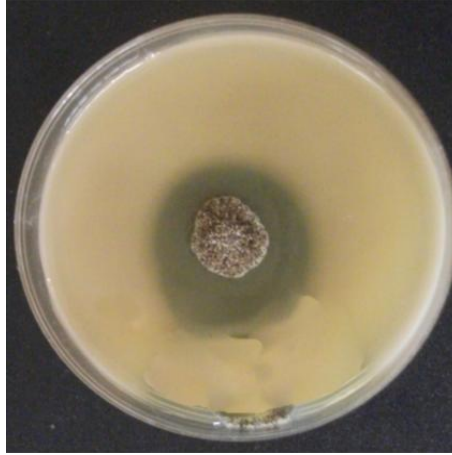
3.13.14. Verilerin Değerlendirilmesi

Protein derişimi, glukoz standardı, V_{max} ve K_m değerleri lineer regrasyon analizi ile saptandı (SPSS 15.0). Her deney üç tekrar üzerinden yapıldı. Gruplar arasındaki farkın ve bu farkın hangi gruptan kaynaklandığının belirlenmesi için tek yönlü varyans analizi (Tukey ve Duncan Testi) yapıldı (SPSS 15.0). Kontrol grubu ile deney grubu arasındaki farkın belirlenmesinde eşlenmiş örneklerde t-testi uygulandı (SPSS 15.0).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Fitaz Enzimi Üretimi İçin Fungusların Taranması, Aflatoksin Testi ve Seçimi

Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji laboratuvarı stok kültürlerinde kayıtlı havadan ve topraktan izole edildikten sonra tanısı yapılmış 165 fungus fitaz aktivitesi açısından tarandı. Tarama işlemi, oldukça hızlı ve basit olan PSM ortamı içeren plaklarda yapıldı. Asidik ortamda oluşan fitat kompleksinin hidrolizi sonucu oluşan şeffaf zon pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 4.1). Fungusların fitaz aktivitesi tarama sonuçları Tablo 4.1’de sunuldu.



Şekil 4. 1. *A. niger* UA-D fitaz taraması pozitif sonucu

Tablo 4. 1. Fungusların kalitatif fitaz aktivitesi tarama sonuçları

Suş Kodu	Fungus İsmi	Fungus Çapı	Zon Çapı	MÇ/ZÇ Oranı
MA01-G	<i>Absidia sp.</i>	-	-	-
UD-E	<i>Absidia sp.</i>	8.91	15.52	1.74
HBF 57	<i>Acremonium kiliense</i>	-	-	-
HBF 8	<i>Acremonium sp.</i>	16.58	22.45	1.35
İSA-F	<i>Acremonium sp.</i>	21.00	32.41	1.54
MA02-G	<i>Acremonium sp.</i>	8.75	15.21	1.74
İZÇ01-A	<i>Acremonium sp.</i>	7.23	15.72	2.17
MA04-D	<i>Acremonium sp.</i>	5.51	18.53	3.36
İZÇ02-F	<i>Alternaria sp.</i>	7.67	11.05	1.44
İZTO1-L	<i>Aspergillus candidus</i>	24.80	34.44	1.39
MA04-E	<i>Aspergillus candidus</i>	7.43	15.09	2.03
HBF 53	<i>Aspergillus flavipes</i>	6.72	10.72	1.60
İZTO1-F	<i>Aspergillus flavipes</i>	15.80	26.29	1.66
Kasım 8	<i>Aspergillus flavus</i>	22.95	31.79	1.38
HBF 33	<i>Aspergillus flavus</i>	11.67	34.74	2.98
Eylül 1	<i>Aspergillus flavus</i>	14.58	17.32	1.19
Ağustos 8	<i>Aspergillus flavus</i>	10.00	13.00	1.30
Şubat 16	<i>Aspergillus flavus</i>	15.23	25.26	1.66
Kasım 9	<i>Aspergillus flavus</i>	4.24	7.91	1.86
Haziran 5	<i>Aspergillus flavus</i>	5.52	10.91	1.98
Kasım 10	<i>Aspergillus flavus</i>	12.86	38.73	3.01
HBF 54	<i>Aspergillus foetidus</i>	15.90	44.94	2.83

Tablo 4. 2. Fungusların kalitatif fitaz aktivitesi tarama sonuçları (Devamı)

Eylül 5	<i>Aspergillus fumigatus</i>	12.38	20.66	1.67
Temmuz 3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	26.05	31.27	1.20
Ocak 17	<i>Aspergillus fumigatus</i>	29.19	35.46	1.22
Eylül 6	<i>Aspergillus fumigatus</i>	22.74	30.34	1.33
Mart 7	<i>Aspergillus fumigatus</i>	14.22	19.61	1.38
Aralık 5	<i>Aspergillus fumigatus</i>	11.90	16.57	1.39
MA01-J	<i>Aspergillus fumigatus</i>	13.36	19.19	1.44
İZTO1-H	<i>Aspergillus fumigatus</i>	4.20	6.12	1.46
UA-G	<i>Aspergillus fumigatus</i>	15.35	22.86	1.49
UD-M	<i>Aspergillus fumigatus</i>	11.64	17.37	1.49
Ocak 2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	19.73	29.37	1.50
HBF 42	<i>Aspergillus fumigatus</i>	12.39	20.80	1.68
İZTO1-J	<i>Aspergillus fumigatus</i>	10.84	21.86	2.02
Aralık 9	<i>Aspergillus fumigatus</i>	11.23	23.22	2.07
Aralık 2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	11.11	30.32	2.73
HBF 47	<i>Aspergillus glaber</i>	7.98	17.33	2.17
HBF 97	<i>Aspergillus japonicus</i>	18.85	50.92	2.70
Ocak 4	<i>Aspergillus japonicus</i>	5.20	15.22	2.93
Kasım 14	<i>Aspergillus niger</i>	18.58	39.03	2.10
Mart 9	<i>Aspergillus niger</i>	13.33	28.30	2.12
İZTO3-L	<i>Aspergillus niger</i>	13.34	29.44	2.21
İZTO1-XA	<i>Aspergillus niger</i>	16.79	38.53	2.29
Şubat 17	<i>Aspergillus niger</i>	21.77	50.11	2.36

Tablo 4. 3. Fungusların kalitatif fitaz aktivitesi tarama sonuçları (Devamı)

HBF 39	<i>Aspergillus niger</i>	14.33	34.91	2.44
MA03-L	<i>Aspergillus niger</i>	14.03	34.74	2.48
Haziran 16	<i>Aspergillus niger</i>	13.29	33.30	2.51
UA-O	<i>Aspergillus niger</i>	15.61	39.13	2.51
Temmuz 1	<i>Aspergillus niger</i>	13.21	35.35	2.68
Mart 4	<i>Aspergillus niger</i>	13.50	37.72	2.79
Haziran 10	<i>Aspergillus niger</i>	12.24	34.44	2.81
İSAKY-F	<i>Aspergillus niger</i>	14.80	42.85	2.90
Mart 6	<i>Aspergillus niger</i>	10.47	31.10	2.97
Eylül 7	<i>Aspergillus niger</i>	13.73	41.03	2.99
MA04-F	<i>Aspergillus niger</i>	14.24	43.43	3.05
Mayıs 7	<i>Aspergillus niger</i>	10.97	34.41	3.14
UA-A	<i>Aspergillus niger</i>	15.12	47.63	3.15
Aralık 7	<i>Aspergillus niger</i>	12.58	40.37	3.21
İZÇ01-E	<i>Aspergillus niger</i>	12.07	39.13	3.24
Nisan 4	<i>Aspergillus niger</i>	13.39	43.66	3.26
UA-D	<i>Aspergillus niger</i>	11.04	36.40	3.29
UD-B	<i>Aspergillus niger</i>	11.43	38.77	3.39
Mart 2	<i>Aspergillus niger</i>	11.26	38.73	3.44
Şubat 15	<i>Aspergillus niger</i>	11.80	41.75	3.54
Nisan 9	<i>Aspergillus niger</i>	10.96	41.03	3.74
İZTO2-L	<i>Aspergillus niger</i>	4.06	21.42	5.27
İZTO2-C	<i>Aspergillus niger</i>	21.15	43.74	2.06

Tablo 4. 4. Fungusların kalitatif fitaz aktivitesi tarama sonuçları (Devamı)

Ekim 10	<i>Aspergillus niveus</i>	4.14	7.89	1.91
HBF 99	<i>Aspergillus niveus</i>	5.95	14.48	2.43
MA04-C	<i>Aspergillus sclerotirum</i>	7.54	16.90	2.24
İSAKY-İ	<i>Aspergillus sclerotirum</i>	-	-	-
Ağustos 9	<i>Aspergillus sclerotirum</i>	-	-	-
HBF 44	<i>Aspergillus sclerotirum</i>	7.12	11.19	1.57
İSA-E	<i>Aspergillus sclerotirum</i>	10.74	17.54	1.63
İZTO3-A	<i>Aspergillus sclerotirum</i>	13.44	24.67	1.84
Mayıs 12	<i>Aspergillus sp.</i>	7.06	18.00	2.55
Mayıs 6	<i>Aspergillus sp.</i>	-	-	-
Haziran 6	<i>Aspergillus sp.</i>	-	-	-
Haziran 11	<i>Aspergillus sp.</i>	-	-	-
Ekim 12	<i>Aspergillus sp.</i>	-	-	-
İZTO3-C	<i>Aspergillus sp.</i>	17.74	26.14	1.47
Mart 8	<i>Aspergillus sp.</i>	12.41	39.28	3.16
İZÇ03-İ	<i>Aspergillus sp.</i>	11.21	46.48	4.15
Ağustos 11	<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-
Eylül 8	<i>Aspergillus terreus</i>	13.74	15.43	1.12
Eylül 4	<i>Aspergillus terreus</i>	17.73	21.01	1.18
Eylül 3	<i>Aspergillus terreus</i>	12.45	15.07	1.21
Ağustos 12	<i>Aspergillus terreus</i>	8.08	11.28	1.40
MA02-C	<i>Aspergillus terreus</i>	11.29	16.33	1.45
İZTO1-U	<i>Aspergillus terreus</i>	15.92	31.25	1.96
İZÇ02-H	<i>Aspergillus terreus</i>	10.37	20.98	2.02

Tablo 4. 5. Fungusların kalitatif fitaz aktivitesi tarama sonuçları (Devamı)

Aralık 16	<i>Aspergillus versicolor</i>	-	-	-
Aralık 10	<i>Aspergillus versicolor</i>	-	-	-
Aralık 18	<i>Aspergillus versicolor</i>	-	-	-
İZÇ02-N	<i>Aspergillus versicolor</i>	-	-	-
Mayıs 3	<i>Aspergillus versicolor</i>	-	-	-
UD-D	<i>Aspergillus versicolor</i>	16.40	20.05	1.22
HBF 43	<i>Aspergillus versicolor</i>	21.78	27.48	1.26
Ekim 3	<i>Aspergillus wentii</i>	10.15	19.41	1.91
Şubat 4	<i>Aspergillus wentii</i>	-	-	-
Mayıs 5	<i>Aspergillus wentii</i>	-	-	-
İSA-P	<i>Aspergillus wentii</i>	11.92	17.93	1.50
HBF 103	<i>Aspergillus wentii</i>	-	-	-
MA01-E	<i>Chaetomium sp.</i>	12.28	23.61	1.92
İZTO1-Z	<i>Cladosporium herbarium</i>	12.47	22.22	1.78
HBF 64	<i>Colletotrichum sp.</i>	2.25	7.04	3.13
İZTO2-J	<i>Emericella quadrilineata</i>	12.79	15.65	1.22
İSAKY-P	<i>Fusarium solani</i>	-	-	-
İZÇ03-E	<i>Fusarium sp.</i>	-	-	-
Ekim 11	<i>Fusarium sp.</i>	18.84	25.63	1.36
Mayıs 1	<i>Fusarium sp.</i>	5.31	11.15	2.10
İZTO2-P	<i>Mortierella sp.</i>	9.97	22.43	2.25
İZÇ02-M	<i>Mortierella sp.</i>	-	-	-
MA02-A	<i>Mortierella sp.</i>	-	-	-
İZÇ03-D	<i>Mucor circinelloides</i>	-	-	-

Tablo 4. 6. Fungusların kalitatif fitaz aktivitesi tarama sonuçları (Devamı)

HBF 75	<i>Mucor hiemalis</i>	-	-	-
Kasım 13	<i>Mucor mucedo</i>	-	-	-
İSA-C	<i>Mucor mucedo</i>	15.17	20.12	1.33
İZÇ01-M	<i>Mucor racemosus</i>	-	-	-
HBF 79	<i>Paecilomyces sp.</i>	10.13	12.93	1.28
HBF 20	<i>Penicillium chrysogenum</i>	10.83	20.04	1.85
İZÇ03-H	<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	-
İSAKY-J	<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	-
Temmuz 7	<i>Penicillium chrysogenum</i>	6.04	17.92	2.97
Temmuz 12	<i>Penicillium chrysogenum</i>	5.84	22.17	3.80
İZÇ02-İ	<i>Penicillium citrinum</i>	9.86	13.70	1.39
İZÇ02-E	<i>Penicillium citrinum</i>	5.47	8.32	1.52
Ocak 10	<i>Penicillium citrinum</i>	9.31	18.96	2.04
HBF 14	<i>Penicillium citrinum</i>	3.96	9.84	2.48
HBF 16	<i>Penicillium citrinum</i>	4.42	11.62	2.63
Mart 5	<i>Penicillium citrinum</i>	4.36	12.87	2.95
UD-C	<i>Penicillium decumbens</i>	28.26	37.75	1.33
HBF 11	<i>Penicillium decumbens</i>	13.34	20.47	1.53
İZTO3-F	<i>Penicillium decumbens</i>	8.51	20.26	2.38
HBF 18	<i>Penicillium expansum</i>	8.33	25.12	3.02
HBF 7	<i>Penicillium fellutanum</i>	19.01	32.12	1.69
HBF 17	<i>Penicillium janthinellum</i>	4.67	18.94	4.06
HBF 4	<i>Penicillium miczynskii</i>	5.26	20.69	3.93
MA03-J	<i>Penicillium rugulosum</i>	21.57	26.13	1.21

Tablo 4. 7. Fungusların kalitatif fitaz aktivitesi tarama sonuçları (Devamı)

Aralık 17	<i>Penicillium sp.</i>	-	-	-
İZÇ01-B	<i>Penicillium sp.</i>	-	-	-
Şubat 13	<i>Penicillium sp.</i>	19.54	28.00	1.43
Kasım 7	<i>Penicillium sp.</i>	5.14	8.07	1.57
Ekim 6	<i>Penicillium sp.</i>	7.18	11.97	1.67
Şubat 9	<i>Penicillium sp.</i>	5.61	10.02	1.79
Mayıs 10	<i>Penicillium sp.</i>	6.76	12.40	1.83
Şubat 7	<i>Penicillium sp.</i>	5.66	10.53	1.86
İSAKY-B	<i>Penicillium sp.</i>	5.96	22.44	3.76
Şubat 5	<i>Penicillium sp.</i>	2.94	12.09	4.11
Ekim 15	<i>Penicillium sp.</i>	5.76	23.81	4.14
HBF 27	<i>Penicillium sp.</i>	8.24	22.69	2.75
HBF 2	<i>Penicillium variable</i>	4.11	14.00	3.41
HBF 3	<i>Penicillium waksmani</i>	6.26	15.71	2.51
Nisan 8	<i>Penicillium citrinum</i>	12.27	19.58	1.60
HBF 80	<i>Phoma sp.</i>	-	-	-
HBF 87	<i>Rhizoctonia solanii</i>	-	-	-
İSA-L	<i>Rhizopus sp.</i>	-	-	-
MA04-B	<i>Rhizopus sp.</i>	-	-	-
İZTO2-O	<i>Rhizopus sp.</i>	-	-	-
İZTO1-V	<i>Rhizopus sp.</i>	-	-	-
İZTO1-D	<i>Rhizopus sp.</i>	10.46	19.35	1.85
UA-F	<i>Rhizopus sp.</i>	12.43	21.03	1.69
HBF 71	<i>Rhizopus stolonifer</i>	-	-	-
MA01-A	<i>Rhizopus stolonifer</i>	-	-	-

Tablo 4.1’de özetlenen sonuçlar taranan 165 adet fungusun % 77.6’sına tekabül eden 128 adet fungusun ekstraselüler fitaz enzimi ürettiğini göstermektedir. Chen (1998) tarafından ekstraselüler enzim üreten mikroorganizmaların tarama çalışmaları yapılmış ve toprak izolatlarının % 71’inin fitaz enzimi üretmesi çalışmamızda elde edilen sonucu desteklemiştir. Çalışmamızda tarama yapılan tür sayıları farklı olsa da, en çok ve en iyi fitaz aktivitesi gösteren cins *Aspergillus* olarak bulunmuştur. Birçok fungus türünde yapılan fitaz taraması sonuçları elde edilen verilerimizi desteklemektedir. Shieh ve Ware (1968) 68’i topraktan izole edilmiş 2000’nin üzerindeki mikroorganizmayı fitaz enzimi üretme kapasitesi açısından taramışlardır. Sadece 30 izolatta ekstraselüler fitaz enzimi üretimi saptamışlardır. Bu 30 suşun 28’inin ise *Aspergillus* cinsine ait olduğu, en aktif fitaz enzimine sahip olan grubun ise, *A. niger* olduğunu bildirmişlerdir. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* ve *Rhizopus* türüne ait 203 adet fungusun fitaz aktivitesi taraması sonucunda % 91.6’sının etrafında zon oluşumunun gözleendiği, en geniş zon çapına sahip 6 suştan ikisinin ise *Aspergillus* türüne ait olduğu bildirilmiştir. En aktif suş *Aspergillus* sp. 307 olarak belirlenmiş ve çalışmaya bu suş ile devam edilmiştir (Gargova vd., 1997).

Çalışmamızda en iyi zon çapı (5.27) gösteren fungus *A. niger* İZTO2-L suşu olmasına rağmen, sıvı kültür ortamına inkübe edilen suşun, enzim üretmediği görüldü. Bunun birinci nedeni, *A. niger* İZTO2-L suşunun plaklarda yapılan tarama ortamına organik asit salgılayarak, agar ortamında enzime ait olmayan zon oluşturmasıdır. Bu durum *A. niger* İZTO2-L suşunu pozitif sonuç olarak değerlendirmemize neden olmuş olabilir. İkinci neden olarak, plakta oluşan zonun enzime ait olduğu ancak sıvı kültürde enzim aktivitesinin saptanmamış olması, kültür ortamına salınan pigmentin enzimi inhibe ettiği veya kültür ortamına salınan pigmentin enzim üretimini engellediği ileri sürülebilir.

A. niger İZTO2-L suşu tarafından pigment üretimini engelleyebilmek için farklı inokülasyon miktarları denendi hatta kültür ortamının pH’sı değiştirildi. Fakat pigment üretiminin önüne geçilemedi. Bunun yanında organik asit üreten fungusların etrafında da zon oluşumu meydana gelmekte, dolayısıyla organik asit üreten funguslarda enzim aktivitesi taraması pozitif sonuçlanmaktadır (Mukesh vd., 2004). Literatürde organik asit varlığından dolayı enzim sentezlenmiş gibi pozitif veren suşların seçimi için çeşitli boyama teknikleri geliştirilmiş olsa da, bu sorunun şimdilik tam olarak çözülemediği görülmektedir. Bu amaçla zon çapı ile

mikroorganizma çapının birbirine oranı 3 ve üzerinde olan en iyi aktivite gösteren ilk 25 suşun (Kasım 10, MA04-F, UA-A, İZÇ01-E, UA-D, UD-B, Şubat 15, Mart 2, Nisan 4, Nisan 9, Mayıs 7, Aralık 7, ISAKY-B, HBF 2, HBF 18, HBF 64, MA04-D, Temmuz 12, HBF 4, Mart 8, İZÇ03-İ, Şubat 5, Ekim 15, HBF 17, İZTO2-L) Tablo 3.6’da verilen 100 mL fermentasyon ortamı içeren 500 mL’lik erlenlerde seyreltmelerden spor sayısı 10^6 spor/mL olacak şekilde inoküle edilerek 30 °C’de 110 rpm’de 10 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda fitaz aktivitesi ayrıntıları “Materyal ve Metod” da belirtilen Tablo 3.2’deki aktivite tayin yöntemine göre kantitatif olarak belirlendi (Tablo 4.2) ve aflatoksin üretip üretmedikleri kontrol edildi. Tablo 4.2’de görüldüğü gibi aflatoksin testi yapılan bütün funguslar negatif sonuç verdi.

Tablo 4.2 ve Şekil 4.3’de görüldüğü gibi, *A. niger* UA-D fungusu en iyi aktiviteyi gösterdi. Bu nedenle, *A. niger* UA-D fungusu ile fitaz üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmalarına devam edildi. *A.niger* UA-D’nin malt ekstrakt agardaki görüntüsü Şekil 4.2’de gösterildi. Fitaz aktivitesi gösteren diğer türler, daha sonraki çalışmalar için bir kaynak oluşturmak üzere kültür koleksiyonuna kaydedildi.



Şekil 4. 2. *A. niger* UA-D’in malt ekstrakt agardaki görüntüsü

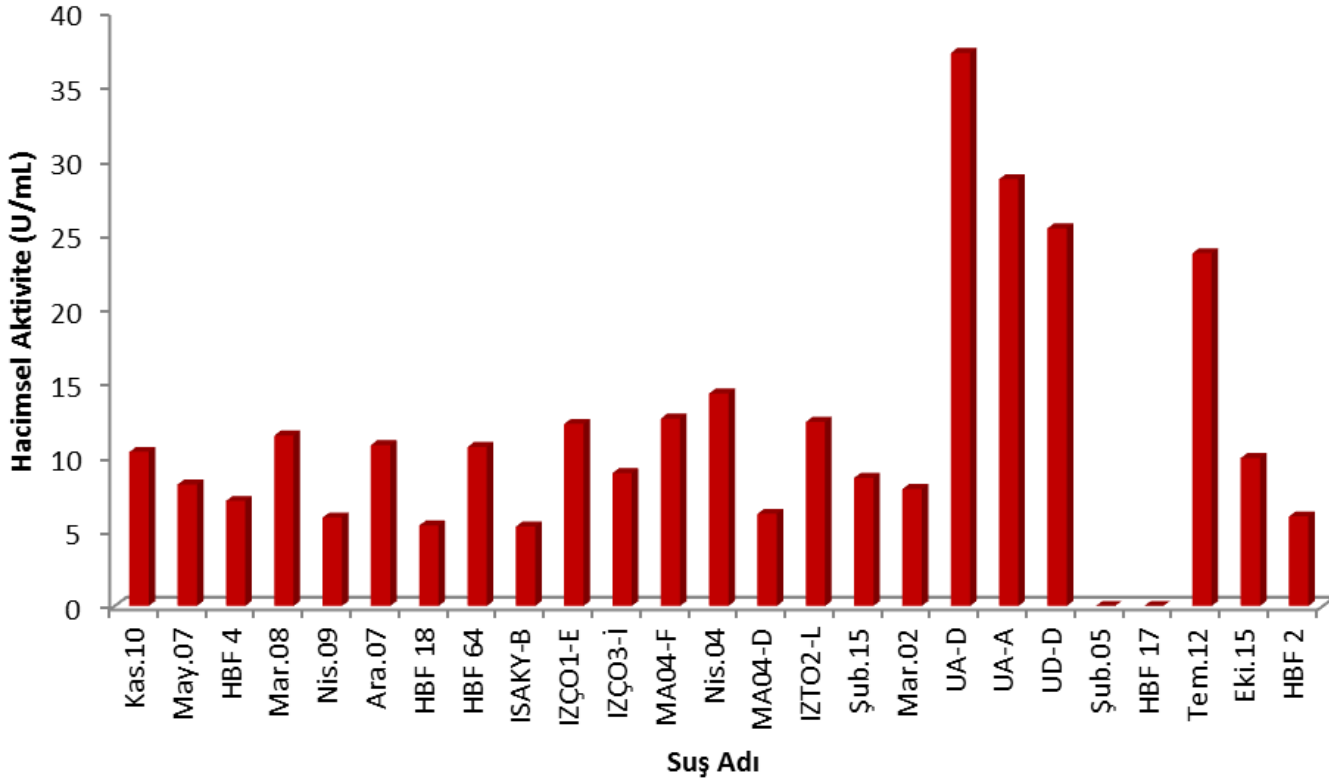
Tablo 4. 8. Kantitatif fitaz aktivite tayini

Suş Adı	Fitaz Aktivitesi (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	Aflatoksin Testi
Kasım 10	10.37 \pm 0.21	b	Negatif
Mayıs 7	8.18 \pm 0.10	b	Negatif
HBF 4	7.07 \pm 0.24	b	Negatif
Mart 8	11.48 \pm 1.71	b	Negatif
Nisan 9	5.96 \pm 1.09	b	Negatif
Aralık 7	10.84 \pm 0.72	b	Negatif
HBF 18	5.42 \pm 0.44	b	Negatif
HBF 64	10.71 \pm 0.1	b	Negatif
ISAKY-B	5.35 \pm 0.17	b	Negatif
IZÇO1-E	12.26 \pm 0.49	b	Negatif
IZÇO3-İ	8.95 \pm 0.85	b	Negatif
MA04-F	12.62 \pm 0.54	b	Negatif
Nisan 4	14.31 \pm 13.40	b	Negatif
MA04-D	6.20 \pm 0.72	b	Negatif
IZTO2-L	12.39 \pm 0.66	b	Negatif
şubat 15	8.63 \pm 0.73	b	Negatif
Mart 2	7.88 \pm 0.51	b	Negatif
UA-D	37.24 \pm 1.15	a	Negatif
UA-A	28.74 \pm 0.63	b	Negatif
UD-D	25.43 \pm 0.46	b	Negatif
şubat 5	0.00 \pm 0.00	b	Negatif
HBF 17	0.00 \pm 0.00	b	Negatif
Temmuz 12	23.75 \pm 0.85	b	Negatif
Ekim 15	9.96 \pm 0.22	b	Negatif
HBF 2	6.03 \pm 0.17	b	Negatif

ORT. : Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H. : Standart hata

x: UA-D'den farklı harf taşıyan ortalamalar istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$)



Şekil 4. 3. Kantitatif fitaz aktivite tayini ile en iyi fitaz aktivitesine sahip suşun seçim

4.2. Enzim Üretimi Üzerine İnokulum Miktarının Etkisi

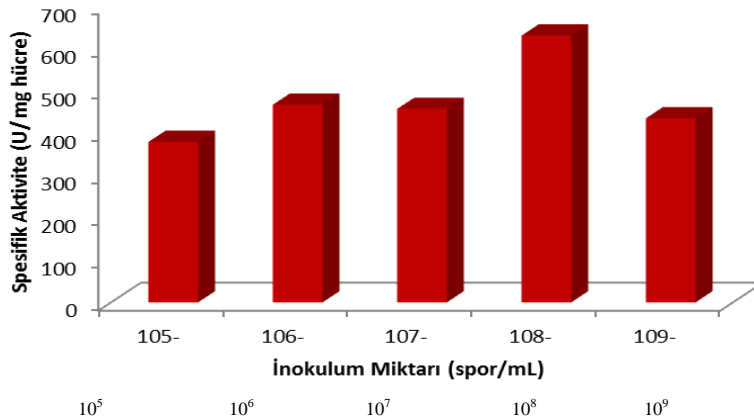
İnokulum miktarının enzim üretimi üzerine etkisini belirlemek için, 100 mL fitaz üretim ortamı içeren 500 mL'lik erlenlere, uygun seyreltmelerden 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 ve 10^9 spor/mL olacak şekilde inokule edildi. İnkübasyon sonunda kültürlerin kuru ağırlıkları, ortamın pH'sı ve fitaz aktiviteleri tayin edildi, sonuçlar Tablo 4.3'da sunuldu. *A. niger* UA-D fungusunda fitaz üretimi için en uygun inokulasyon miktarının en yüksek spesifik aktiviteye sahip olmasından dolayı 10^8 spor/mL olarak belirlendi (Şekil 4.4).

Tablo 4. 9. Enzim üretimi üzerine inokulum miktarının etkisi

İnokulum Miktarı (spor/mL)	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT.±S.H.)	x	Kuru Ağırlık (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg hücre) (ORT.±S.H.)	x	pH
10^5	154.75 ± 6.33	a	0.4073	379.91 ± 6.33	a	4.18
10^6	181.32 ± 2.16	b	0.3874	468.04 ± 2.16	b	4.15
10^7	172.75 ± 4.38	b	0.3764	458.09 ± 4.38	b	4.26
10^8	183.48 ± 2.96	b	0.2905	631.60 ± 2.96	c	4.29
10^9	129.47 ± 6.29	c	0.2971	435.78 ± 6.29	b	4.73

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

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



Şekil 4. 4. Enzim üretimi üzerine inokulum miktarının etkisi

Kültür ortamındaki biyokütle ifade edilen enzim miktarında oldukça etkili olduğu için batık fermentasyonlarda metabolitlerin üretiminde inokulasyon miktarı önemli rol oynamaktadır (Mittal vd., 2012; Sunitha vd., 2000).

A. niger UA-D suşunun en iyi hücre gelişimi inokulasyon miktarının 10^5 spor/mL olduğu koşullarda olmasına rağmen, 379.91 U/mg hücre ile en düşük enzim üretimi elde edildi. Fitaz üretimindeki azalma, gelişmiş biyokütle üretimi sonucu besinlerin tükenmesi nedeniyle, metabolik aktivitenin azalması nedeniyle olabilir (Mittal vd., 2012). İnokulasyon miktarı 10^9 spor/mL olduğu durumda ise, hücre gelişimi oldukça azdır. Bunun sebebinin ortamdaki hücre sayısının çok fazla olmasından dolayı, besinlerin yetersiz gelmesi sonucu tam bir gelişmenin sağlanamaması olabilir. Gulati vd. (2007b) tarafından yapılan çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde en düşük ve en yüksek inokulasyon değerlerinde *Mucor indicus* MTCC 6333 fungusunun inkübe edilmesi sonucu oldukça düşük fitaz aktivitesi elde edilmiştir.

İnokulasyon miktarının artmasıyla birlikte hücre gelişiminde azalma gözlenirken inokulasyon miktarı 10^5 'ten 10^8 'e kadar arttıkça spesifik aktivite değerinde artış saptandı ve 10^8 spor/mL ile diğer inokulasyon miktarları aralarındaki fark karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) bulundu. İnokulasyon miktarının 10^6 , 10^7 ve 10^8 spor/mL olduğu koşullarda sonuçlar hacimsel aktivite açısından aralarındaki fark karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p > 0.05$). Fakat 10^8 spor/mL inokulasyon miktarında hem 631.60 U/mg hücre ile en yüksek spesifik aktiviteye hem de 183.48 U/mL ile en yüksek hacimsel aktiviteye sahip olmasından dolayı, en uygun inokulasyon miktarı olarak belirlendi. İnokulasyon miktarının 10^5 'ten 10^8 spor/mL'ye kadar kültür ortamının son pH'sı üzerinde bir etkisinin olmadığı gözlemlendi.

4.3. *Aspergillus niger* UA-D'nin Fitaz Üretimi Üzerine Kültür Koşullarının Etkisi

Mikroorganizmaların geliştirilmesinde enzim üretme kapasitelerinin taranması, besiyeri formülasyonu ve kültür koşullarının değerlendirilmesi önemli bir adımdır (Singh ve Satyanarayana, 2008). Kültür koşullarının optimizasyonunda amaç, sadece mikroorganizmanın en iyi gelişimin ve enzim üretiminin gerçekleştiği sıcaklık ve pH'nın belirlenmesi değil, aynı zamanda enzimin ortama salındıktan sonra stabil olduğu sıcaklık ve pH'nın belirlenmesidir.

4.3.1. Fitaz Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

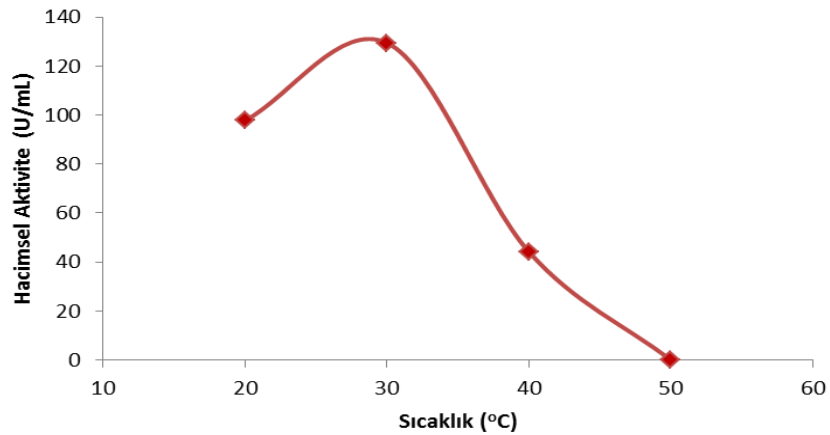
A. niger UA-D'nin en iyi fitaz üretimini gerçekleştirdiği sıcaklığı belirlemek için, 500 mL'lik erlene 100 mL 20, 30, 40 ve 50 °C'de pH'sı 5.5 olacak şekilde hazırlanan fitaz üretim ortamı eklendi. *A. niger* UA-D spor solusyonundan 10^8 spor/mL olacak şekilde kültür ortamına inoküle edildi. Kültür ortamları hazırlanan sıcaklıklarda, 110 rpm'de, 15 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kültürlerin kuru ağırlıkları, ortamın pH'sı ve fitaz aktiviteleri tayin edildi (Tablo 4.4). *A.niger* UA-D en iyi gelişimini ve enzim üretimini gerçekleştirdiği sıcaklık 30 °C olarak belirlendi. *A. niger* UA-D fungusu 50 °C'de gelişmedi (Şekil 4.5).

Tablo 4. 10. Fitaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT.±S.H.)	x	Kuru Ağırlık (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg hücre) (ORT.±S.H.)	x	pH
20	97.75 ± 0.73	a	0.3560	274.58 ± 0.73	a	4.23
30	129.44 ± 0.98	b	0.4216	307.02 ± 0.98	b	4.19
40	44.12 ± 0.28	c	0.3634	121.41 ± 0.28	c	4.05
50	00.00 ± 0.00	d	0.0000	00.00 ± 0.00	d	5.50

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

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



Şekil 4. 5. Fitaz üretimi üzerine sıcaklığın etkisi

Mikroorganizmalar donma noktasından kaynama noktasına kadar geniş bir sıcaklık aralığında büyüebilirler. Herhangi bir organizma, minimum ve maksimum büyüme sıcaklığı aralığında gelişebilir. Bu aralıklar genel olarak yaklaşık 25-30 °C'dir. Düşük sıcaklıklarda büyüme yavaş meydana gelir, çünkü enzimler daha az verimle çalışmaktadır ve ayrıca lipidlerin katılma eğiliminden dolayı membran akışkanlığını kaybeder. Mikroorganizma için optimum sıcaklığa ulaşıncaya kadar büyüme hızında artış, daha sonra ise büyüme hızında tekrar bir azalma görülmektedir. Bir mikroorganizma için en uygun ve sınırlayıcı sıcaklığı enzimlerin üç boyutlu yapısı tarafından enzim sistemlerince belirlenir. Mikroorganizmaların optimum gelişimi, genelde maksimum gelişim sıcaklığına yakındır. Optimum sıcaklığın üzerindeki sıcaklıklarda ise, enzimlerin aktivite kaybetmesi sonucu gelişimde azalma görülmektedir (Hogg, 2005). Fitaz üreten çoğu mikroorganizmanın kültür ortamında gelişimi ve en iyi enzim üretiminin gerçekleştiği optimum sıcaklık 25-37 °C olarak bildirilmiştir (Choi vd., 1999).

A. niger UA-D'nin gelişimi 20 ve 30 °C'de sıcaklığın artması ile birlikte arttığı gözlemlendi, çünkü mikroorganizmaların optimum gelişim sıcaklığına kadar sıcaklıkla fungusun gelişimi paralel olduğu belirlendi. Hücre gelişimi 30 °C'den sonra azalmaya başlamış hatta 50 °C'de gelişmediği gözlemlendi. Bu nedenle fungusun maksimum gelişebildiği sıcaklık sınırı maksimum 50 °C'ye kadar olduğu belirlendi. Sıcaklığın değişimi ile enzim üretiminde meydana gelen değişimler karşılaştırıldığında aralarındaki farklar istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) bulundu. En iyi hücre gelişiminin gerçekleştiği 30 °C'de 307.02 U/mg ile en iyi enzim üretimi gerçekleşti. En iyi enzim aktivitesi de 129.44 U/mL ile 30 °C'de elde edildi. Bu nedenle, hücre gelişimi ile enzim aktivitesinde paralellik gözlemlendi. Mikroorganizmanın geliştiği sıcaklık aralığı değerlendirildiğinde mezofilik bir fungus olduğu belirlendi.

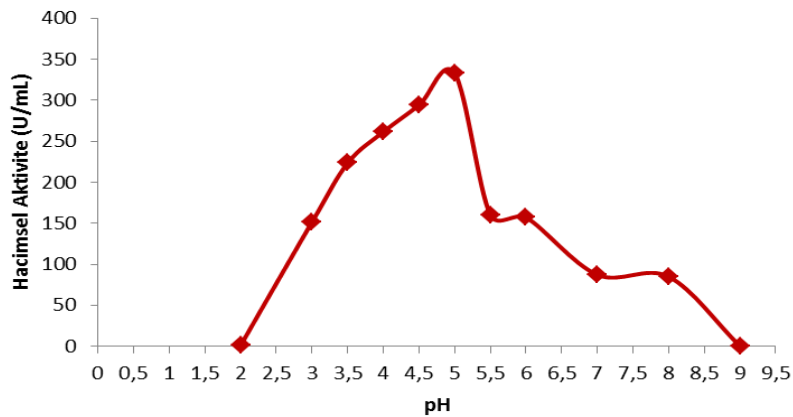
Lee vd. (2005) *Aspergillus* sp. L117 fungusu ile yapılan çalışmadaki bulgular, sonuçlarımıza benzerlik göstermektedir. Fungus 25, 28, 30 ve 32 °C'de gelişim göstermiş, 35 ve 40 °C'de ise gelişimi azalmaya başlamıştır. Kültürün inkübe edildiği sıcaklık değişmesi ile biyokütle gelişimi arttığı sürece fitaz aktivitesinde de artış gözlenmiştir. Fungustan maksimum fitaz üretimi ve en iyi gelişim 30 °C'de elde edilmiştir. Vats ve Banerjee (2005) *A. niger* var *teigham* fitaz üretiminde fungusun en iyi geliştiği ve maksimum enzim üretiminin gerçekleştiği sıcaklığı 30 °C olarak bildirmişlerdir. *A. niger* var *teigham* gelişiminde 37 °C'de azalma gözlenmiş, 45 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda ise fungus gelişmemiştir.

Aspergillus niger ST-6 tarafından fitazın üretimi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlendiği çalışmada 8000 U/mL ile maksimum enzim üretimi 48 saat sonra 30 °C’de elde edilmiştir (Tahir vd.,2010). Fakat gelişim sıcaklığı ile enzim üretim sıcaklığı birbirine paralel olmayan *Pichia anomala*’nın en iyi gelişim sıcaklığı 30 °C iken en iyi fitaz üretimini 20 °C’de gerçekleştirmiştir (Vohra ve Satyanarayana, 2001). Benzer şekilde *Arxula adenivorans*’ın da en iyi gelişim sıcaklığı 28 °C olarak belirlenmiş, en iyi fitaz üretimini ise 44 °C’de gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Sano vd., 1999).

4.3.2. Fitaz Üretimi Üzerine Başlangıç pH’sının Etkisi

A. niger UA-D’nin maksimum fitaz enzimi ürettiği başlangıç pH’sını belirlemek için, 500 mL’lik erlene 30 °C’de farklı pH’larda (pH 2.0, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) 100 mL fitaz üretim ortamı eklenip, 10 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kültürlerin kuru ağırlıkları, ortamın pH’sı ve fitaz aktiviteleri tayin edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.5 ve Şekil 4.6’da görülmektedir. *A. niger* UA-D fungusundan en iyi enzim üretimi pH 5.0’de gerçekleştiği belirlendi, pH 9.0’da ise hücre gelişimi gözlenmedi.

Mikroorganizmalar ortam pH’sından etkilenirler. Gelişim için ortamın minimum ve maksimum pH aralıkları funguslarda, bakterilere göre daha geniştir. Çoğu mikroorganizma, en iyi gelişimi nötral pH civarında gösterirler. Funguslar genelde hafif asidik koşulları tercih ederler. Gelişim devam ettikçe mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri sonucu çevrelerindeki pH değişmekte ve değişen pH, ürünün oluşumunu ve stabilitesini etkilemektedir (Hogg, 2005).



Şekil 4. 6. Fitaz üretimi üzerine başlangıç pH’sının etkisi

Tablo 4. 11. Fitaz üretimi üzerine başlangıç pH'sının etkisi

pH	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT.±S.H.)	x	Kuru Ağırlık (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mghücre) (ORT.±S.H.)	Final pH	x
2.00	1.40 ± 0.04	a	0.2058	6.80 ± 0.04	3.56	a
3.00	151.63 ± 3.58	b	0.2198	689.85 ± 3.58	4.07	b
3.50	223.50 ± 8.88	c	0.2702	827.16 ± 8.88	3.83	c
4.00	261.46 ± 2.68	d	0.3445	758.96 ± 2.68	4.11	d
4.50	294.16 ± 5.57	e	0.3340	880.72 ± 5.57	4.57	e
5.00	332.41 ± 1.24	ef	0.3373	891.18 ± 1.24	3.88	ef
5.50	160.29 ± 5.64	b	0.2778	577.00 ± 5.64	4.91	g
6.00	157.03 ± 7.23	b	0.2989	525.36 ± 7.23	5.67	h
7.00	87.10 ± 2.06	g	0.2981	292.18 ± 2.06	5.55	ı
8.00	84.77 ± 6.61	g	0.3193	265.49 ± 6.61	4.85	ı
9.00	0.00 ± 0.00	h	0.0000	0.00 ± 0.00	9.00	j

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

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

A. niger UA-D en az gelişimi pH 2.0 ve 3.0'de gösterdi. Her iki pH değerinde benzer ölçüde gelişim göstermelerine rağmen, pH 2.0'de enzim üretimi belirlenemeyecek kadar az miktarda gerçekleşti. *A. niger* UA-D pH 9.0'da ise gelişim göstermedi. Fungusun gelişimi pH 2.0-5.0 aralığında pH'daki artış ile paralel olarak artarken, pH 5.0'den sonraki değerlerde ise pH'daki artış fungus gelişiminde azalmaya neden oldu. Enzim üretimi fungus gelişimine paralel bir artış gösterdiği belirlendi. Enzim üretimi pH 5.0 ve üzerindeki değerlerde gerçekleşse de enzimin bu pH aralıklarında stabil olmamasından dolayı, enzim aktivitesinin saptanamadığı düşünülmektedir. Fungus pH'sı 5.0 olan ortamda geliştirildiğinde 891.18 U/mg ile en iyi enzim üretimi elde edildi. Maksimum

enzim üretimi ve fungus gelişimi pH 5.0'de (332.41 U/mL) saptanmış olmasına rağmen, pH 4.5 ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, *Aspergillus sp.* 307 ile yapılan çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermektedir. *Aspergillus sp.* 307'de ortam başlangıç pH'sının 3.0-5.0 aralığında olduğu koşullarda hücre gelişimi ve enzim üretimi paralellik göstermiştir. Fitaz enzimi üretimi için pH 3.0-5.0 aralığının, pH 5.0'in üzerindeki değerlerden daha elverişli olduğu bildirilmiştir. Maksimum fitaz üretiminin ise başlangıç pH'sının 5.0 olduğu koşullarda elde edilmiştir (Gargova vd., 1997; Gargova ve Sariyska, 2003). Lee vd. (2005) maksimum fitaz aktivitesi için en uygun başlangıç pH'sının 5.0 olduğunu, pH 5.0-7.0 aralığında rölatif olarak yüksek fitaz aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Fitaz üretimi için kültür ortamının en uygun başlangıç pH'sının *Aspergillus niger* var teigham için pH 6.5 (Vats ve Banerjee, 2002), *Aspergillus sp.* 5990 için pH 6.0 ve 7.0 (Kim vd., 1999), *Pichia anomala* için pH 7.0 (Vohra ve Satyanarayana, 2001), *Aspergillus niger* için pH 3.0 (Volfova vd., 1994) ve *Aspergillus niger* ST-6 için pH 6.0 (Tahir vd., 2010) olarak bildirilmiştir.

4.4. *Aspergillus niger* UA-D'nin Büyüme Eğrisi

A. niger UA-D'nin zamana bağlı gelişimini ve en iyi fitaz üretim zamanını saptamak için, 10 gün boyunca 24 saatlik periyotlar ile biyokütle, pH ve enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı, elde edilen değerler Tablo 4.6'da verildi.

A. niger UA-D belirlenen optimum pH ve sıcaklıkta geliştirildiğinde hücre gelişimi 1. günde en düşük seviyede elde edildi ve süreye bağlı olarak gelişimin arttığı gözlemlendi. Dolayısıyla elde edilen biyokütle miktarı gelişime bağlı olarak 5. güne kadar artmaya devam ettiği gözlemlendi (Şekil 4.7). Biyokütle miktarında 6. ve 7. günlerde maksimum güne göre bir düşüşün olduğu, ardından sabitlendiği ve 7. günden itibaren ciddi bir azalmanın olduğu gözlemlendi.

Başlangıçta pH'sı 5.0 olan ortam, 1. günden itibaren azalmaya başlamış, hatta enzim aktivitesinin en yüksek olduğu 7. güne kadar pH 2.80-3.50 arasında olduğu belirlendi. Enzim üretiminin maksimum olduğu 7. günde ise, pH'nın birden arttığı ve pH 4.48'e ulaştığı saptandı (Şekil 4.8).

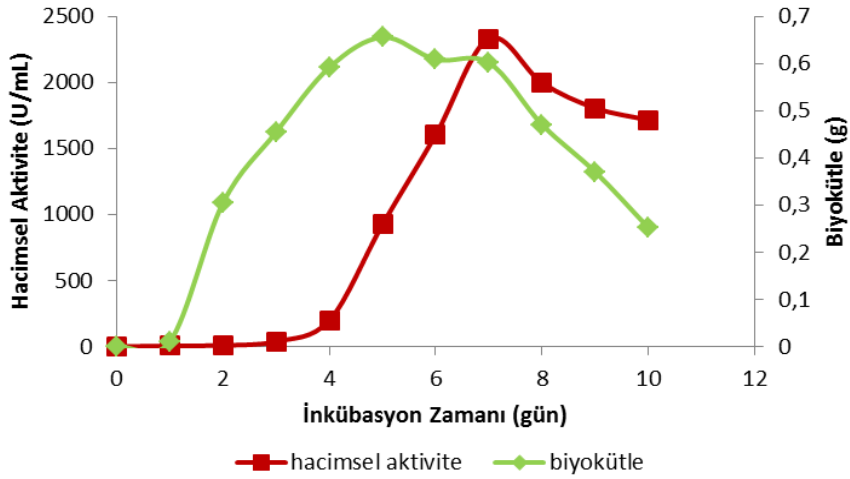
Enzim aktivitesinde ilk 3 günde tespit edilen artışlar arasındaki fark, istatistiksel olarak önemsiz bulundu. İnkübasyonun 4. gününden itibaren enzim aktivitesi artarak 7. günde maksimum değere ulaştı ve ölçülen diğer değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu (Şekil 4.7). Maksimum değere ulaştığı 7. günden sonra enzim aktivitesinde bir düşüş gözlemlendi. Ancak, 7. ve 8. günler için elde edilen değerler istatistiksel olarak önemsizdir. Bu aktivite kaybının ortamdaki proteazların aktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı zamanda enzimin ortama salındıktan sonra, 3 gün boyunca aktivitesinin büyük bir kısmını koruyabilmesinin, inkübasyon ortamının pH'sında (4.3-4.5) stabil olduğu ve ortamdaki proteazlara karşı direncinin yüksek olması ile açıklanabilir.

Tablo 4. 12. *Aspergillus niger* UA-D'nin büyüme eğrisi

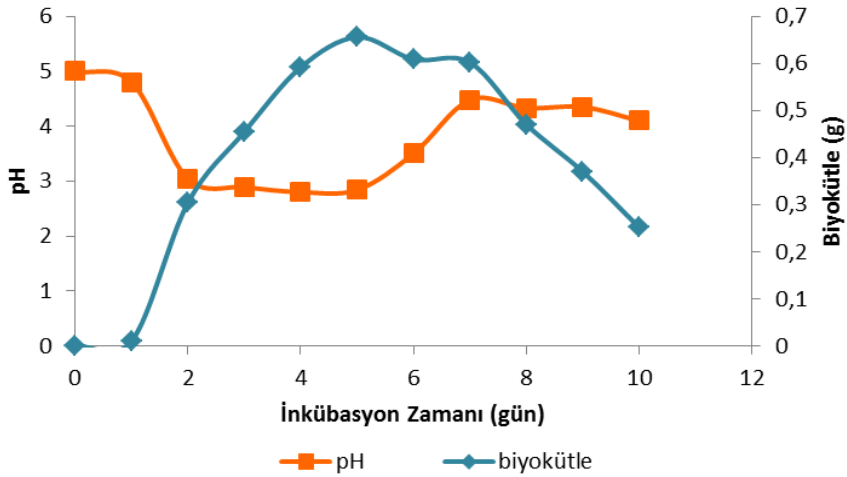
İnkübasyon Süresi (gün)	Biyokütle (mg/mL)	Hacimsel Aktivite (U/ mL) (ORT. ± S.H.)	Final pH	x
1	0.0100	4.83 ± 1.37	4.80	a
2	0.3042	8.87 ± 0.33	3.04	a
3	0.4546	38.23 ± 1.25	2.89	a
4	0.5917	198.18 ± 3.28	2.80	a
5	0.6558	924.96 ± 3.68	2.84	b
6	0.6087	1603.24 ± 1.12	3.50	c
7	0.6019	2331.71 ± 22.60	4.48	e
8	0.4703	1996.35 ± 8.85	4.33	e
9	0.3700	1805.35 ± 9.73	4.35	f
10	0.2517	1714.93 ± 13.63	4.10	f

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

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



Şekil 4. 7. *Aspergillus niger* UA-D'nin gelişimi ile hacimsel aktivite ve biyokütle değişimi



Şekil 4. 8. *A. niger* UA-D'nin gelişimi ile kültür ortamındaki pH ve biyokütle değişimi

A. niger UA-D'nin zamana bağlı gelişimi incelendiğinde hücrenin ortama adaptasyon zamanı olan 1. günde lag fazında olup biyokütle ve enzim üretimi en düşük seviyededir. Hücrenin gelişimi ve gerekli metabolitleri meydana getirmesi için kendini hazırladığı bu evre, inokulasyon miktarına bağlıdır (Hogg, 2005). İnkübasyon zamanına bağlı olarak 2. ve 5. günlerde log fazı meydana gelerek

biyokütlerde artış, bu süre içerisinde devam ettiği görüldü. İnkübasyonun 6. ve 7. günlerinde ise durgunluk fazına girerek büyüme durmuş, ortamda besin kaynaklarının azalmasına da bağlı olarak, hücreler ölüm fazına geçerek lizize uğradıkları gözlemlendi.

Kültür ortamının pH'sı lag fazında başlangıç pH'sına yakın değerdedir. Fakat enzim aktivitesinin maksimum olduğu güne kadar biyokütle arttıkça, kültür ortamının pH'sında azalma meydana gelmiştir. Benzer sonuçlar Tseng vd. (2000) tarafından *Penicillium simplicissimum* W46 suşunun inkübasyonu sonucu elde edilmiştir. Bu suşun 5 gün inkübasyonu boyunca kültür ortamının pH'sının 3.0'e kadar düştüğü bildirilmiş, pH değerlerindeki bu düşüşün hücrelerin gelişimi süresince üretilen organik asitten kaynaklandığı belirtilmiştir.

Çalışmamızda enzim aktivitesi hücre gelişiminin azalmaya başladığı, enerji ve besinin sınırlı olduğu durgunluk fazının son safhasında, maksimum seviyeye ulaştığı görüldü. Fitaz enziminin logaritmik fazda sentezlenmemesi hücrenin gelişimi sırasında fitaz enzimine ihtiyaç duymaması ya da bazı besinlerin ortamda sınırlı olmasına yanıt olarak sentezlenebileceği düşünülmektedir (Choi vd., 2001). Greiner vd. (1997) fitaz sentezinin fosfatın sınırlı olduğu koşullarda stimüle edildiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara benzer şekilde *Bacillus* sp. KHU-10 inkübasyondan 5 gün sonra (Choi vd., 2001), *Candida krusei* inkübasyonundan 24 saat sonra (Quan vd., 2001), *Selenomonas ruminantium* inkübasyonundan 12 saat sonra (Yanke vd., 1999) durgun fazda fitaz enzimi maksimum aktiviteye ulaşmıştır. *Escherichia coli* (Greiner vd. 1993) ve *Klebsiella terrigena* (Greiner vd. 1997) da fitaz enzimini durgun fazda üretmişlerdir. Fakat durgun fazın dışında *B. subtilis* (natto) (Shimizu, 1992) geç logaritmik fazda, *Sporotrichum thermophile* (Singh ve Satyanarayana, 2008) logaritmik fazda fitaz enzimini üretmişlerdir.

4.5. Fitazın Saflaştırılması

Fitazın saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesi, jel kromatografisi, iyon değişim, hidrofobik etkileşim ve affinite kromatografisi ve RPHPLC yaygın kullanılan biyokimyasal tekniklerdir (Dvořáková, 1998).

Enzimin saflaştırma işlemine geçilmeden önce *Aspergillus niger* UA-D suşu optimum üretim koşullarında geliştirildi. Hücre dışı enzim olduğu için, kültür ortamı süzildükten sonra elde edilen süzüntü "Ham ekstrakt" olarak adlandırıldı. Ham ekstrakt sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, iyon değişim kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi işlemlerinden geçirilerek saflaştırıldı. Saflaştırma adımlarında elde edilen fraksiyonların aktivite ve protein tayinleri standart koşullar altında gerçekleştirildi. Saflaştırma basamaklarında elde edilen fraksiyonlar PAGE ve SDS-PAGE ile görüntülediğinde enzimin saflaştırıldığı görüldü, daha sonra ise, standart proteinler kullanılarak enzimin molekül ağırlığı belirlendi.

Saflaştırma işlemlerinin ilk basamağında yaklaşık % 80'inde çöktürme işlemi uygulanmakta ve bu amaç için en çok amonyum sülfat tuzu (% 80) kullanılmaktadır. Saflaştırma işlemlerinde çöktürme ile deriştirmenin ardından kromatografi adımlarına geçilir. Bu amaçla en çok iyon değişim (% 67), jel filtrasyon (% 60) ve hidrofobik etkileşim (% 18) kromatografileri kullanılmaktadır (Saxena vd., 2003).

4.5.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Kültür ortamı süzildükten sonra elde edilen ham ekstrakt amonyum sülfat çöktürme denemeleri için kullanıldı. Ham ekstrakt için ayrı ayrı % 0-40, % 40-60, % 60-80, % 80-95 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapıldı (Tablo 4.7).

Buna göre % 80-95'lik çöktürmeden elde edilen enzimin saflaştırma katsayısı 1.6, spesifik aktivitesi 8848 U/mg protein ve % verimi 34 olarak bulunmuş olup, diğer konsantrasyonlardaki çöktürmelerden yüksek olduğu için, bundan sonraki aşamalarda % 80-95'lik amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve elde edilen pellet 20 mM asetat tamponuna karşı 36 saat diyaliz edildi. Diyalizat bir sonraki saflaştırma adımı olan DEAE Sefaroz CL-6B kolonuna uygulandı.

Tablo 4. 13. Amonyum sülfat çöktürme basamakları

Fraksiyonlar	Total Hacim (mL)	Total Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	Total Protein (mg/mL) (ORT. ± S.H.)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma katsayısı	Verim (%)
Ham enzim	250.00	57198.00 ± 126.05	10.5 ± 1.13	5447	1	100
% 40 (% 0-40)	7.50	272.78 ± 12.67	1.04 ± 0.12	262	0.048	0.48
% 60 (% 40-60)	7.50	283.28 ± 09.23	0.37 ± 0.01	758	0.14	0.5
% 80 (% 60-80)	7.00	2177.77 ± 45.78	1.03 ± 0.04	2116	0.39	3.8
% 95 (% 80-95)	12.00	19536.00 ± 67.45	2.21 ± 0.89	8848	1.6	34

Tablo 4. 14. *A. niger* UA-D fitazının saflaştırma adımları

Fraksiyonlar	Total Hacim (mL)	Total Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	Total Protein (mg/mL) (ORT. ± S.H.)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma katsayısı	Verim (%)
Ham enzim	250	57198 ± 126	10.5 ± 1.13	5447	1	100
Amonyum sülfat çöktürmesi (% 80-95)	12	19536 ± 67	2.21 ± 0.89	8848	1.6	34
DEAE Sefaroz CL-6B	9	4320 ± 98	0.127 ± 0.02	34016	6.25	7.6
Fenil Sefaroz CL-4B	3	1494 ± 62	0.00375 ± 0.12	398400	73	2.6

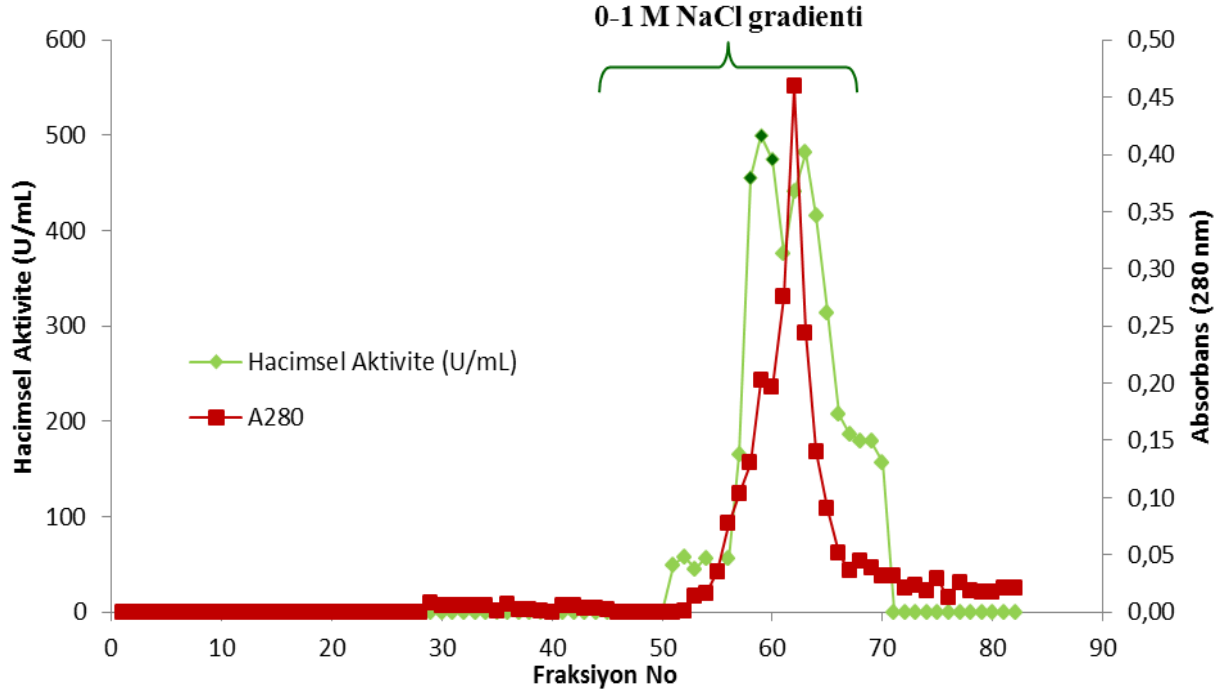
4.5.2. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi ile ilgili sonuçlar Şekil 4.9'da özetlendi. Kolon dolgu maddesi olarak DEAE Sefaroz CL-6B kullanıldı. Kolon önce 20 mM asetat tamponu (pH 4.5, 4°C) ile dengeye getirildi. Kolon önce bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması için 20 mM asetat tamponu (pH 4.5, 4 °C) tampon ile yıkandı. Daha sonra kolona bağlanan proteinlerin kolondan çıkarılması için iyon şiddeti arttırılarak NaCl (0-1 M) ile linear gradient yapıldı. Tuz gradientinin 0.66-0.78 M derişimlerine karşılık gelen 58. ve 60. fraksiyonlarda protein derişim ve enzim aktivitesinin çok yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.9). Bu yüksek fraksiyonlar birleştirilerek enzim aktivitesi ölçüldüğünde kolondan enzimin % 7.6 verimle, 6.25 kat saflaştırılarak elde edilgi saptandı.

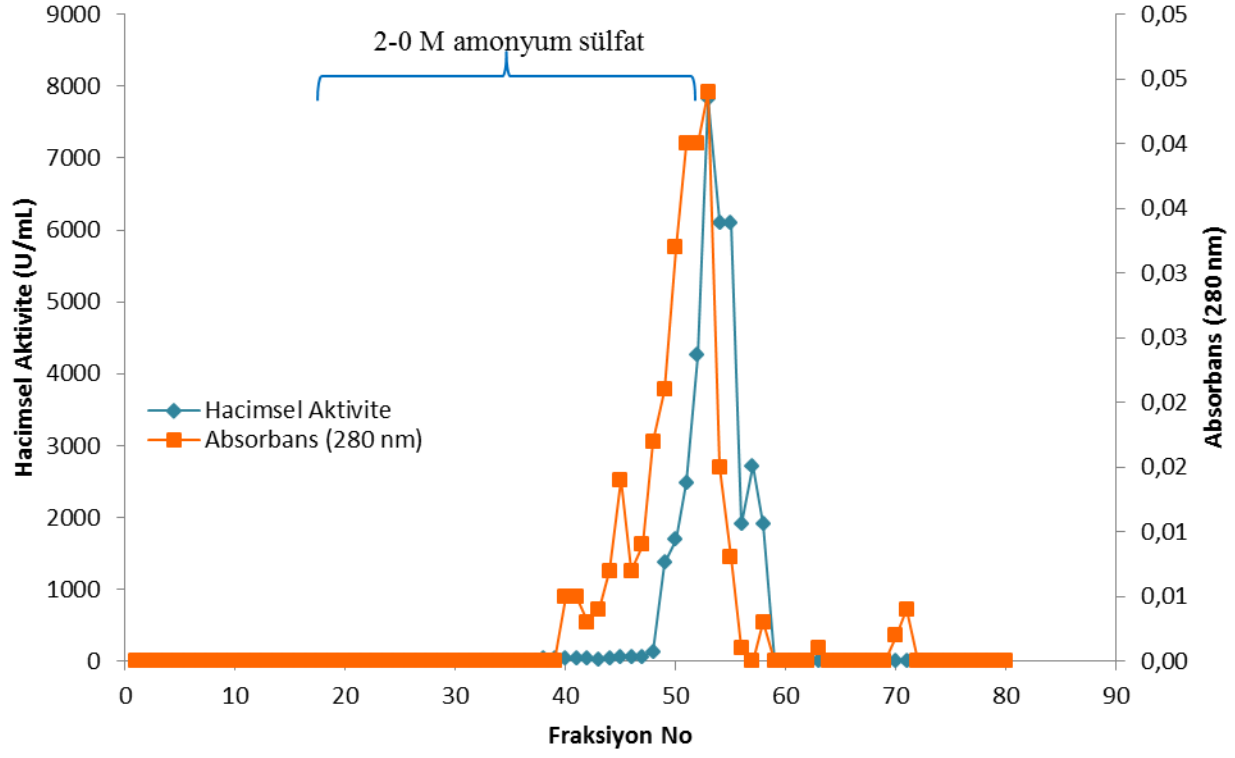
4.5.3. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile ilgili sonuçlar Şekil 4.10'da özetlendi. Kolon dolgu maddesi olarak Fenil Sefaroz CL-4B kullanıldı. Kolon önce 2 M (NH₄)₂SO₄ içeren 20 mM asetat (pH 4.5, 4°C) tamponu ile dengeye getirildi. DEAE Sefaroz CL-6B kolonundan elde edilen aktif fraksiyonlara da 2 M (NH₄)₂SO₄ eklendi ve kolona uygulandı. Kolon önce bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması için 2 M (NH₄)₂SO₄ içeren tamponla yıkandı. Daha sonra kolona 2-0M (NH₄)₂SO₄ ters tuz gradienti uygulanarak bağlanan proteinlerin ve fitaz enziminin kolondan çıkması sağlandı. Gradientin sonuna doğru protein ve enzim çıkışının olduğu görüldü. Gradientin ardından kolonda protein çıkışı düşene kadar tuz içermeyen tamponla yıkanmaya devam edildiğinde enzimin büyük kısmının gradientin bitiminde kolondan çıktığı görüldü.

Yapılan ön hidrofobik etkileşim kromatografisi çalışmalarında düşük tuz konsantrasyonlarında enzimin kolona hiç bağlanmadığı görüldü. Bu durum enzim yüzeyinde mevcut hidrofobik alanların çok az olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca, amonyum sülfat çöktürme çalışmalarında da, enzimin yüksek doygunluktaki tuz konsantrasyonlarında çökmesi de bu durumu desteklemektedir. Bu nedenle, yüksek tuz konsantrasyonları denenerak enzimin kolona bağlanması sağlandı. Kolona enzimin bağlanması ile ters tuz gradienti uygulayarak kolondan örneğin çıkışının derecelendirilmesi sağlanarak enzim saflaştırıldı.



Şekil 4. 9. FitaZ enziminin iyon değişim (DEAE Sefaroz CL-6B) kromatografisinde saflaştırılması



Şekil 4. 10. Fitaz enziminin hidrofobik etkileşim (Fenil Sefaroz CL-4B) kromatografisinde saflaştırılması

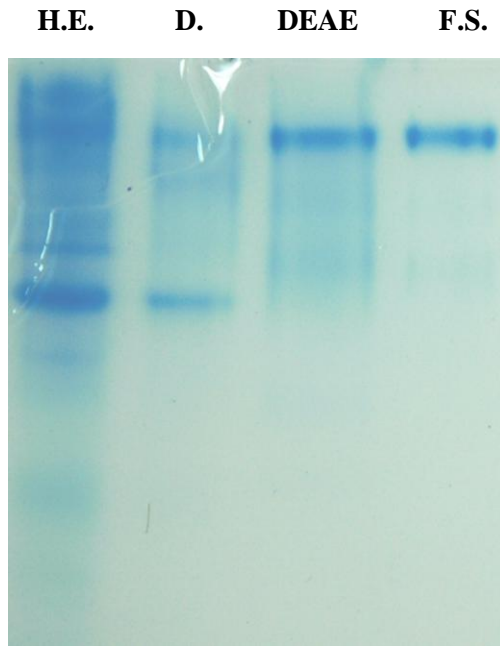
Protein fraksiyonlarında enzim aktivitesi ölçüldüğünde 53. fraksiyonda enzim aktivitesi diğer fraksiyonlara göre yüksek bulundu ve bu fraksiyonun enzim aktivitesi ölçüldüğünde enzimin % 2.6 verimle, 73 kat saflaştırıldığı saptandı. Fraksiyonun SDS-PAGE görüntüsünde tek bant elde edilerek enzimin saflaştırıldığı kanıtlandı. Hidrofobik etkileşim kromatografisinden elde edilen bu fraksiyon karakterizasyon çalışmalarında kullanıldı.

4.6. *Aspergillus niger* UA-D Fitazının Karakterizasyonu

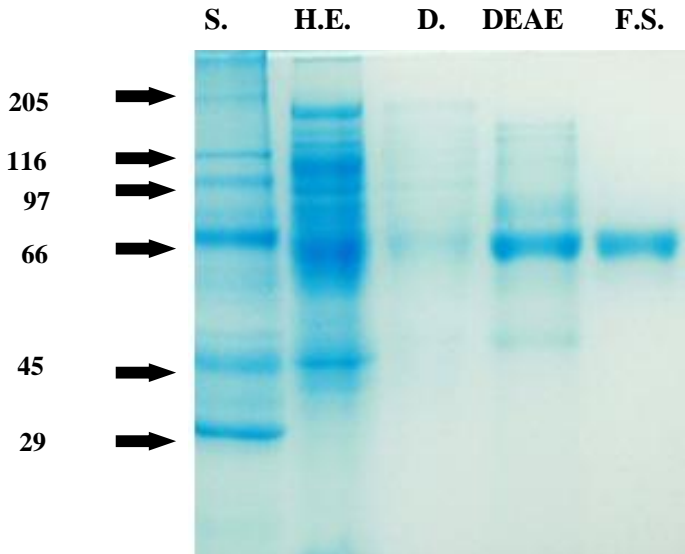
4.6.1. PAGE ve SDS-PAGE Yöntemi ile Fitazın Molekül Ağırlığının Tayini

Enzimin saflığını ve molekül ağırlığını saptamak için PAGE ve SDS-PAGE yapıldı. Protein saflaştırma adımlarını izlemek için PAGE yapıldığında her saflaştırma adımında protein bantlarının sayısının gittikçe azaldığı görülmektedir (Şekil 4.11). En son adım olan Fenil Sefaroz CL-6B kolonunda çıkan örnekte tek protein bandı görüldü. Böylece elde edilen fraksiyonun sadece fitaz enzimi içerdiği ve ham ekstraktan çeşitli yöntemler kullanılarak fitaz enziminin saflaştırıldığı kanıtlandı. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığını ve iki veya daha fazla alt birimden oluşup, oluşmadığını saptamak için SDS-PAGE yapıldığında enzimin tek bir alt birimden oluştuğu görüldü (Şekil 4.12).

Protein standartlarının Rf değerleri ile molekül ağırlıklarının logaritması alınarak standart grafiği çizildi (Şekil 4.13). Bu grafikten elde edilen doğrunun denklemi $y = -1.133x + 5.2935$, tamamlayıcılık katsayısı $R^2 = 0.9925$ bulundu. Bu denklemden yararlanarak enzimin molekül ağırlığı hesaplandı. Buna göre fitazın moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 64.57 kDa olarak hesaplandı.

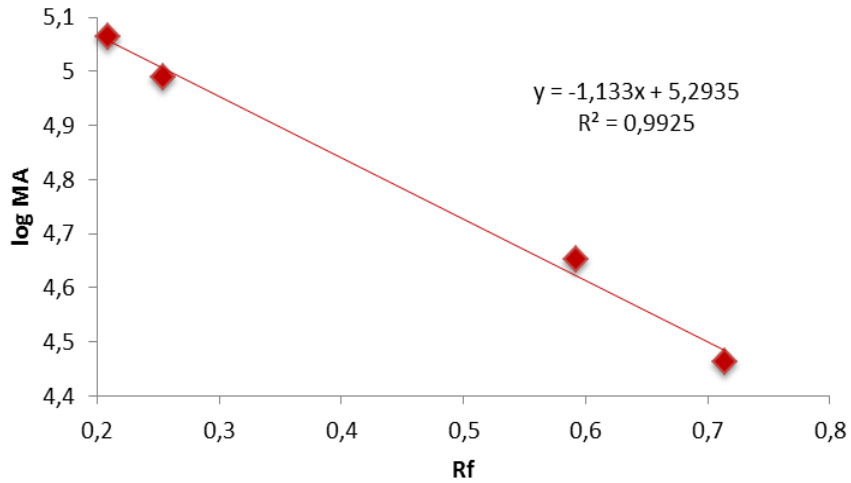


Şekil 4. 11. Saflaştırma adımlarının PAGE görüntüleri



Şekil 4. 12. Saflaştırma adımlarının SDS-PAGE görüntüleri

(S: Standart, 205 kDa miyozin, 116 kDa β -galaktozidaz, 97 kDa fosforilaz B, 66 kDa albumin, 45 kDa albumin, 29 kDa karbonik anhidraz, S:Standart, H.E.: Ham enzim, D: Diyalizat, DEAE: DEAE Sefaroz, F.S.: Fenil Sefaroz)



Şekil 4. 13. SDS-PAGE protein standart eğrisi

İzole edildikleri kaynaklara bağlı olarak fitazlar moleküler ağırlığı 35-700 kDa arasında değişmektedir (Liu vd., 1998). Filametli funguslardan izole edilen fitazların moleküler ağırlıkları ise genelde 70-100 kDa arasındadır (Wodzinski ve Ullah, 1996; Casey ve Walsh, 2003). *Klebsiella aerogenes*'den izole edilen fitaz enzimi alışılmışın dışında 10-13 kDa'luk kısa peptidten oluşmaktadır (Liu vd., 1998). Bakteriyel fitazlar genelde funguslardan elde edilen fitazlara göre daha küçük moleküler ağırlığa sahiptir. Fungal fitazların öngörülen moleküler ağırlıkları genelde 50 kDa iken, deneysel sonuçlarda elde edilen verilerin 65-70 kDa arasında olması fungal fitazlarda glikozilasyonun göstergesidir (Choi vd., 2001; Golovan vd., 2000; Han vd., 1999; Kerovuuo vd., 1998; Rodriguez vd., 2000). *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959 fitazının enziminde karbohidrat içeriğinin % 30.5 olduğu bildirilmiş, moleküler ağırlığı 124 kDa olarak saptanmıştır (Casey ve Walsh, 2004). *Aspergillus niger* NRRL 3135 doğal fitazının % 27'sini karbohidrat içeriğinin oluşturduğu bildirilmiştir (Ullah vd., 1994). Çalışmamızda *A. niger* UA-D fungusundan elde edilen fitazın moleküler ağırlığı, 66 kDa moleküler ağırlığa sahip *Aspergillus niger* van Teighem fitazı ile benzerlik göstermektedir (Vats ve Banerjee, 2005). Ancak, 68 kDa moleküler ağırlığa sahip dimerik *Aspergillus niger* NRRL 3135 fitazı (Ullah ve Phillippy, 1988; Ullah ve Sethumadhavan 1998) ve 60 kDa moleküler ağırlığa sahip dimerik *Aspergillus oryzae* fitazı (Shimizu 1993) ile farklılık göstermektedir. Yaptığımız çalışmada enzimin karbohidrat kalıntısı içerip içermediği saptanmamıştır. Daha sonra yapılacak çalışmalarda karbohidrat içeriğinin ve jel filtrasyon kromatografisi ile doğal enzimin moleküler

ağırlığının belirlenmesi düşünülmektedir. Böylece enzimin monomerik veya iki ya da daha fazla eş alt birimden oluşup oluşmadığı kesin olarak belirlenebilecektir.

4.6.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

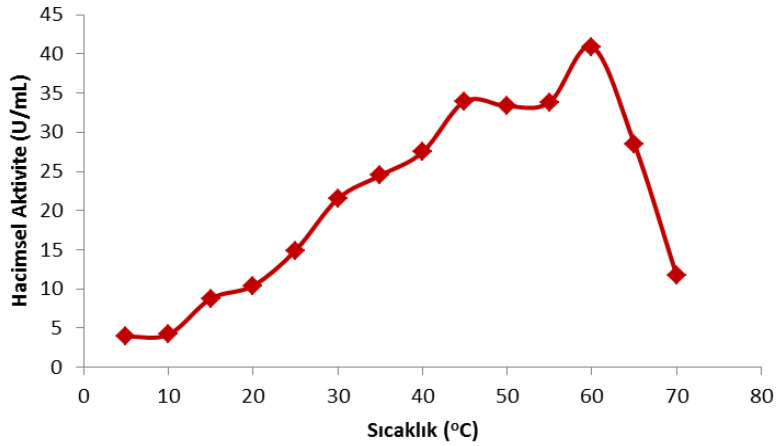
Ham fitaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin sonuçları Tablo 4.9 ve Şekil 4.14’de sunuldu. Enzim aktivitesi 5 °C’de en düşük değerde (3.94 ± 0.21) olup, sıcaklığın kademeli olarak yükseltilmesiyle aktivite doğrusal bir şekilde artarak 60 °C’de maksimum seviyeye (40.92 ± 0.35) ulaştığı belirlendi. Sıcaklığın daha üst seviyelere yükseltilmesiyle, aktivitenin hızla düştüğü görüldü. 60 °C’deki maksimum enzim aktivitesi ile diğer tüm sıcaklıklardaki enzim aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildiğinde, 45, 50, 65, ve 70 °C’lerde aktivite değişimi optimum aktivitenin sırasıyla % 83, 81, 70 ve 29’unu gösterdiği belirlendi.

Tablo 4. 15. *A. niger* UA-D ham fitaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	% Aktivite
5	3.94 ± 0.21	a	9.63
10	4.18 ± 0.19	a	10.22
15	8.76 ± 0.34	b	21.41
20	10.41 ± 1.11	c	25.44
25	14.91 ± 0.41	d	36.44
30	21.51 ± 0.19	e	52.57
35	24.49 ± 0.24	e	59.85
40	27.46 ± 0.27	f	67.11
45	33.95 ± 0.66	g	82.97
50	33.34 ± 0.60	g	81.48
55	33.85 ± 0.44	g	82.72
60	40.92 ± 0.35	h	100.00
65	28.53 ± 0.55	f	69.72
70	11.70 ± 0.50	c	28.59

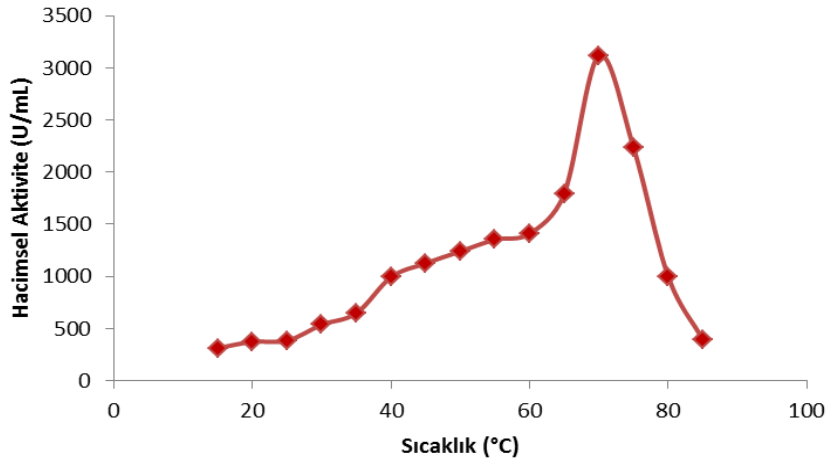
ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar



Şekil 4. 14. Ham *A. niger* UA-D fitazının aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Saf fitaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin sonuçları Tablo 4.10 ve Şekil 4.15’de sunuldu. Enzim aktivitesi 15 °C’de en düşük değerde (313.06 ± 14.07) olup, sıcaklığın kademeli olarak yükseltilmesiyle aktivite doğrusal bir şekilde artarak 70 °C’de maksimum seviyeye (3117.60 ± 41.82) ulaştığı belirlendi. Sıcaklığın daha üst seviyelere yükseltilmesiyle, aktivitenin hızla düştüğü görüldü. 70 °C’deki maksimum enzim aktivitesi ile diğer tüm sıcaklıklardaki enzim aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildiğinde, 50, 60, 75 ve 80 °C’lerde optimum aktivitenin sırasıyla % 39, 45, 71 ve 32’ini gösterdiği belirlendi.



Şekil 4. 15. *A. niger* UA-D fitazının aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Tablo 4. 16. *A. niger* UA-D fitazının aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite
15	313.06 ± 14.07	a	10.04
20	373.88 ± 7.07	a	11.99
25	384.43 ± 7.82	a	12.33
30	537.71 ± 21.26	b	17.25
35	648.13 ± 17.90	c	20.79
40	993.51 ± 25.76	d	31.87
45	1126.52 ± 30.23	e	36.13
50	1240.06 ± 4.52	f	39.78
55	1353.00 ± 29.81	g	43.40
60	1410.00 ± 28.25	g h	45.23
65	1794.00 ± 27.54	ı	57.54
70	3117.60 ± 41.82	j	100.00
75	2233.58 ± 51.79	e k	71.64
80	997.57 ± 7.02	b l	32.00
85	391.73 ± 8.43	a m	12.57

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

x: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan ortalamalar

Ham enzim ile saf enzim arasındaki optimum sıcaklık 60 ve 70 °C olarak farklı sıcaklık değerlerinde elde edilmiştir. Bunun sebebinin ham enzim çözeltisinde fitaz enzimi dışındaki diğer proteaz enzimlerinin fitaz enzimi üzerine etkisi veya ortamda bulunan diğer organik veya inorganik molekülerin enzim aktivitesini azalttığı düşünülmektedir.

Fitazların genelde optimum sıcaklıkları 45-60 °C arasında olmasına rağmen, 50-70 °C arasında sıcaklıklarda da yüksek aktivite gösterirler (Vats ve Banerjee, 2004). *Bacillus sp.* DS11 (Kim vd., 1998), *Mucor indicus* MTCC 6333 (Gulati vd., 2007b), *Aspergillus terreus* (Yamamoto vd., 1972), *Swanniomycetes occidentalis* (Matsui vd., 2000), *Rhizomucor pusillus* (Chadha vd., 2004) ve *T. lanuginosus* TL-7 (Gulati vd., 2007c)'den elde edilen fitazların maksimum aktiviteleri 70 °C'de olduğu saptanmış olup, çalışmamızda kullanılan fitazla benzerlik göstermektedir.

A. niger UA-D fitazının optimum sıcaklık değeri, optimum aktivitesini 40 °C’de gösteren *Pseudomonas syringae* MOK1 (Cho vd., 2003), *Bacillus* sp. KHU-10 (Choi vd., 2001) ve *Candida krusei* WZ-001 (Quan vd., 2002) fitazlarından, 50 °C’de gösteren *Aspergillus* sp. L117 (Lee vd., 2005), *Aspergillus ficuum* (Liu vd., 1999), *Aspergillus oryzae* (Shimizu, 1993), *Aspergillus niger* SK-57 (Nagashima vd., 1999), *Aspergillus niger* NCIM 563 (Soni ve Khire, 2007) fitazlarından, 60 °C’de gösteren *Pichia anomala* (Vohra ve Satyanarayana, 2002), *Aspergillus niger* (Thyagarajan vd., 2010) ve *Cryptococcus laurenti* ABO 510 (Staden vd., 2007) fitazlarından daha yüksektir. Buna karşın maksimum aktivitelerini daha yüksek sıcaklıklarda gösteren fitazlar da mevcuttur. *Arxula adenivorans* (Sano vd., 1999) ve *Aspergillus oryzae* AK9 (Chantasartrasamee vd., 2005) fitazları optimum aktivitelerini 75 °C’de, *Schwanniomyces castelli* (Segueilha vd., 1992) 77 °C’de, *Aspergillus caespitosus* (Cao vd., 2007) 80 °C’de gösterdiğini bildirmişlerdir.

4.6.3. Enzim Stabilitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Fitazın stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi ile ilgili sonuçlar Tablo 4.11-4.12 ve Şekil 4.16-4.17’de sunuldu. Fitaz enziminin 25 °C’da ilk 30 dakikada aktivitesinin % 98’ini koruduğu ve 8. saate kadar kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($p>0.05$). İnkübasyonun 16. saatinden itibaren enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak azalma göstermesine rağmen, 24 saat sonra aktivitesinin % 87’sini koruduğu saptandı.

Fitaz enziminin 37 °C’da 30 dakikadan başlayarak 24 saate kadar inkübasyonu sonucu elde edilen sonuçlar 25 °C’da elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Fitazın ilk 30 dakikada aktivitesinin % 96’sını koruduğu ve 8. saate kadar kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($p>0.05$). İnkübasyonun 16. saatinden itibaren enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak azalma göstermesine rağmen, 24 saat sonra aktivitesinin % 86’sını koruduğu saptandı.

Fitaz enzimi 60 °C’da inkübasyonunda ilk 10 dakikada aktivitesinin % 95’ini koruduğu ve 10. dakikaya kadar kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($p>0.05$). İnkübasyonun 15. dakikasından itibaren inkübasyonun 3. saatine kadar enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak azalma göstermesine rağmen, başlangıç aktivitesinin % 90’ından fazlasını koruduğu belirlendi. Enzim aktivitesi inkübasyonun 4. ve 8. saatlerinde kontrole

göre istatistiksel olarak azalma göstermiş ve başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 84 ve 83'ünü korumuştur.

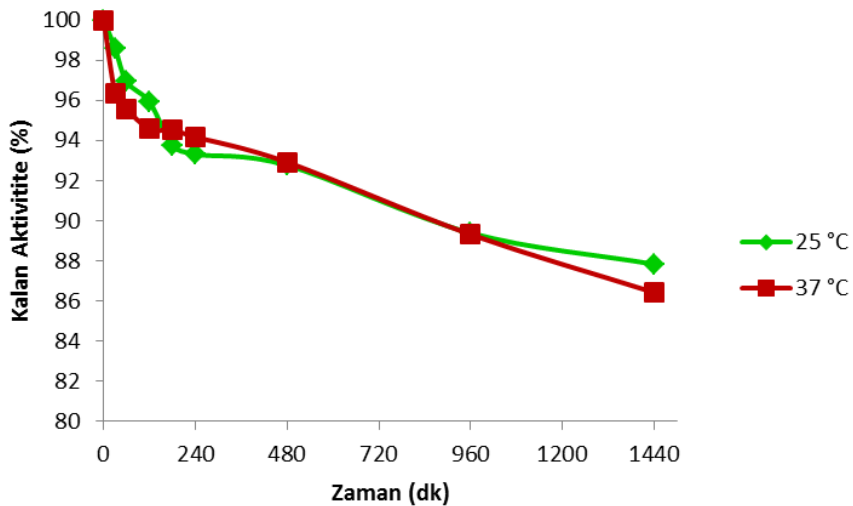
Fitaz enzimi 70 °C'da inkübasyona bırakıldığında ilk 5 dakikada aktivitesinin % 96'sını koruduğu ve 5. dakikaya kadar kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($p>0.05$). İnkübasyonun 10. dakikasından itibaren inkübasyonun 45. dakikasına kadar enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak azalma göstermesine rağmen, başlangıç aktivitesinin % 85'inden fazlasını koruduğu belirlendi. Enzim aktivitesi inkübasyonun 1. ve 2. saatlerinde kontrole göre istatistiksel olarak azalma göstermiş ve başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 81 ve 76'sını korumuştur. Enzim, inkübasyonun 3., 4. ve 8. saatlerinde başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 72, 70 ve 63'ünü korumuştur.

Fitaz enzimi 80 °C'da inkübasyona bırakıldığında ilk 5 dakikada aktivitesinin % 69'unu koruduğu ve 5. dakikasından itibaren kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü ($p<0.05$). Enzim inkübasyonun 10. ve 15. dakikalarında başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 56 ve 20'sini korumuştur.

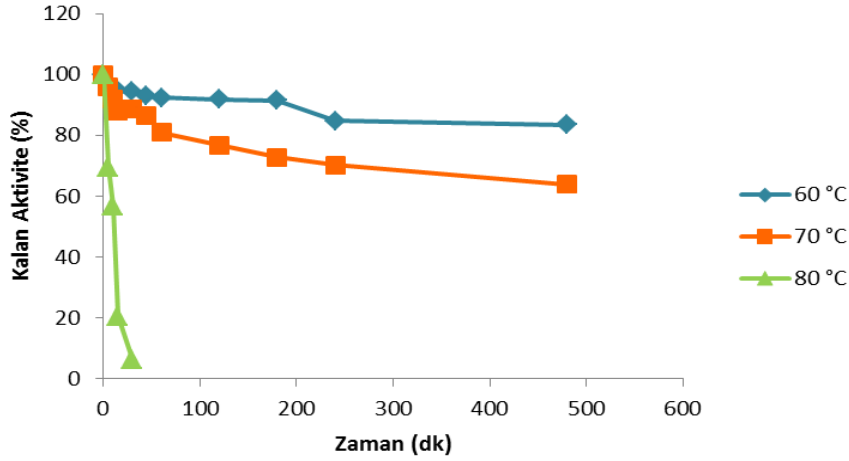
Fitazlar genelde geniş pH aralıklarında termostabildir (Dvořáková, 1998). Termostabilite fitazların endüstriyel uygulamaları için önemli bir kriter olarak kabul edilir (Pandey vd., 2001). Çünkü ticari yemler genellikle pellet formundadır ve pelletleme işlemleri sırasında yüksek sıcaklık (60-80 °C) ve buhar kullanılır. Bu işlem sırasında, tüm yem enzimlerinin önemli ölçüde aktivite kaybını önlemek için ısıya dayanıklı olması gerekir (Lei vd., 2007). Pelletleme işlemlerinin yanı sıra *Salmonella* gibi patojen mikroorganizmaların yok edilmesi için, dünya çapında düzenlenen mevzuatlar gereği işlem sıcaklıklarının artması, yem endüstrisinde kullanılan enzimlerde termal stabilite sorunlarının yaşanmasına neden olmuştur (Ullah ve Gibson, 1987). Bu sorun enzimlerin pelletleme işlemi sonrası ilave edilmesi ile aşılmaya çalışılmış ve yem pelletlerinin üzerine enzimler sıvı formda püskürtülmüştür.

Çalışmamızda *A. niger* UA-D fitazının 25 ve 37 °C'de 24 saat inkübasyonun ardından aktivitesinin % 85'den fazlasını koruduğu saptandı. Enzim 60 °C'de 3 saatte aktivitesinin % 90'ını, 70 °C'de ise, 1 saat aktivitesinin % 80'inini koruyabilmiştir. Enzim 80 °C'de ise, 10 dakikada aktivitesinin % 50'sini koruyabilmiştir. Elde edilen sonuçlarımız 1 saat inkübe edildikten sonra, 40 °C'ye kadar enzim aktivitesinin tamamının, 50 °C'de aktivitesinin % 80'ini korurken 60

°C'de ise, tamamen inaktive olan *Klebsiella terrigena* fitazından (Greiner vd., 1997) ve farklı sıcaklıklarda 60 dakika inkübasyonun ardından 0-30 °C arasında aktivitenin tamamını korurken, 50 °C'de aktivitesinin % 30'unu koruyabilen *Aspergillus niger* SK-57 fitazından daha yüksek termal stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir (Nagashima vd., 1999). Quan vd. (2002) *Candida krusei* WZ-001 fitazını farklı sıcaklıklarda 1 saat inkübe ettikten sonra enzimin 20 °C ve altındaki sıcaklıklarda stabil olduğunu, 50 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise aktiviteyi tamamen kaybettiğini belirlemişlerdir. Enzimin 30 µg/mL sığır serum albümini varlığında 1 saat inkübasyonun ardından 40 °C'nin altındaki sıcaklıklarda oldukça stabil olduğu, 50 °C'de aktivitesinin % 40'ını koruyabildiği belirlenmiş ve 70 °C'de tamamen aktivitesini kaybetmiştir. Bunun yanında termal stabilitesi daha yüksek fitaz enzimleri de mevcuttur. Pasamontes vd. (1997) tarafından *A. fumigatus*'dan elde edilen fitaz enziminin sıcaklığa dirençli olduğu ve enzimin 100 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda 20 dakikalık inkübasyonlarda sadece % 10'luk kayıpla aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir. Kim vd. (1998) *Bacillus* sp. DS11 fitazının 5 mM CaCl₂ varlığında inkübasyonun ardından, 90 °C'de 10 dakika başlangıç aktivitesinin % 50'sini, 70 °C'de ise aktivitesinin tamamını koruduğunu bildirmişlerdir. Casey ve Walsh (2003), *A. niger* ATCC 9142 fitazının 80 °C'de ticari fitazlardan daha termal stabiliteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. *S. thermophile* fitazının 60 °C'de 16 saat yarılanma ömrü ile 5 saat inkübasyonun ardından aktivitenin tamamını koruduğu ve 80 °C'de ise yarılanma ömrünün 90 dakika olduğunu bildirmişlerdir (Singh ve Satyanarayana, 2009).



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



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

Tablo 4. 17. *A. niger* fitazının 25 ve 37 °C sıcaklıkta stabilitesi

İnkübasyon Süresi	25 °C Sıcaklık			37 °C Sıcaklık		
	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite
Kontrol	890.51 ± 39.25	a	100	618.98 ± 2.92	a	100
30 dk	877.80 ± 10.68	a	98.57	596.42 ± 6.38	a	96.36
1 saat	863.20 ± 17.14	a	96.93	591.56 ± 8.48	a	95.57
2 saat	854.12 ± 26.80	a	95.91	585.39 ± 12.25	a	94.57
3 saat	834.81 ± 28.25	a	93.75	585.01 ± 11.47	a	94.51
4 saat	830.96 ± 28.88	a	93.31	582.95 ± 3.68	a	94.18
8 saat	826.07 ± 18.01	a	92.76	575.11 ± 5.84	a	92.91
16 saat	795.99 ± 6.38	b	89.39	552.83 ± 8.28	b	89.31
24 saat	782.13 ± 2.45	b	87.83	534.92 ± 6.33	b	86.42

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

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

Tablo 4. 18. *A. niger* fitazının 60, 70 ve 80 °C sıcaklıkta stabilitesi

İnkübasyon Zamanı (dk)	60 °C Sıcaklık			70 °C Sıcaklık			80 °C Sıcaklık		
	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite
Kontrol	806.53 ± 1.12	a	100	883.72 ± 1.46	a	100	362.85 ± 12.50	a	100
5	785.44 ± 1.95	a	97.38	848.34 ± 0.93	a	96.00	252.39 ± 11.04	b	69.56
10	768.92 ± 0.78	a	95.34	813.36 ± 1.12	b	92.04	205.52 ± 4.14	c	56.64
15	765.64 ± 0.73	b	94.93	775.75 ± 1.46	b	87.78	74.13 ± 1.97	d	20.43
30	761.15 ± 0.61	b	94.37	784.43 ± 1.07	b	88.76	22.87 ± 0.84	e	6.30
45	749.17 ± 1.81	b	92.88	765.50 ± 2.34	b	86.62			
60	744.22 ± 0.06	b	92.27	715.80 ± 1.90	c	81.00			
120	740.36 ± 0.44	b	91.79	678.80 ± 2.77	c	76.81			
180	737.74 ± 1.65	b	91.47	643.33 ± 0.97	d	72.80			
240	683.87 ± 1.31	c	84.79	620.35 ± 0.20	d	70.20			
480	673.22 ± 2.19	c	83.47	563.76 ± 3.20	e	63.79			

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

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

4.6.4. Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

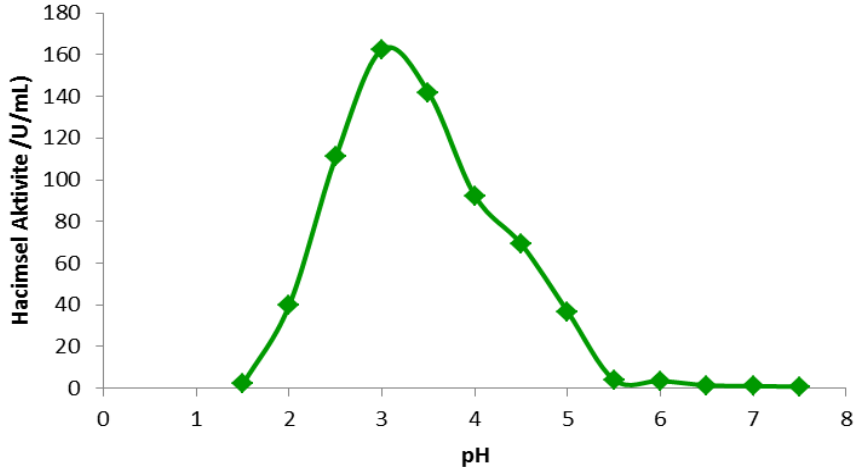
Ham fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisiyle ilgili sonuçlar Tablo 4.13 ve Şekil 4.18'da gösterildi. Enzim aktivitesi pH 1.5'de en düşük değerde (2.03 ± 0.07) olup, pH'daki 0.5 birimlik artışlarla beraber, aktivite doğrusal bir şekilde artarak pH 3.0'de maksimum seviyeye (162.56 ± 8.18) ulaştığı ve pH'nın daha üst seviyelere yükseltilmesiyle, aktivitesinin hızla düştüğü görüldü. pH 7.5'ten itibaren enzim aktivitesi önemli bir düşüş gösterdi. Enzimin pH 3.0'deki maksimum aktivitesi ile diğer tüm pH değerlerindeki aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildiğinde pH 2.5 ve 3.5 değerlerinde aktivite değişimi optimum aktivitenin sırasıyla % 68 ve 87'ini gösterdiği belirlendi.

Tablo 4.19. *A. niger* UA-D ham fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

pH	Hacimsel aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	% Aktivite
1.5	2.03 ± 0.07	a	1.25
2.0	39.94 ± 2.11	b	24.57
2.5	110.95 ± 20.67	c	68.25
3.0	162.56 ± 8.18	d	100.00
3.5	141.87 ± 3.47	e	87.27
4.0	92.30 ± 8.01	fc	56.78
4.5	69.08 ± 1.74	g	42.50
5.0	36.63 ± 3.04	hb	22.53
5.5	4.03 ± 0.10	a	2.48
6.0	3.54 ± 0.04	a	2.18
6.5	1.42 ± 0.08	a	0.87
7.0	1.07 ± 0.07	a	0.66
7.5	0.75 ± 0.03	a	0.46

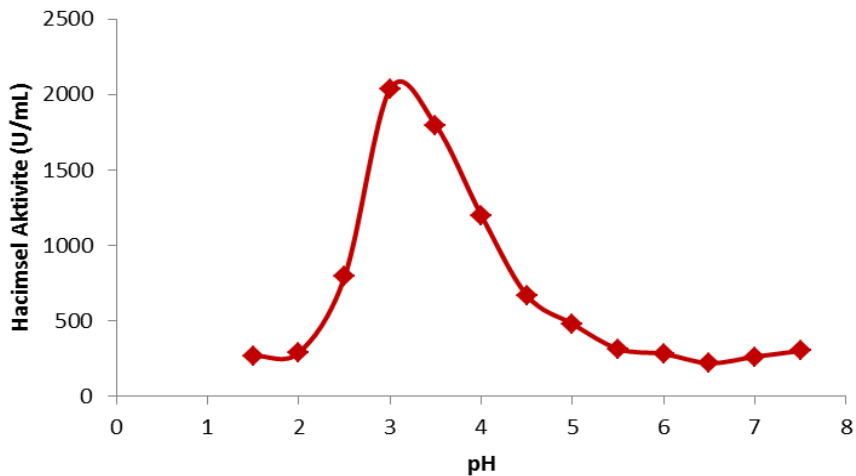
ORT: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır. **S.H.:** Standart hata.

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



Şekil 4. 18. *A. niger* UA-D ham fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisiyle ilgili sonuçlar Tablo 4.14 ve Şekil 4.19'da gösterildi. Enzim aktivitesi pH 1.5'de en düşük değerde (268.45 ± 30.00) olup, pH'daki 0.5 birimlik artışlarla beraber, aktivitenin doğrusal bir şekilde artarak pH 3.0'de maksimum seviyeye (2036.50 ± 43.27) ulaştığı ve pH'nın daha üst seviyelere yükseltilmesiyle, hızla düştüğü görüldü. Enzim pH 7.5'ten itibaren enzim aktivitesi önemli bir düşüş gösterdi. Enzimin pH 3.0'deki maksimum enzim aktivitesi ile diğer tüm pH değerlerindeki enzim aktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildiğinde pH 2.5 ve 3.5 değerlerinde aktivite değişimi optimum aktivitenin sırasıyla % 39 ve 88'ini gösterdiği belirlendi.



Şekil 4. 19. *A. niger* UA-D fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Tablo 4. 20. *A. niger* UA-D fitaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

pH	Hacimsel aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite
1.5	268.45 ± 30.00	a	13.18
2.0	289.48 ± 13.05	a	14.22
2.5	791.56 ± 34.67	b	38.87
3.0	2036.50 ± 43.27	c	100.00
3.5	1796.43 ± 9.03	d	88.21
4.0	1199.51 ± 27.63	e	58.90
4.5	668.29 ± 4.05	f	32.82
5.0	479.32 ± 17.03	g	23.54
5.5	313.87 ± 1.40	a	15.41
6.0	280.62 ± 4.93	a	13.78
6.5	219.79 ± 4.93	a	10.79
7.0	261.96 ± 14.42	a	12.86
7.5	300.89 ± 10.35	a	14.77

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

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

Fitazların optimum pH değerleri pH 2.2-8.0 aralığında değişmektedir. Mikrobiyal fitazların çoğu özellikle fungus kaynaklı olanların optimum pH'ları 4.5-6.0 aralığındadır (Liu vd., 1998). Bazı bakteri kaynaklı fitaz enzimleri ise 6.5-7.5 değer aralıklarında optimum pH'ya sahiptir (Dvořáková, 1998). Optimum pH değerlerinin geniş pH aralığında değişmesinin nedeni, farklı kaynaklardan izole edilen enzimlerin stereospesifliği ya da moleküler konformasyonunun farklı olması olabilir (Vats ve Banerjee, 2004).

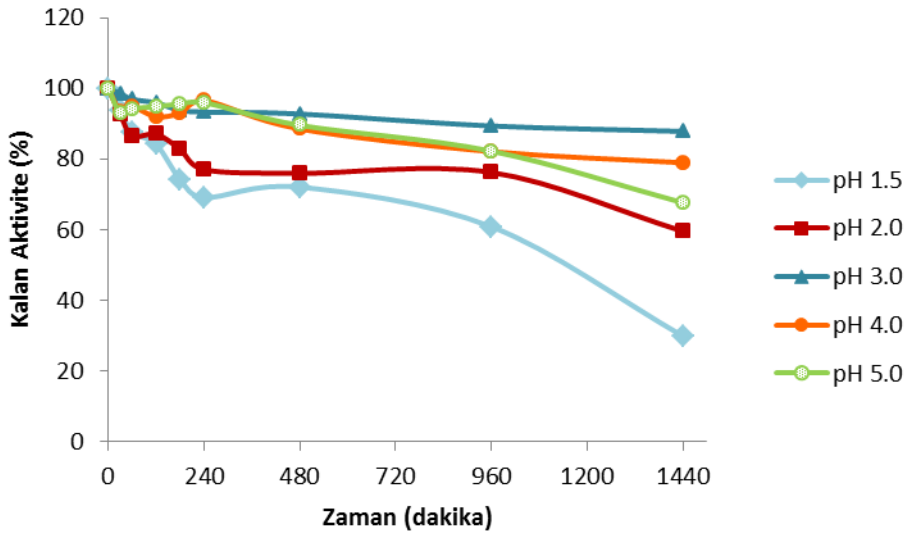
Penicillium caseolicolum (Amano Pharmaceuticals, 1995) ve *Cladosporium sp. FP-1* (Quan vd., 2004),'den elde edilen fitazların maksimum aktivitelerinin pH 3.0'de olduğu saptanmış olup, çalışmamızda kullanılan fitazla benzerlik göstermektedir. Asidik koşullarda optimum aktivite gösteren pH 1.3 ile *Aspergillus ficuum NTG-23* (Zhang vd., 2010), pH 2.1 ile *A. niger* (Gargova vd., 2006), pH 2.5 ile *A. niger* (Vats ve Banerjee, 2002), *A. ficuum* (phyB) (Ehrlich

vd.,1993; Ullah vd.,1987), *Aspergillus niger* van Teigham (Vats ve Banarjee, 2005)'den elde edilen fitaz enzimleri de mevcuttur. Bunun yanında optimum pH'sı 5.0-5.5 *Aspergillus niger* NRRL 3135 fitazı (Ullah ve Gibson, 1987), pH 2.7 ve 5.5 olan *A.niger* IIIAn/8 fitazı (Skowronski, 1978), pH 5.0 olan *A. niger* 92 (Dvořáková vd., 1997), *T. lanuginosus* TL-7 (Gulati vd., 2007c), *Aspergillus niger* NCIM 563 (Mandviwala ve Khire, 2000) fitazı ve pH 5.5 *A. oryzae* fitazı (Shimizu, 1993), pH 4.5 *A. terreus* fitazı (Yamada vd., 1968), pH 5.6 olan *A. carneus* fitazı (Ghareib, 1990) ve pH 4.7 olan *A. carbonarius* fitazı (Al Asheh ve Duvnjak, 1994) mevcuttur. *A. niger* SK57 fitazı çalışmamızda elde edilen verilere paralel olarak pH 7.0'dan sonra denature olarak aktivite kaybettiği bildirilmiştir (Nagashima vd., 1999).

Enzimin optimum pH'sının 3.0 olması, bu enzimin özellikle midede fitat hidrolizi için aktif olabileceğini göstermektedir. Bu sonuç enzimimizin endüstri açısından önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, enzimin özellikle fizyolojik pH aralığı olan pH 2.0-6.5 arasında aktiviteye sahip olması önemlidir. Çünkü enzimin pH'sı 5.0-7.0 olan tükürük salgısında, midede (beslenme durumunda pH 6.5, asit salgısının uyarılması ile pH 3.5-4.5'e kadar düşmektedir) ve pH'sı 4.0-6.0 aralığında olan üst duodenum kısımlarında fitatı kolayca degrade etmesi için aktif olması gerekmektedir (Casey ve Walsh, 2004). Bu durumda enzimin pH 2.0 ve 6.0 azda olsa aktiviteye sahip olması avantaj sağlamaktadır. Aktiviteye sahip olmasının yanında enzimin bu pH aralığında stabil olması da istenilen diğer bir parametredir.

4.6.5. Enzim Stabilitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Enzimin 25 °C'de inkübasyonu süresince belirli aralıklarda örnekler alındı. Enzim stabilitesi üzerine pH'nın etkisinin sonuçları Tablo 4.15 ve Şekil 4.20'da gösterildi.



Şekil 4. 20. *A. niger* UA-D fitaz stabilitesine pH'nın etkisi

Fitaz enziminin pH 1.5'de ilk 30 dakikada aktivitesinin % 94'ünü koruduğu ve kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($p > 0.05$). Fakat 30 dakikadan sonra elde edilen diğer bütün sonuçların kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü ($p < 0.05$). Enzimin 3. ve 4. saatlerde başlangıç aktivitesini sırasıyla % 87 ve 84'ünü koruduğu, aralarındaki farkın ise istatistiksel olarak önemsiz olduğu görüldü. İnkübasyonun 16. saatinde aktivitesinin % 60 oranında büyük ölçüde koruyabilen enzimin 24. saatte aktivitesinin % 70'ini kaybettiği görüldü.

Fitaz enzimi pH 2.0'da ilk iki saatlik inkübasyon sonuçları pH 1.5 stabilize çalışmasında elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Fitazın ilk 30 dakikada aktivitesinin % 92'sini koruduğu ve 30. dakikadan itibaren elde edilen veriler ile kontrol arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü ($p < 0.05$). İnkübasyonun 16. saatinden itibaren enzim aktivitesinin % 75'inden fazlasını, 24 saat sonra ise aktivitesinin % 59'unu koruduğu saptandı.

Tablo 4. 21. *A. niger* UA-D fitaz stabilitesine pH'nın etkisi

İnkübas yon Zamanı	pH 1.5			pH 2.0			pH 3.0			pH 4.0			pH 5.0		
	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ±S.H.)	x	% Aktivite
Kontrol	890.51 ± 39.25	a	100	890.51 ± 39.25	a	100	890.51 ± 39.25	a	100	940.35 ± 29.18	a	100	940.35 ± 29.18	a	100
30 dk	833.41 ± 6.62	ab	93.59	824.01 ± 2.45	b	92.53	877.80 ± 10.68	a	98.57	878.67 ± 32.36	a	93.44	873.32 ± 32.36	a	92.87
1 saat	780.54 ± 1.95	b	87.65	770.80 ± 25.30	bc	86.56	863.20 ± 17.14	a	96.93	891.65 ± 16.06	a	94.82	886.29 ± 16.06	a	94.25
2 saat	749.07 ± 16.92	b	84.12	775.02 ± 8.28	bc	87.03	854.12 ± 26.80	a	95.91	865.04 ± 57.94	a	91.99	892.13 ± 11.69	a	94.87
3 saat	660.18 ± 37.39	c	74.13	736.74 ± 1.95	cd	82.73	834.81 ± 28.25	a	93.75	875.10 ± 31.46	a	93.06	899.27 ± 24.83	a	95.63
4 saat	615.09 ± 11.22	c	69.07	685.81 ± 23.85	cd	77.01	830.96 ± 28.88	a	93.31	908.19 ± 2.97	a	96.58	902.84 ± 2.97	a	96.01
8 saat	641.69 ± 46.24	c	72.06	676.39 ± 27.41	d	75.95	826.07 ± 18.01	a	92.76	832.60 ± 28.22	a	88.54	842.17 ± 24.74	a	89.56
16 saat	541.77 ± 6.48	d	60.84	678.80 ± 2.77	d	76.23	795.99 ± 6.38	b	89.39	772.22 ± 10.85	bb	82.12	773.40 ± 10.85	b	82.25
24 saat	265.698 ± 6.81	e	29.84	530.09 ± 10.94	e	59.53	782.13 ± 2.45	b	87.83	742.48 ± 3.51	c	78.96	635.77 ± 6.48	c	57.61

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

Fitaz enzimi pH 3.0'da ilk 30 dakikada aktivitesinin % 98'ini koruduğu ve 8. saate kadar kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($p>0.05$). İnkübasyonun 16. saatinden itibaren enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak azalma göstermesine rağmen, 24 saat sonra aktivitesinin % 87'sini koruduğu saptandı.

Fitaz enzimi pH 4.0'da inkübasyonuna bırakıldığında ilk 4 saatte aktivitesinin % 96'sını koruduğu, 8. saate ise aktivitesinin % 85'den fazlasını koruduğu ve 8. saate kadar kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($p>0.05$). İnkübasyonun 16. saatinde itibaren enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak azalma göstermesine rağmen, 16. ve 24. saatlerde sırasıyla başlangıç aktivitesinin % 82 ve 78'ini korumuştur.

Fitaz enzimi pH 5.0'da inkübasyonuna bırakıldığında ilk 4 saatte aktivitesinin % 96'sını koruduğu, 8. saate ise aktivitesinin yaklaşık % 90'ını koruduğu ve 8. saate kadar kontrol ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($p > 0.05$). İnkübasyonun 16. saatinde itibaren enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak azalma göstermesine rağmen, 16. ve 24. saatlerde sırasıyla başlangıç aktivitesinin % 82 ve 57'ini korumuştur.

Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae XY-5 fitazının pH 3.0'den 5.0'e kadar oldukça stabil olduğu, pH 2.0'de ise enzimin orijinal aktivitesinde % 20 kayıp olduğu belirlenmiştir. Enzim pH 6.0 ve üzerindeki değerlerde ise aktivitesinin tamamını kaybetmiştir (Wang vd., 2004). *Aspergillus oryzae* AK9 mikroorganizmasından elde edilen ham fitaz enzimi 2.0-3.6 ile 5.0-7.0 pH aralıklarında 2 saat boyunca stabildir (Chantasartrasamee vd., 2005).

Klebsiella terrigena fitazı pH 7.5'in üzerindeki pH değerlerinde inaktif iken 3.0-9.0 pH aralığında 4 °C'de 10 gün boyunca aktivite kaybetmemiştir. Fakat pH 2.0 ve pH 1.0'de 24 saat inkübasyonun ardından başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 45 ve % 85'ini kaybetmiştir (Greiner vd., 1997). *Penicillium simplicissimum* W46 fitazı optimum pH'ı 4.0 olan enzimin pH 7.5 ve üzerindeki değerlerde ise inaktif olduğu saptanmıştır. Enzimin pH 3.5-6.0 aralığında 7 gün stabil olduğu belirlenmiştir. *Candida krusei* WZ-001 fitazı pH 2.0-5.0 aralığında aktivitesinin % 80'ini koruyarak stabil olduğu bildirilmiştir (Quan vd., 2002). Kim vd. (2003) *Citrobacter braakii* YH-15'in fitazı farklı tamponlarda 37 °C'de 7 gün boyunca inkübe edilen enzim pH 3.0-5.0 arasında aktivitesinin % 50'den fazlasını

korumuştur. *Aspergillus niger* van Teigham fitazı pH 2.0-7.0 aralığında 24 saat boyunca aktivitesinin tamamını koruyabilmiştir (Vats ve Banerjee, 2005).

4.6.6. Enzim Aktivitesi Üzerine İnkübasyon Süresinin Etkisi

Enzim ve substrat farklı zaman aralıklarında inkübasyona bırakıldıklarında ilk 30 dakikada enzim aktivitesi zamana bağlı olarak doğrusal artmaktadır (Şekil 4.21 ve Tablo 4.16). Ancak zamanın artışı ile enzim aktivitesi doğrusallıktan sapmaktadır. Bu nedenle standart enzim aktivite deneyleri 30 dakikalık inkübasyonlarda yapılmıştır.

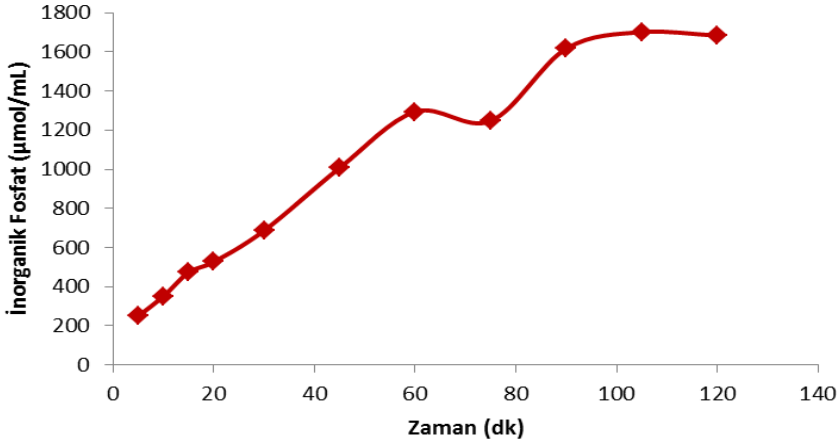
Tablo 4. 22. *A. niger* UA-D fitaz aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

Zaman (dk)	İnorganik Fosfat ($\mu\text{mol/mL}$) (ORT. \pm S.H.)	x
5	246.79 \pm 25.46	a
10	352.31 \pm 19.39	ab
15	475.43 \pm 22.50	bc
20	562.77 \pm 10.54	c
30	743.07 \pm 1.69	d
45	1122.14 \pm 3.87	e
60	1302.19 \pm 9.72	e
75	1254.99 \pm 26.04	e
90	1627.25 \pm 69.84	f
105	1711.92 \pm 62,22	f
120	1694.40 \pm 16.74	f

ORT.: Her veri üç tekrarın ortalamasıdır.

S.H.: Standart hata.

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



Şekil 4. 21. *A. niger* UA-D fitaz aktivitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi

Enzim aktivitesinin ölçülmesinde zaman önemli bir faktördür. Reaksiyon hızı belirli bir zamanda üretilen ürün miktarı ile belirlenir. Bu nedenle oluşan ürünün lineer olduğu bir noktada enzim aktivitesinin tayininin yapılması aktivite tayininin doğru tespiti için önemlidir. Çalışmamızda özellikle ilk 30 dk oluşan ürün miktarının zamana bağı olarak doğrusal olarak artmasından dolayı inkübasyon süresi olarak seçilmiştir. Ullah (1988) tarafından *Aspergillus ficuum* ve Staden vd. (2007) *Cryptococcus laurentii* ABO510 fitazının aktivite tayininde inkübasyon süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir. *Pichia anomala* fitazının aktivite tayininde ise inkübasyon süresi 15 dakika olarak optimize edilmiştir (Vohra ve Satyanarayana, 2004).

4.6.7. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Fitaz aktivitesi üzerine substratın konsantrasyonunun etkisi saptamak amacıyla, 0.1-1 M arasındaki konsantrasyonlarda sodyum fitat optimum sıcaklık ve pH'da (70 °C ve pH 3.0) belirlenen inkübasyon süresinde ortama ilave edilerek enzim aktivitesi standart deney koşullarında ölçüldü (Tablo 4.17). Substrat konsantrasyonunun 0.1 mM'dan 1mM'a kadar belli bir oranda artırılması ile enzim aktivitesinin kademeli olarak arttığı görüldü. Substrat konsantrasyonuna karşı enzim aktivite grafiği çizildiğinde enzimin Michaelis-Menten kinetiği izlediği görülmektedir (Şekil 4.22). Fitazın maksimum hızını (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitesini (K_m) saptamak için, $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ olarak Lineweaver-Burk $y = ax + b$ doğru grafiğinden yararlanıldı. Lineweaver-Burk grafiği, $1/V$ 'ye karşı

$1/[S]$ olarak çizildi (Şekil 4.23). Bu grafikten elde edilen doğrunun denklemi ise, $y = 3.3217x + 0.0184$ olarak, tamamlayıcılık katsayısı (R^2) ise 0.9948 bulundu.

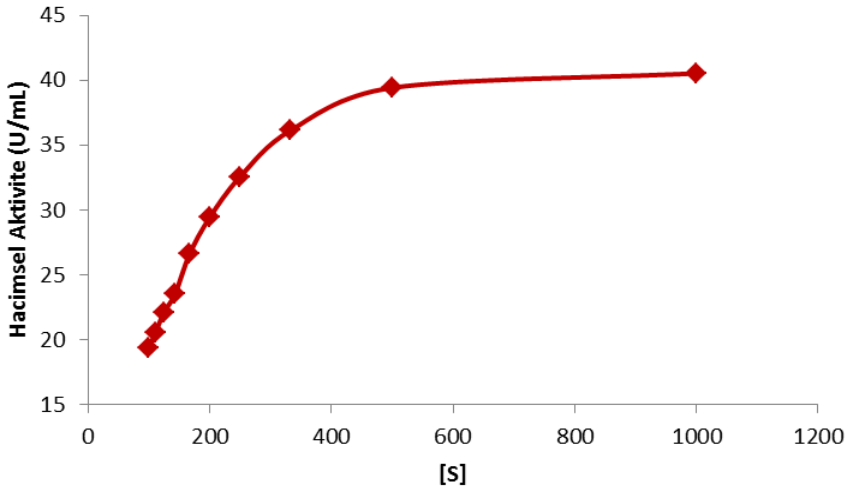
Denklemden doğrunun dikey eksenini kestiği nokta $1/V_{max} = 0,0184$ değerini verdiğinden, V_{max} değeri 54.35 U/mL olarak hesaplandı. Doğrunun yatay eksenini kestiği nokta ise, $-1/K_m = -0.00554$ değerinde olup, K_m değeri 180 μ M olarak bulundu.

Tablo 4. 23. *A. niger* UA-D fitaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

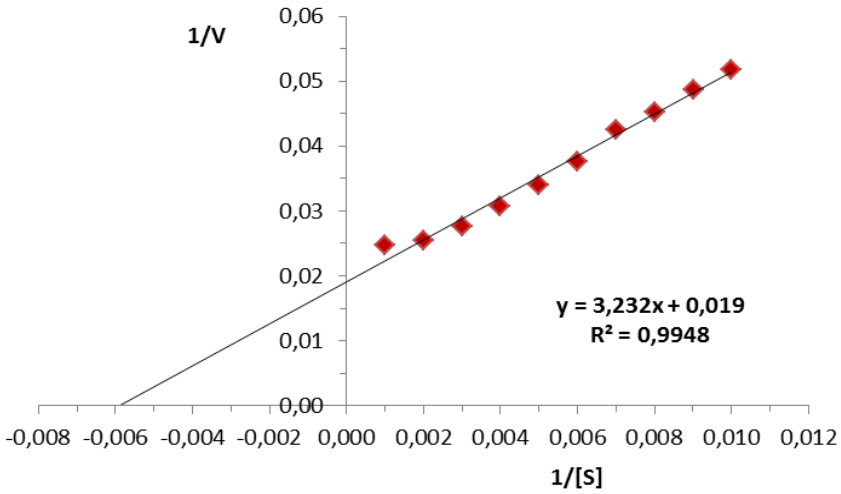
Substrat Konsantrasyonu (μ M)	Hacimsel aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x
100	193.19 \pm 3.80	a
111	205.84 \pm 0.00	a
125	221.41 \pm 0.49	ab
143	235.52 \pm 1.75	ab
167	266.67 \pm 0.49	bc
200	294.89 \pm 4.69	bc
250	326.52 \pm 3.41	cd
333	362.53 \pm 4.16	d
500	395.62 \pm 19.71	d
1000	406.81 \pm 22.81	d

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

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



Şekil 4. 22. *A. niger* UA-D fitaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Michaelis-Menten Grafiği)



Şekil 4. 23. *A. niger* UA-D fitaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk Grafiği)

Reaksiyon hızı başlangıçta substrata bağlı olarak önce lineer bir artış gösterdi, sonra hiperbolik bir şekil aldığı gözlemlendi. Hız, substrat konsantrasyonu artışı ile artarak, maksimuma ulaştı. Substrat konsantrasyonu 500 μm 'dan sonra substratın daha fazla arttırılması ile enzimatik reaksiyonun hızı arttırılamaz, enzim substratına karşı doymuş hale gelmiştir ve maksimum hız ile çalışır. *A. niger* UA-

D'nin fitaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun (sodyum fitat) etkisi incelendiğinde, enzimatik reaksiyon birinci dereceden (first-order) bir kinetik gösterdiği belirlendi. Ancak, belli bir substrat konsantrasyonundan sonra aktivitenin artık daha fazla artmadığı ve sabit kaldığı görüldü. Bu da enzimin substratına karşı doymuş hale geldiğini ve maksimum hızla çalıştığını göstermektedir. Bu durumda enzimatik reaksiyon sıfırıncı dereceden (zero-order) bir kinetik göstermiştir.

Genel olarak, fitazların enzimatik hidroliz hızı klasik bir Michaelis-Menten kinetiği gösterir, yani, serbest kalan inorganik fosfor miktarı kullanılan substrat konsantrasyonu bağlıdır (Vats ve Banerjee, 2004)

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında K_m değeri 180 μM olan fitazın, K_m değeri 18.7 μM olan *A. niger* SK57 fitazı (Nagashima vd., 1999), K_m ve k_{cat} değeri sırasıyla 54 μM , 190 s^{-1} olan *Aspergillus niger* 11T553A9 (Greiner vd., 2009), K_m değeri 0.125 mM olan *Yersinia intermedia* fitazından (Huang vd., 2006), K_m değeri 27 μM olan *A. ficuum* (Wodzinski ve Ullah, 1996) fitazından yüksektir ve bu enzimlere göre substratı olan sodyum fitata ilgisi düşüktür. Fakat K_m ve k_{cat} değeri sırasıyla 300 μM ve 180 s^{-1} olan *Klebsiella terrigena* fitazı (Greiner vd., 1997), K_m ve V_{max} değeri sırasıyla 0.526 mM ve 12.3 $\mu\text{mol/dk/mg}$ olan *Bacillus laevolacticus* fitazından (Gulati vd., 2007a), ise düşük olup bu enzimlere göre daha düşük substrat konsantrasyonlarında bile aktiftir.

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

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini incelemek için, enzim 1 mM, 5 mM ve 10 mM final konsantrasyonlarda AlCl_3 , BaCl_2 , CaCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 , FeCl_3 , KCl , LiCl , MgCl_2 , MnCl_2 , $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$, NaCl , NH_4Cl , NiCl_2 , PbCl_2 , ZnCl_2 metal iyonları ve EDTA içeren deney ortamları standart deney koşulların aktivite tayini yapıldı. Deney gruplarının kontrole göre aktivite değişimleri % değer olarak belirlendi (Tablo 4.18, Şekil 4.24).

Al^{3+} 'ün 1, 5 ve 10 mM artan konsantrasyonlarında enzim aktivitesinde inhibisyona neden olmuştur, inhibisyon derecesi sırasıyla % 52, 9 ve 11 olarak ölçüldü. Kontrol grubuyla aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Çalışmamızda elde edilen verilere benzer şekilde *Cladosporium* sp. FP-1 fitazı 1 mM Al^{3+} varlığında aktivitesinin ancak % 50'ini koruyabilmiştir (Quan vd., 2004).

Ancak bazı fitaz enzimlerinde aktiviteyi arttırıcı etkisi vardır. *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* XY-5 fitazı metal iyonları içermeyen ortam ile karşılaştırıldığında 5 mM Al^{3+} tarafından aktive edilmesi enzim ile metallerin etkileşimi sonucu enzim konformasyonundaki değişimlerin enzimi daha aktif bir hale getirmiş olabileceği şeklinde açıklanmıştır (Wang vd., 2004).

Pb^{2+} enzim aktivitesi üzerindeki değişimleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Pb^{2+} enzim aktivitesinde ciddi inhibisyona neden olmuş 1 mM konsantrasyonunda dahi aktivitede % 50 azalmaya neden olmuştur. Enzim 5 ve 10 mM konsantrasyonlarında Pb^{2+} varlığından aktivitesinin ancak sırasıyla % 20 ve 13'ünü koruyabilmiştir. Çalışmamızda elde edilen verilere benzer şekilde *Cladosporium* sp. FP-1 fitazı Pb^{2+} varlığında tamamen inhibe olduğu bildirilmiştir (Quan vd., 2004). *Pichia anomala* fitazı ve *Candida krusei* WZ-001 fitazı aktivitesi üzerine Pb^{2+} iyonunun bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Vohra ve Satyanarayana, 2002; Quan vd., 2002). *Selenomonas ruminantium* JY35 fitazının aktivitesi üzerinde 5 mM Pb^{2+} varlığında enzim aktivitesinde yaklaşık % 50 bir artış gözlenmiştir (Yanke vd., 1999). Bu metal iyonlarının fitazın substrat bağlama bölgesine ve katalitik merkezinde görev alan amino asitlerle etkileşerek katalitik bölge ve substratın arasındaki elektriksel dengenin bozulması sonucu inhibisyona neden olduğunu, ayrıca yapıya katılarak enzimin üç boyutlu yapısını değiştirdiğini veya substrata bağlanarak reaksiyon için substratın doğru yönelimini etkilediğini düşünmekteyiz.

Fe^{2+} 'nin 1 mM varlığında dahi enzim tamamen inhibisyona uğramış, hiç aktivite belirlenemedi. Enzim aktivitesinde yaşanan inhibisyonun enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen Fe-fitat kompleksinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Oluşan kompleks sonucu enzimin kullanabileceği fitat miktarı azaldığı için enzim aktivitesi azalabilir. Bu düşünce Wang vd. (1980) tarafından fitaz aktivitesi üzerine mineral iyonların inhibisyon etkisi fitatın güçlü bir şelatlayıcı olmasından dolayı çözünmez metal-fitat kompleksleri oluşur ve böylece enzim tarafından kullanılabilen fitat miktarı azalır açıklaması ile desteklenmektedir. Reaksiyonun gerçekleştiği pH'ya ve metal iyonunun konsantrasyonuna bağlı olarak fitat metal ile kompleks oluşturmayan formda ya da fitat-metal kompleksi şeklinde bulunabilir (Maenz vd., 1999). Metal iyonlarının fitaz aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde farklı enzimlerde farklı sonuçlar elde edilmiştir. Fe^{2+} iyonu *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 (Ullah, 1988) ve *Penicillium simplicissimum*

(Tseng vd., 2000) fitaz enzimleri üzerinde inhibisyona neden olurken *Aspergillus ficuum* NTG-23 fitazının 10 mM'a kadar Fe^{3+} kationunun aktivite üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Zhang vd., 2010).

Ba^{2+} iyonunun 1 mM'lık konsantrasyonunda enzim aktivitesinde fazla etkisinin olmadığı, kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p>0.05$). Ba^{2+} iyonunun 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarında enzim aktivitesinde artış görüldü ve kontrol ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu. Ba^{2+} iyonların enzim yapısı ve substrat ile etkileşime girmediği veya yapıya katılmış olsalar dahi üç boyutlu yapıyı değiştirmedeğini düşünmekteyiz. Sonuçlarımıza benzer olarak *Pichia anomala* (Vohra ve Satyanarayana, 2002) ve *Candida krusei* WZ-001 (Quan vd., 2002) fitaz enzimlerinin aktivitesi üzerine 1 mM Ba^{2+} kationunun bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Buna karşın *Bacillus* sp. KHU-10 fitazı ile yapılan araştırmada Ba^{2+} varlığında başlangıç aktivitesine göre aktivitesinde % 65 inhibisyon gözlenirken (Choi vd., 2001), *Cladosporium* sp. FP-1 fitazı Ba^{2+} fitazının ise tamamen inhibe olduğu bildirilmiştir (Quan vd., 2004).

Ca^{2+} ve Co^{2+} iyonunun 1 ve 5 mM'lık konsantrasyonları aktiviteyi arttırmış ve kontrol grubu ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.05$). Ca^{2+} ve Co^{2+} iyonunun 10 mM'lık konsantrasyonunda aktivitede azalma gözlemlendi, kontrol grubu ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.05$). Bu metal iyonları fitazın substrat bağlama bölgesine ve katalitik merkezinde görev alan amino asitlerle etkileşerek inhibisyona neden olduğunu, ayrıca yapıya katılarak enzimin üç boyutlu yapısını değiştirdiğini veya substrata bağlanarak reaksiyon için substratın doğru yönelimini etkilediğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar *Pichia anomala* fitazı ile yapılan çalışma ile benzerlik göstermektedir. *Pichia anomala* fitazının aktivitesi üzerine 1 mM Co^{2+} ve Ca^{2+} kationlarının bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Vohra ve Satyanarayana, 2002). Elde edilen veriler Greiner vd. (1997) tarafından yapılan çalışmada *Klebsiella terrigena* fitazının Ca^{2+} varlığında aktivitesini büyük oranda korunmasıyla da desteklenmektedir. Benzer şekilde *Penicillium simplicissimum* W46 10 mM Ca^{2+} varlığında önemli ölçüde inhibe olmadığı bildirilmiştir (Tseng vd., 2000). Buna karşın *Bacillus* sp. KHU-10 fitazı ile yapılan araştırmada çift değerlikli metal iyonu olan Co^{2+} varlığında aktivitesinde % 40 düşüş gözlenmiştir (Choi vd., 2001). *Aspergillus niger* ATCC 9142 fitazı 200 mM Ca^{2+} iyonu inhibisyona neden olmuştur (Casey ve Walsh, 2003).

Cu^{2+} iyonunun konsantrasyonunun artışıyla fitaz aktivitesi azalmış ve kontrol grubuyla aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Elde edilen sonuçlarımıza benzer şekilde *Citrobacter braakii* fitazı çok düşük konsantrasyonlarda bile, Cu^{2+} katyonunun enzimi güçlü bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur (Kim vd., 2003). Buna karşın *Aspergillus niger* ATCC 9142 fitazı 200 mM Cu^{2+} iyonları tarafından stimüle edildiği bildirilmiştir (Casey ve Walsh, 2003).

Li^+ bütün konsantrasyonlarında enzim aktivitesi üzerinde neredeyse aynı etkiyi göstermiş ve enzim aktivitesinde meydana gelen bu artışın kontrol ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p > 0.05$). Elde edilen verilerimize benzer şekilde *Cryptococcus laurentii* ABO 510'dan elde edilen fitazın 1 mM ve 5 mM Li^+ varlığından etkilenmediği belirlenmiştir (Staden vd., 2007).

Mg^{2+} , Mn^{2+} ve Zn^{2+} iyonu 1mM konsantrasyonunda enzim aktivitesinde sırasıyla % 30, 50 ve 31 oranında aktive ederken, artan konsantrasyonlarda inhibisyona neden olup 5 ve 10 mM konsantrasyonlarında geriye kalan enzim aktivitesi sırasıyla Mg^{2+} için % 113 ve 76, Mn^{2+} için % 88 ve 50, Zn^{2+} için % 50 ve 11 olarak ölçüldü. Kontrol grubuyla aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Bu iyonların diğer fitaz enzimleri üzerindeki etkileri değişmektedir. *Klebsiella terrigena* fitazının Mg^{2+} iyonlarının aktivite üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı, Mn^{2+} iyonlarına karşı aktivitesini büyük oranda koruduğu ve Zn^{2+} iyonları tarafından kuvvetle inhibe edildiği bildirilmiştir (Greiner vd., 1997). Kim vd. (1998) *Bacillus* sp. DS11 fitazının Mn^{2+} , önemli ölçüde inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Enzimin (5mM) varlığında aktivitesinin yaklaşık % 50'sini koruduğunu belirlemişlerdir.

$\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$ 1 mM'lık konsantrasyonunda aktivitenin % 66'sını koruduğu görülmüş ve kontrol grubuyla arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p < 0.05$). 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonunda aktivitesi ise renk reaktifi ile muamelesi sonu oluşan turuncu renkten dolayı saptanamadı. Ortamda aşırı miktarda $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$ varlığının renk reaktifi ile reaksiyona girip molibden mavisinin oluşumunu engellediği düşünülmektedir.

Na^+ ve NH_4^+ iyonlarının her üç konsantrasyonunda enzim aktivitesinde aktivasyona neden olduğu ancak Na^+ için bu değişimin önemli bir değişiklik

olmayıp, kontrol ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunurken ($p>0.05$), NH_4^+ için değişimin önemli olup kontrol ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.05$). Elde edilen sonuçlarımıza paralel olarak *Citrobacter braakii* fitazının 10 mM'a kadar Na^+ kationunun aktivite üzerine bir etkisinin olmadığı bulunmuştur (Kim vd., 2003).

Ni^{2+} iyonunun 1 ve 5 mM'lık konsantrasyonunda sırasıyla % 22 ve % 24 aktivasyona neden olup aktivitedeki değişim ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p>0.05$). Ni^{2+} iyonunun 10 mM'lık konsantrasyonlarında enzim aktivitesinde bir azalma görölmüş ve kontrol ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$). Benzer sonuçlar *Citrobacter braakii* fitazının metal iyonları ile 37 °C'de 2 saat inkübasyonun ardından 10 mM'a kadar Ni^{2+} kationunun aktivite üzerine bir etkisinin olmadığı bulunmuştur (Kim vd., 2003). *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* XY-5 fitazı Ni^{2+} iyonu tarafından önemli miktarda inhibisyona uğramamıştır (Wang vd., 2004).

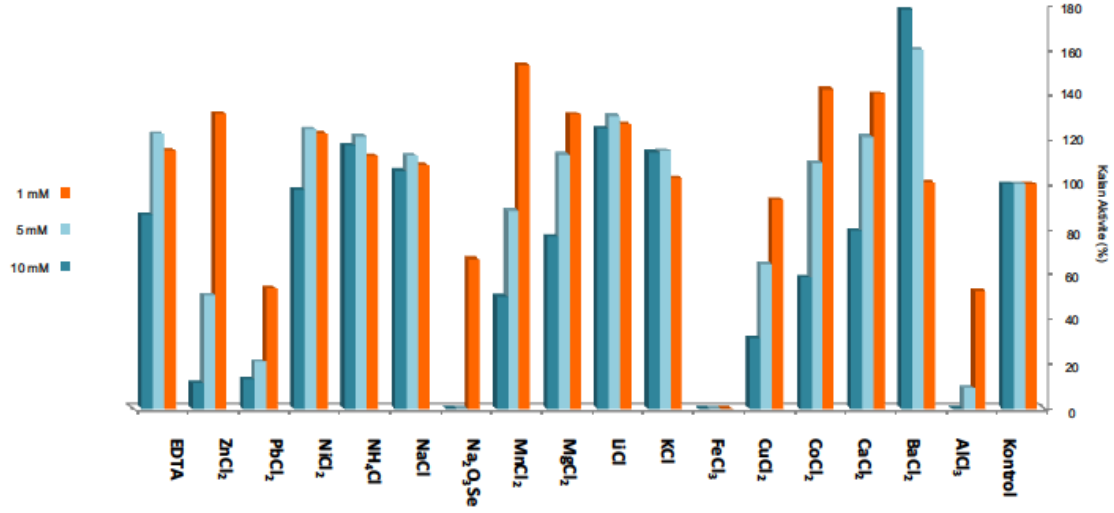
EDTA 1 ve 5 mM'lık konsantrasyonlarında aynı oranlarda enzimi aktive ettiği, aktivitede sırasıyla yaklaşık % 15 ve 22 oranında artışa neden olduğu belirlendi. 10 mM'lık konsantrasyonunda ise aktivitenin % 86'sının korunduğu ve kontrol grubu ile aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu göröldü. Bir metal tutucu ajan olan EDTA'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde elde edilen sonuçların fitaz enziminin bir metalloenzim olmadığı düşüncesini akla getirmektedir. Çünkü enzim EDTA tarafından yüksek konsantrasyonlarda bile tamamen inhibe olmadı. Bu durumda bazı metal iyonlarının aktiviteyi arttırmış olması, bu metal iyonlarının katalitik bir mekanizmada rol almaktan çok, yapısal bir role sahip olduklarını göstermektedir. Ayrıca, EDTA enzim aktivitesinde azda olsa artışa neden olması, reaksiyon ortamında enzim aktivitesini azaltan muhtemel metalleri bağlayarak enzimin aktivitesinde artışa neden olmuş olabileceğini düşünmekteyiz.

Tablo 4. 24. *A. niger* fitaz aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA' nın etkisi

Metal İyonları	1mM			5mM			10mM		
	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite
Kontrol	640.88 ± 6.58	a	100.00	640.88 ± 6.58	a	100.00	640.88 ± 6.58	a	100.00
AlCl ₃	335.28 ± 19.71	b	52.32	58.39 ± 0.84	b	9.11	0.00 ± 0.00	b	0.00
BaCl ₂	644.77 ± 38.69	a	100.61	1023.36 ± 37.42	b	159.68	1137.71 ± 13.09	b	177.52
CaCl ₂	897.81 ± 10.22	b	140.09	774.21 ± 9.09	b	120.80	507.06 ± 10.13	b	79.12
CoCl ₂	909.49 ± 30.14	b	141.91	699.76 ± 5.92	b	109.19	373.24 ± 3.98	b	58.24
CuCl ₂	595.62 ± 8.13	b	92.94	411.68 ± 3.37	b	64.24	200.49 ± 2.96	b	31.28
FeCl ₃	0.00 ± 0.00	b	0.00	0.00 ± 0.00	b	0.00	0.00 ± 0.00	b	0.00
KCl	657.42 ± 9.28	a	102.58	734.31 ± 21.96	a	114.58	729.44 ± 24.08	a	113.82
LiCl	811.19 ± 5.13	b	126.58	833.57 ± 3.37	b	130.07	797.57 ± 10.16	b	124.45
MgCl ₂	838.93 ± 33.78	b	130.90	725.06 ± 11.96	b	113.14	490.51 ± 7.35	b	76.54
MnCl ₂	979.08 ± 13.65	b	152.77	563.02 ± 3.51	b	87.85	319.22 ± 2.43	b	49.81
Na ₂ O ₃ Se	425.30 ± 2.71	b	66.36	-	-	-	-	-	-
NaCl	693.43 ± 1.69	a	108.20	721.17 ± 26.64	a	112.53	677.86 ± 21.63	a	105.77
NH ₄ Cl	719.71 ± 17.66	b	112.30	774.70 ± 6.55	b	120.88	749.88 ± 7.60	b	117.01
NiCl ₂	783.94 ± 7.35	b	122.32	796.11 ± 9.09	b	124.22	623.84 ± 3.19	b	97.34
PbCl ₂	291.97 ± 15.57	b	53.54	112.90 ± 3.89	b	20.70	70.72 ± 2.45	b	12.97
ZnCl ₂	840.39 ± 21.69	b	131.13	323.11 ± 4.87	b	50.42	72.51 ± 0.97	b	11.31
EDTA	735.28 ± 19.48	b	114.73	782.48 ± 3.04	b	122.10	552.31 ± 2.71	b	86.18

ORT: Her veri üç tekrarı ortalamasıdır.

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



Şekil 4. 24. *A. niger* UA-D fitaz aktivitesi üzerine metal iyonları ve EDTA'nın etkisi

Metal iyonlarının fitazlar üzerine etkisini incelemek için yapılan çalışmalar sonucunda etki düzeylerinin çok farklı olduğu bulundu. Bunlardan bazıları enzim aktivitesini arttırırken, bazıları inhibe etmiş veya hiç etkilemedi. Metal iyonlarının aktivite üzerine etkileri enzimlerin izole edildiği kaynaklara göre farklıdır.

4.6.9. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin ve Denatürantların Etkisi

İnhibe edici ajanlar ve denatürantların enzim aktivitesi üzerine etkisini Tablo 4.19 ve Şekil 4.25’de görülmektedir.

En büyük inhibisyon bir protein denatürantı olan SDS ve triptofan inhibitörü olan NBS kullanıldığında görüldü. SDS ve NBS’nin 1 ve 5 mM konsantrasyonlarında % 90 oranında inhibisyon görüldü. Bu sonuç enzimin aktif merkezinde katalizden sorumlu bir triptofan amino asidinin olabileceğini düşündürmektedir. Elde edilen sonuçlarımıza benzer şekilde *Pichia anomala* fitazı da SDS’ye karşı çok fazla dayanıklı olmayan bir enzimdir, % 0.1’lik SDS tarafından kuvvetle inhibe edilmiştir. Ancak N-bromosüksinamid varlığının enzim aktivitesi üzerinde bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Vohra ve Satyanarayana, 2002). Gulati vd. (2007b) tarafından *Mucor indicus* MTCC 6333 fitazının 5 mM SDS varlığında enzim aktivitesinde % 20 oranında inhibisyona neden olduğunu bildirmişlerdir.

Serin inhibitörü olan PMSF 1 mM konsantrasyonda enzim aktivitesi üzerinde yaklaşık % 60 oranında inhibisyona yol açarken, 5 mM konsantrasyonda yaklaşık % 90’lık bir inhibisyona neden olduğu görüldü. Bu sonuç enzimin aktif merkezinde triptofanın yanında serin amino asidinin de olabileceğini düşündürmektedir. PMSF’nin *Candida krusei* WZ-001 fitazının enzim aktivitesi üzerinde önemli bir inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir ve çalışmamızda elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir (Quan vd., 2002). Buna karşın *Klebsiella terrigena* fitazı 15 dakika 35 °C’de 10^{-4} - 10^{-3} M PMSF varlığında önemli bir ölçüde inhibe olmuştur (Greiner vd., 1997). *Bacillus* sp. DS11 fitazının (Kim vd., 1998) 1mM ve 5 mM konsantrasyonların, *Penicillium simplicissimum* W46 fitazının (Tseng vd., 2000) ise 10 mM serin inhibitörü PMSF tarafından inhibe edilmediği bildirilmiştir.

Sülfidril redükleyici ajan olan DTT, β -merkaptolanol, askorbik asit ve IAA enzimde ne aktivitede artışa neden oldular, ne de aktivite üzerine önemli bir

inhibisyona neden olmadılar. Sistein spesifik inhibitörü ve sülfidril oksitleyici bir ajan olan DTNB'nin ise, 1 ve 5 mM konsantrasyonları fitaz aktivitesinde sırasıyla % 30 ve 94'lük bir inhibisyona neden oldu ve kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p > 0.05$). Bu sonuçlara göre, *A. niger* UA-D fitazının enzimin DTNB tarafından inhibe olması, katalitik merkezinde sistein amino asitinin katalitik işlemde önemli rol oynadığını göstermektedir. Ancak enzim üç boyutlu yapısında önemli rol oynayan disülfid köprülerinin DTT, β -merkaptetanol, askorbik asit ve IAA tarafından redüklenmesi, enzime bir esneklik kazandırarak, enzim aktivitesinde bir artışa neden olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda enzimin substrat spesifikliği ve pH profili incelendiğinde, PhyB fitazı özelliği göstermesine rağmen, yapısal konformasyon açısından *Aspergillus niger* ve *Aspergillus fumigatus* PhyA ile benzerlik gösterdiği ileri sürülebilir. Çünkü *Aspergillus niger* ve *Aspergillus fumigatus* PhyA'da mevcut 10 sistein kalıntısı, disülfid köprülerin oluşumunda yer almaktadır. Disülfid köprülerinin kaldırılmasının çalışma alanının esnekliğinin artmasına izin verdiği ve dolayısıyla, enzimin katalitik etkinliğinin artmasını sağladığı ileri sürülmüştür (Lei vd., 2007). Bu çalışmanın bizim sonuçlarımızla benzer olduğu görülmektedir. *A. niger* UA-D fitazından elde edilen sonuçlarımıza benzer şekilde *Citrobacter braakii* fitazının 2-merkaptetanol ve DTT tarafından inhibe edilmediği bildirilmiş ve bu nedenle enzimin aktivitesinde molekül içi disülfid köprülerinin etkisinin olmadığı ileri sürülmüştür (Kim vd., 2003). Buna karşın *Candida krusei* WZ-001 fitazının sülfidril grubu inhibitörleri olan pCMB ve iyotasetat tarafından inhibe edildiği fakat 2-merkaptetanol ve DTT tarafından ise stimüle edilmesi enzimin aktif merkezinde -SH gruplarının bulunduğunu göstermektedir şeklinde açıklanmıştır (Quan vd., 2002).

Arjinin inhibitörü olan 2,3-bütandionun 1 ve 5 mM konsantrasyonlarında sırasıyla fitaz enziminin, aktivitesinin yaklaşık % 83 ve 89'unu kaybettiği ve kontrol grubu ile aralarındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu bulundu ($p < 0.05$). Bu sonuç enzimin aktif merkezinde katalizden sorumlu bir arjinin amino asidinin olabileceğini düşündürmektedir. Elde edilen sonuçlarımıza benzer şekilde *Pichia anomala* fitazının (Vohra ve Satyanarayana, 2002) ve *A. ficuum* fitazının (Tang vd., 2006) 2,3-bütandion tarafından kuvvetle inhibe edildiği bildirilmiş ve bu nedenle aktif bölgede arjinin amino asidinin bulunduğu ileri sürülmüştür.

Fitaz enzimlerinin hidroliz ürünü olan fosfatın substrat analogu olan sodyum molibdat ve amonyum vanadatın, fitaz enzimimizi % 90 oranında kuvvetli bir şekilde inhibe ettiği saptandı. Diğer bir fitaz inhibitörü olan florür 1 ve 5 mM konsantrasyonlarda % 19 ve 68 enzim aktivitesini azalttığı görüldü. *Aspergillus niger* 11T53A9 fitazının farklı kaynaklardan izole edilen farklı fitazların inhibitörü olan florür tarafından, ve ayrıca molibdat ve vanadat tarafından kuvvetli bir şekilde inhibe edildiği bildirilmiştir (Greiner vd., 2009).

İndirgeyici ajan olan glutasyon 1 ve 5 mM konsantrasyonlarda sırasıyla enzimin % 5 ve 25 oranında aktivitesini kaybetmesine neden oldu. Kaotropik ajan olan borik asit 1 mM konsantrasyonda enzim aktivitesinde artışa neden olurken, 5 mM konsantrasyonunda enzim aktivitesinde bir etkisi olmadı ve kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. Diğer bir kaotropik ajan olan oksalik asitin ve sitratın 1 mM konsantrasyonun aktivite üzerinde hiçbir etkisiye neden olmadı. Kontrol grubu ile arasındaki farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulundu ($p>0.05$). Bu kaotropik ajanların 5 mM konsantrasyonları ise, enzim aktivitesinde ciddi bir inhibisyon meydana gelmiştir. Protein denatürantı olan üre ve sodyum siyanit varlığında ise fitaz enzimi 1 mM üre varlığında aktivitesinin neredeyse tamamını korurken, siyanit varlığında başlangıç aktivitesine göre % 20'lik bir artış ile daha yüksek bir aktivite göstermiştir ve protein denatürantlarının konsantrasyonu 5 mM'a çıkarıldığında ise enzim aktivitesinin ancak % 50'sini koruyabilmiştir.

Karboksil grubu inhibitörü olan CMC, enzim üzerinde dikkate değer bir aktivasyona yol açmıştır (% 40-90). Enzimin aktif bölgesinde karboksil grubunun yer almadığını veya katalizden sorumlu olmadığını söyleyebiliriz. Enzim aktivitesindeki artış, muhtemelen CMC'nin enzimin aktif merkezi dışında karboksil gruplarına bağlanarak enzimin yapısında bir esnekliğe yol açabileceği ve enzimin substrat bağlanma yeteneğini arttırmış olabileceğinden kaynaklanmaktadır.

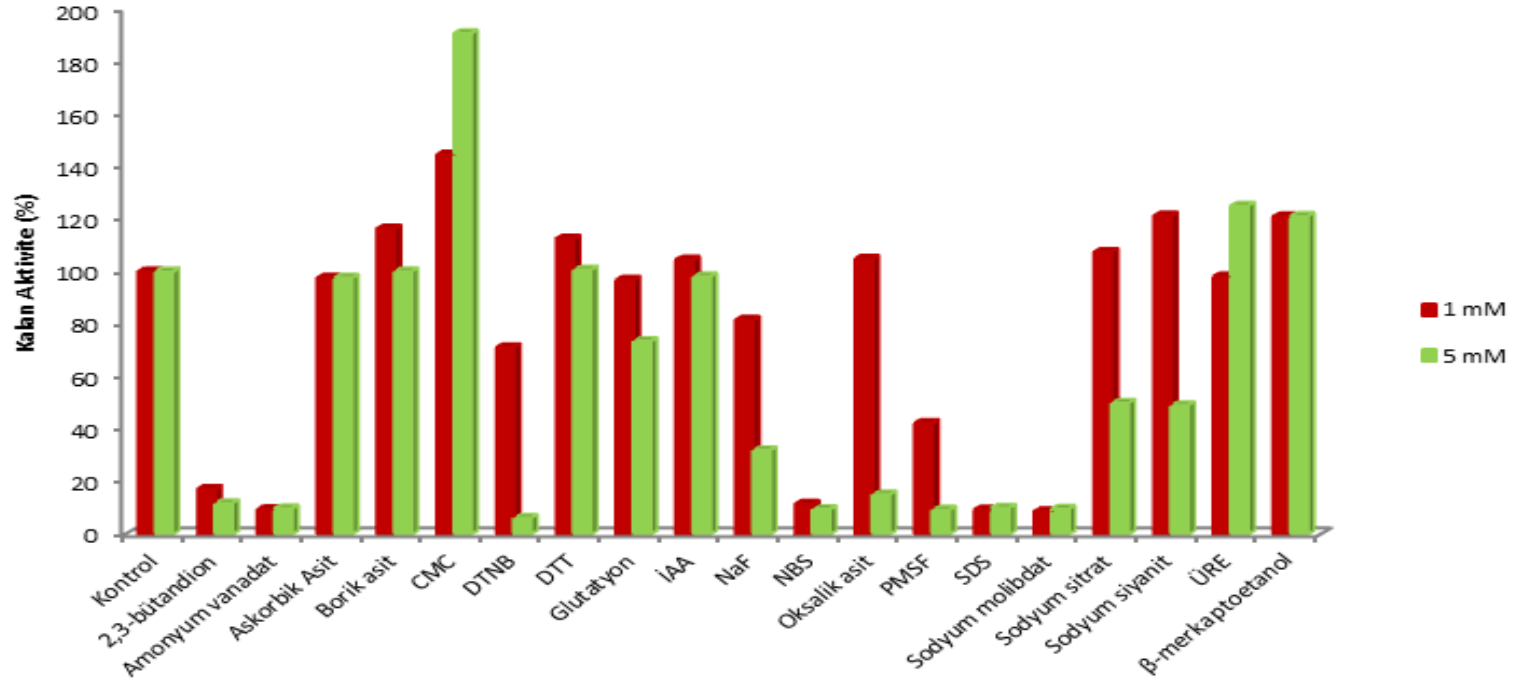
Sonuç olarak, *A. niger* UA-D fitazının aktif merkezinde serin, triptofan, sistein ve arjinin amino asit kalıntılarının katalitik mekanizmada önemli rol oynadığını söyleyebiliriz. Enzimin 2,3-bütadion ve sodyum molibdat tarafından inhibe olması, aktif merkezde serin, triptofan, sistein ve arjinin amino asit kalıntılarının

bulunması, pH 3.0 optimum aktiviteye sahip olması, substrat spesifikliğinin oldukça geniş olması enzimimizin histidin asit fosfataz olduğunu göstermektedir.

Tablo 4. 25. *A. niger* fitaz aktivitesi üzerine inhibitörlerin ve denatürantların etkisi

İnhibitörler	1 mM			5 mM		
	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite
Kontrol	640.88 ± 8.76	a	100.00	640.88 ± 8.76	a	100.00
2,3-Bütadion	110.46 ± 11.15	b	17.24	75.43 ± 6.90	b	11.77
Amonyum	60.83 ± 0.84	b	9.49	62.77 ± 1.46	b	9.79
Askorbik	625.63 ± 10.71	a	97.62	445.68 ± 10.71	b	69.64
Borik asit	745.72 ± 9.73	b	116.36	641.64 ± 10.71	a	100.12
CMC	926.52 ± 13.25	b	144.57	1222.18 ± 15.19	b	190.74
DTNB	455.96 ± 5.53	b	71.15	39.59 ± 4.21	b	6.18
DTT	721.49 ± 22.16	b	112.58	645.18 ±	a	100.76
Glutatyon	620.67 ± 18.01	a	96.85	471.22 ± 7.79	b	73.53
İAA	669.85 ± 2.45	b	104.52	629.02 ± 8.91	a	98.15
NaF	523.11 ± 20.14	b	81.62	204.87 ± 19.05	b	31.97
NBS	73.97 ± 23.28	b	11.54	60.83 ± 0.84	b	9.49
Oksalik asit	672.42 ± 13.63	a	104.92	327.87 ± 11.20	b	15.16
PMSF	271.05 ± 57.09	b	42.29	59.37 ± 2.23	b	9.26
SDS	59.85 ± 5.06	b	9.34	64.23 ± 1.46	b	10.02
Sodyum	55.47 ± 0.00	b	8.66	61.31 ± 1.46	b	9.57
Sodyum sitrat	688.91 ± 27.74	a	107.49	320.25 ± 4.87	b	49.97
Sodyum	777.37 ± 9.25	b	121.30	314.15 ± 4.39	b	49.02
ÜRE	629.20 ± 40.95	a	98.18	801.46 ± 25.66	b	125.06
β-	775.18 ± 14.06	b	120.96	776.16 ± 24.09	b	121.11

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



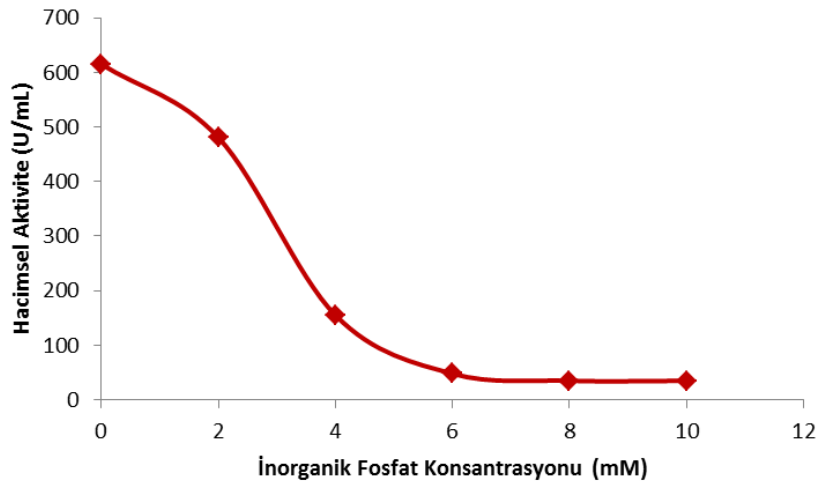
Şekil 4. 25. *A. niger* fitaz aktivitesi üzerine inhibitörlerin ve denatürantların etkisi

4.6.10. Enzim Aktivitesi Üzerine İnorganik Fosfatın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine inorganik fosfatın etkisi Tablo 4.20 ve Şekil 4.26’de sunuldu. Ortamda inorganik fosfat konsantrasyonu arttıkça aktivitede azalma meydana geldi ve 4 mM’den fazla inorganik fosfat içeren ortamda aktivitede ciddi bir azalma gözlemlendi ve inorganik fosfat içermeyen kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Böylece ortamda 4 mM’den fazla fitatın hidroliz ürünü olan fosfatın bulunması halinde enzimin inaktif olduğu belirlendi.

Tablo 4. 26. Enzim aktivitesi üzerine inorganik fosfatın etkisi

İnorganik Fosfat Konsantrasyonu (mM)	Hacimsel aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x
0	615.09 \pm 16.26	a
2	480.78 \pm 52.83	b
4	155.07 \pm 7.87	c
6	48.01 \pm 19.13	d
8	35.04 \pm 0.00	d
10	35.04 \pm 0.00	d



Şekil 4. 26. *A. niger* UA-D fitaz aktivitesi üzerine inorganik fosfatın etkisi

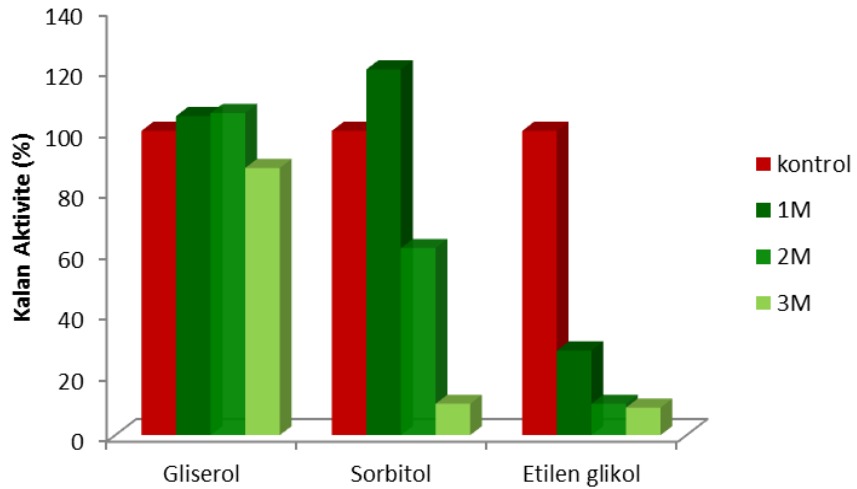
Fitazlar genelde fitatın hidroliz ürünü olan inorganik fosfat ile ürün inhibisyonuna (kompetitif inhibisyon) uğradığı bilinmektedir (Greiner vd., 1993). *Klebsiella terrigena* fitazının 2 mM'dan fazla sodyum fitat varlığında (Greiner vd., 1997) *Candida krusei* fitazının ise 10 mM sodyum fitat varlığında inhibe olduğu bildirilmiştir (Quan vd., 2002). *A. ficuum* asit fosfatazının 3 mM inorganik fosfat varlığında inhibe olduğu, fakat fitazın aktivitesinde inhibisyona neden olmadığı bildirilmiştir (Shieh vd. 1969). *P. anomala* fitazının (Vohra ve Satyanarayana, 2002) ve *S. Castellii* fitazının (Segueilha vd., 1992) aktivitesi üzerinde sırasıyla 10 ve 40 mM'a kadar inorganik fosfat konsantrasyonunda bir inhibisyon gözlenmemiştir. *Cryptococcus laurentii* ABO 510 fitazının ise 0.1 mM inorganik fosfat varlığından itibaren enzim aktivitesinde azalma görülmüş, 0.5 mM inorganik fosfat varlığında ise enzimin tamamen inaktive olduğu bildirilmiştir (Staden vd., 2007). *S. thermophile* fitazı ise reaksiyon karışımındaki inorganik fosfat tarafından 3 mM'dan sonra inhibisyona uğramış fakat 5 mM inorganik fosfat varlığında bile enzim aktivitesinin % 80'ini koruduğu bildirilmiştir (Singh ve Satyanarayana, 2009).

4.6.11. Enzimin Sıcaklık Stabilitesi Üzerine Polihidrik Alkollerin Etkisi

Enzimin sıcaklık stabilitesini artırmak amacıyla çeşitli polihidrik alkollerin (etilen glikol, gliserol, sorbitol) etkisi incelendi (Tablo 4.21 ve Şekil 4.27). Kontrol grubu, 70 °C'de 2 saat sonunda aktivitesinin % 75'sini koruyabildi. Etilen glikolün denenen konsantrasyonlarda (2-OH grubu) stabilizeyi artırıcı bir etkisi gözlenmedi, aksine aktivite üzerinde ciddi kayıplara neden olduğu belirlendi. Gliserol (3-OH grubu) 1.0 ve 2.0 M konsantrasyonlarında kullanıldığında kalan aktivitede % 4-5'lik bir artış gözlemlendi. Gliserol 3.0 M'da ise, aktivitede yaklaşık % 15'lik bir azalma görüldü. Sorbitol (6-OH grubu) 1.0 M konsantrasyonda ortama ilave edildiğinde aktivitede bir artış gözlenirken 3.0 M konsantrasyonlarında ise enzim aktivitesinin ancak % 10'unu koruyabilmiştir.

Tuzların ve polihidrik alkollerin enzimlerin termal stabilitesini arttırdığı bilinmektedir (Obon vd., 1996; Lamosa vd., 2000). Trehaloz, sorbitol ve gliserol gibi polialkollerin protein yüzeyinden su moleküllerinin uzaklaştırılmasını sağlayarak ve proteinler ile hidrojen bağları oluşturma kapasitesine sahip olduğundan proteinlerin doğal konformasyonlarını destekleyerek önemli rol oynar. Böylece proteinlerin stabilizasyonun yardımcı olur (Obon vd., 1996; Lamosa vd., 2000). *Pichia anomala* fitazının % 1 olacak şekilde gliserol varlığının enzim

aktivitesi üzerinde bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Vohra ve Satyanarayana, 2002). *Sporotrichum thermophile* fitazının ise % 10 gliserol varlığında enzimin yarılanma ömrünü 90 dakikadan 109 dakikaya çıkararak enzim aktivitesi üzerinde bir artışa neden olduğu, sorbitolün ise 113 dakikaya çıkararak enzim stabilitesini artırıcı etkisi olduğu bildirilmiştir (Singh ve Satyanarayana, 2009).



Şekil 4. 27. *A. niger* UA-D sıcaklık stabilitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi

Tablo 4. 27. *A. niger* UA-D sıcaklık stabilitesi üzerine polihidrik alkollerin etkisi

Polihidrik Alkol Konsantrasyonu	Gliserol			Sorbitol			Etilen Glikol		
	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite
Kontrol	766.91 ± 5.42	a	100	766.91 ± 5.42	a	100	766.91 ± 5.42	a	100
1	804.22 ± 7.56	b	104.86	912.98 ± 12.32	b	120.22	213.14 ± 5.92	b	27.79
2	812.00 ± 11.61	b	105.88	471.69 ± 10.76	b	61.51	78.83 ± 1.95	b	10.28
3	673.48 ± 1.95	b	87.82	78.83 ± 6.81	b	10.28	69.09 ± 1.95	b	9.01

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

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

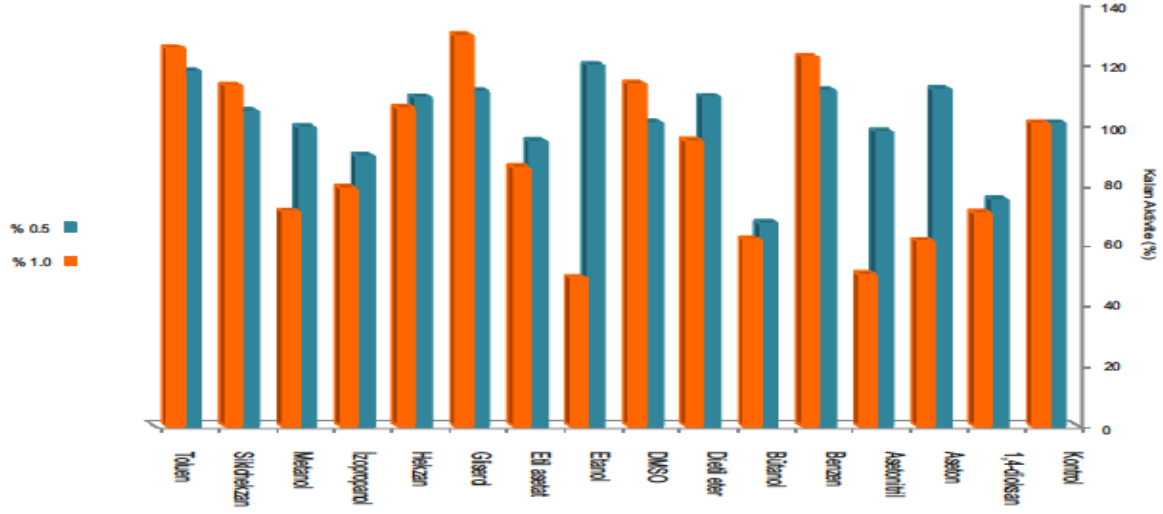
4.6.12. Enzim Stabilitesi Üzerine Organik Çözücülerin Etkisi

Enzim stabilitesi üzerine organik çözücülerin etki sonuçları Tablo 4.22 ve Şekil 4.28'de sunuldu. *A. niger* UA-D fitazının bütanol ve 1,4-dioksan dışındaki organik çözücülerin düşük konsantrasyonlarına karşı aktivitesinin en azından % 75'den fazlasını koruduğu hatta çoğu çözücünün enzim aktivitesinin artırıcı etkisi olduğu saptandı. Fitaz enzimi 1,4-dioksan çözücüsünün % 0.5 ve 1 konsantrasyonlarında, sırasıyla aktivitesinin % 75 ve 70'ini, bütanolde ise sırasıyla % 66 ve 61'ini koruyabilmiştir. Fitaz enzimi % 0.5 ve 1.0 konsantrasyonlarında dietil eter, DMSO, hekzan ve siklohekzan aktivitesinin neredeyse tamamını koruduğu belirlendi ve elde edilen değerler ile kontrol arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü. Fitaz enzimi 1,4-dioksan dışındaki aseton, asetonitril, benzen, etanol, etilasetat, gliserol, izopropanol ve metanolün % 0.5'lik konsantrasyonlarında aktivitesinin en az % 90'ını koruyabildiği saptandı ve elde edilen değerler ile kontrol arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($p>0.05$). Elde edilen verilere benzer şekilde *Sporotrichum thermophile* fitazı benzil alkol, etanol ve toluen tarafından inhibe olurken, hekzan, bütanol, aseton ve izoamil alkol varlığında aktivitesini koruyabilmiştir. Bu sonuçlara göre *A. niger* (Vats ve Banerjee, 2005) fitazında bildirildiği gibi enzimin aktif merkezinin hidrofobik kalıntılar içermediği düşünülmektedir. *Pichia anomala* fitazının % 1 veya 1 mM olacak şekilde gliserol ve toluen varlığının enzim aktivitesi üzerinde bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Vohra ve Satyanarayana, 2002). *Aspergillus niger* van Teighem fitazının % 10 (v/v) hekzan, bütanol, dimetilsülfoksit (DMSO), dimetilflorid (DMF), ve benzil alkol varlığında 25 °C'de 2 saat boyunca inkübasyonun ardından DMSO ve DMF varlığında aktivitesini kaybetmediği bildirilmiştir. Benzil alkol ve bütanol ile inkübasyonun ardından ise sırasıyla aktivitesinin % 83 ve 88'ini koruyabilmiştir (Vats ve Banerjee, 2005).

Genel olarak bakıldığında organik çözücülerin enzim aktivitesini çok fazla etkilemediği görülmektedir. Bu da enzimin üç boyutlu yapısında hidrofobik kalıntıların çok az ve önemli olmadığını göstermektedir. Bu bulguların daha önce bahsedilen tuz çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisinde elde edilen sonuçları desteklediğini düşünmekteyiz.

Tablo 4. 28. *A. niger* UA-D fitazının stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

Organik Çözgenler	% 0.5			% 1.0		
	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. ± S.H.)	x	% Aktivite
Kontrol	636.01 ± 44.77	a	100.00	636.01 ± 44.77	a	100.00
1,4-dioksan	476.64 ± 28.84	b	74.94	446.71 ± 22.47	b	70.24
Aseton	707.06 ± 32.82	a	111.17	388.81 ± 22.11	b	61.13
Asetonitril	618.98 ± 35.97	a	97.32	318.73 ± 19.44	b	50.11
Benzen	705.11 ± 30.17	a	110.86	775.67 ± 10.36	b	121.96
Bütanol	425.30 ± 18.60	b	66.87	392.21 ± 57.74	b	61.67
Dietil eter	691.97 ± 77.23	a	108.80	599.51 ± 60.23	a	94.26
DMSO	637.95 ± 50.51	a	100.31	719.71 ± 62.97	a	113.16
Etanol	758.64 ± 22.44	a	119.28	310.95 ± 31.41	b	48.89
Etil asetat	598.78 ± 61.31	a	94.15	543.31 ± 5.13	b	85.42
Gliserol	703.16 ± 30.35	a	110.56	821.41 ± 13.88	b	129.15
Hekzan	690.02 ± 32.03	a	108.49	668.13 ± 57.78	a	105.05
İzopropano	566.91 ± 40.20	a	89.14	500.24 ± 30.39	b	78.65
Metanol	626.76 ± 9.94	a	98.55	450.61 ± 13.88	b	70.85
Siklohekza	661.80 ± 41.33	a	104.05	715.33 ± 52.25	a	112.47
Toluen	745.01 ± 36.65	a	117.14	794.16 ± 41.73	b	124.87



Şeki 14. 28. *A. niger* UA-D fitazının stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisi

4.6.13. Enzimin Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi

Enzimin substrat spesifitesini belirlemek amacıyla pH 3.0 0.2 M glisin-HCl tamponunda hazırlanan 20 mM 4-nitrofenil-fosfat, 5-brom-4-klor-3-indol fosfat, D-fruktoz-1,6-bisfosfat, D-fruktoz-6-fosfat, D-glukoz-1-fosfat, D-glukoz-6-fosfat, α -gliserofosfat, β -gliserofosfat, α -naftil fosfat ve β -naftil fosfat substratları ile enzim aktivitesi ölçülmüş olup, sonuçlar Tablo 4.23 ve Şekil 4.29'da sunuldu.

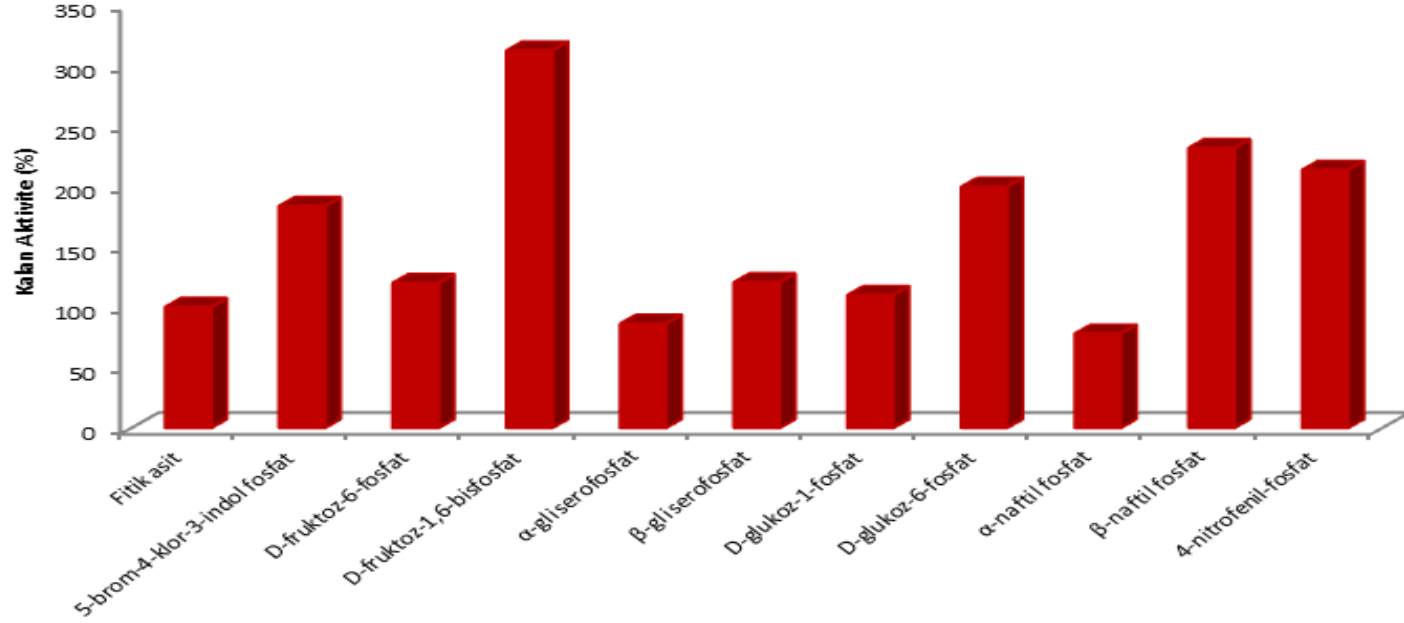
Fitazlar fitik asit için oldukça spesifik olmalarına rağmen, substrat spesiflikleri moleküler özelliklerindeki farklılıklar nedeniyle değişebilir (Vats ve Banerjee, 2004).

Çalışma sonuçlarıma göre, fitazın çok geniş bir substrat aralığında aktivite gösterdiği saptandı. Bununla birlikte substrat olarak fitik asit kullanıldığında diğer substratlara göre, beklenenden daha düşük aktiviteye sahip olduğu görüldü. En yüksek enzim aktivitesi substrat olarak D-fruktoz-1,6-bisfosfat kullanıldığında elde edildi. Fitaz enzimi, D-glukoz-1-fosfat ve D-glukoz-6-fosfat substratlarının fosfat gruplarının bulunduğu karbon farklı olsa bile, substrat olarak kullanıldıklarında benzer aktivite göstermişlerdir yani her iki bağ içinde aynı stereospesiflik göstermişlerdir. α -Gliserofosfat substrat olarak kullanıldığında kontrole göre enzim % 14 daha az aktivite göstermiştir. β -gliserofosfat kullanıldığında ise kontrole göre % 20 daha fazla aktivite göstermiştir. Bu sonuçlardan enzimin 1. karbona daha az, 2. karbona ise daha fazla spesifik olduğunu söyleyebiliriz. Çünkü α -gliserofosfatta fosfat grubu 1. karbona bağlı iken, β -gliserofosfatta 2. karbona bağlıdır. Wyss vd. (1999a) bütün bilinen mikrobiyal HAPhys'ları substrat spesifliğine dayanarak iki sınıfa ayırmıştır. İlk sınıf geniş substrat spesifliğine sahip fakat fitat için substrat spesifliği düşüktür ve fitik asidi *myo*-inositol 1- monofosfat yada *myo*-inositole hidrolizler (Quan vd., 2004) . İkinci sınıf ise dar substrat spesifliğine sahipken fitata karşı oldukça spesifiktir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda enzimimiz bu sınıflandırmanın ilk sınıfına dahildir. *Pichia anomala* fitazı *p*-nitrofenil fosfat ve ATP'ye karşı fitik aside benzer etkinlikte aktiftir. Bunun yanında ADP, glukoz-6-fosfat gibi fosfat esterleri içeren bileşiklere karşı aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Fitat için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0.20 mM; 6.34 μ mol/ mg protein/ dakika olarak belirlenmiştir (Vohra ve Satyanarayana, 2002). Casey ve Walsh (2004) oldukça geniş fosforillenmiş substratlara karşı aktivite gösteren *Rhizopus oligosporus*

ATCC 22959 fitazının Na-fitat ve Ca-fitata karşı benzer ve 2-naftil fosfat, 1-naftil fosfat, fenil fosfat, gliserol-2-fosfat ve glukoz-1-fosfata karşı sodyum fitat referans alındığında % 85 ve üzerinde aktivite gösterdiğini belirlemiştir. Bunun dışında *Aspergillus niger* 307 fitazının fitik aside oldukça spesifik olduğu diğer fosforillenmiş bileşikler fitatın hidrolizlenme hızının maksimum % 3'ü kadar hidrolizlediği belirlenmiştir (Sariyska vd., 2005). Vats ve Banerjee (2005) *Aspergillus niger* van Teighem fitazının sodyum fitat dışında kullanılan diğer substratlara karşı oldukça düşük aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Tablo 4. 29. *A. niger* UA-D fitazının substrat spesifikliği

Substrat	Hacimsel Aktivite (U/mL) (ORT. \pm S.H.)	x	% Aktivite
Fitik asit	92.52 \pm 1.25	a	100.00
5-brom-4-klor-3-indol fosfat	169.67 \pm 7.44	b	183.39
D-fruktoz-6-fosfat	110.88 \pm 4.31	b	119.84
D-fruktoz-1,6-bisfosfat	288.47 \pm 1.35	b	311.79
α -gliserofosfat	79.68 \pm 0.45	b	86.12
β -gliserofosfat	111.34 \pm 2.87	b	120.34
D-glukoz-1-fosfat	101.61 \pm 1.78	b	109.82
D-glukoz-6-fosfat	184.33 \pm 10.71	b	199.23
α -naftil fosfat	72.15 \pm 1.89	b	77.98
β -naftil fosfat	214.05 \pm 4.31	b	231.36
4-nitrofenil-fosfat	197.31 \pm 7.08	b	213.26



Şekil 4. 28. *A. niger* UA-D fitazının substrat spesifikliği

5. SONUÇ

ADÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Kültür Stokları'ndan temin edilen 165 adet fungus fitaz enzimi üretme kapasitesi açısından tarandığında, 128 tanesinin fitaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi, bunlardan 25 tanesinin ise, kantitatif olarak enzim üretme kapasiteleri karşılaştırıldı. Bu taramalar sonucunda, en iyi fitaz üreticisi olarak *A. niger* UA-D seçildi. *A. niger* UA-D fungusunun fitaz üretimi için, kültür koşulları optimize edildiğinde en iyi fitaz üretiminin başlangıç pH'sı 5.0 ve sıcaklık 30 °C, 7 gün (durağan fazın sonu) geliştirildiğinde elde edildiği saptandı. Kültür ortamının süzülmesi sonucu elde edilen süzüntü ham enzim kaynağı olarak kullanılarak sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi işlemleri ile saflaştırıldı ve saflaştırma adımlarında sonra, PAGE ve SDS-PAGE yapıldığında, tek bir bant elde edilerek saflaştırıldığı görüldü. Saflaştırılan enzimin SDS-PAGE ile molekül ağırlığının yaklaşık olarak 64.57 kDa olduğu bulundu.

Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu yapıldığında, maksimum enzim aktivitesinin pH 3.0 ve 70 °C'de olduğu saptandı. Enzimin geniş bir pH aralığında (pH 1.5-5.0) oldukça stabil olduğu görüldü. Fitaz enziminin 25-70 °C arasında aktivitesinin büyük bir kısmını koruması enzimin sıcaklık stabilitesinin iyi olduğu belirlendi. Fitaz enziminin sodyum fitat için, K_m değerinin 180 μ M, V_{max} değerinin ise 54.35 U/mL olduğu bulundu. Polihidrik alkollerden gliserol ve sorbitolün sıcaklık stabilitesini arttırdığı gözlemlendi. Fitazın, denenen organik çözücülerin büyük bir kısmının düşük konsantrasyonlarına karşı (% 0.5) aktivitesini büyük bir oranda (% 75) koruduğu, ancak çok azının yüksek konsantrasyonlarına karşı aktivitesini koruyamadığı görüldü. Enzimin 2,3-bütandion, NBS, PMSF ve DTNB ile büyük oranda inhibe olması aktif merkezde katalizden sorumlu arjinin, triptofan serin ve sistein amino asidinin olabileceğini düşündürmektedir.

Al^{3+} ve Pb^{2+} 5 mM konsantrasyonlarında ve Cu^{2+} 10 mM konsantrasyonlarında enzim aktivitenin en azından % 50'den fazlası inhibe olduğu belirlendi. Fe^{3+} iyonunun bütün konsantrasyonlarında enzim tamamıyla inhibe olduğu belirlendi. Bunlar dışındaki metal iyonları enzim aktivitesinde çok fazla inhibisyona neden olmadığı saptandı. Enzimin EDTA tarafından inhibe olmaması nedeniyle bir metalloenzim olmadığını söyleyebiliriz. Fitazın diğer fosfatlanmış bileşiklere karşı aktivitesi saptandı ve en yüksek aktiviteyi D glukoz-1,6-bisfosfata karşı gösterdiği

belirlendi. Enzim fosfatlanmış bileşiklere karşı oldukça aktif olması enzimin yem sanayinde kullanılması için avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Enzimin optimum pH'sının asidik olması enzimlerin pH'sına göre sınıflandırıldığında histidin asit fosfataz sınıfına dahil olduğunu ve PhyB fitazı olduğunu göstermektedir. Substrat spesifikliğinin geniş olması enzimin PhyB olduğunu desteklemektedir. Çünkü PhyB'nin aktif bölgesinde daha nötr elektrik alanına sahip olduğu bilinmektedir. Fitata hidrolizleyen enzimlerden fitata karşı düşük spesifik aktivite gösteren fitazların 300. amino asit kalıntısı nötral özellikte olduğundan, PhyA'dan daha geniş çeşitlilikteki fosfomonoesterleri katalizleyebilir.

Araştırma sonucunda endüstriyel potansiyeli yüksek bir enzim elde edildi. Elde edilen enzimin besin değeri yüksek yem eldesi için yem sanayinde, özel *myo*-inositollerin elde edilmesinde, ilaç ve gıda endüstrileri gibi endüstrinin birçok alanında kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Bu amaçla, daha sonraki dönemlerde bu enzimin endüstriye uygulanmasına yönelik araştırmaların yapılması düşünülmektedir. Özellikle yemlere uygulanarak etlik piliçlerin performansını arttırarak daha fazla verim elde edilebileceği düşünülmektedir. Enzim saf olduğu için özel *myo*-inositoller elde edilerek ilaç sanayinde kullanım potansiyeli araştırılabilir. Bu nedenle fitatın hidrolizi sonucu açığa çıkan ürünlerin saptanması planlanmaktadır. Doğal enzimin moleküler ağırlığını belirlemek için jel filtrasyonu yapılarak enzimin alt ünitelere sahip olup olmadığı belirlenecektir. Enzimin karbohidrat kalıntısı içerip içermediği tespit edilecektir. Enzimin ait olduğu alt sınıfın tam olarak belirlenebilmesi için enzimin elektroforezde saptanan bandı kesilerek, elde edilecek saf fitazın amino asit sekanslarının çıkarılması ve üç boyutlu yapısının aydınlatılması düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Al Asheh, S., and Duvnjak, Z. 1994. Characteristics of phytase produced by *Aspergillus carbonarius* NRC 401121 in canola meal. **Acta Biotechnologica**, 14: 223-233.
- Amano Pharmaceuticals. 1995. Novel Phytase. Japan Pat. 07067635.
- Anderson, P.A. 1985. Interactions between proteins and constituents that affect protein quality. In: Digestibility and amino acid availability in cereals and oilseeds (Finley, J.W., and Hopkins, D.T.). American Association of Cereal Chemists, p. 31-45, St Paul, Minnesota.
- Angelis, M., Gallob, G., Corboc, M.R., McSweeney, P.L.H., Facciae, M., Giovineb, M., Gobbettib, M. 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. **International Journal of Food Microbiology**, 87: 259-270.
- Augspurger, N.R., Webel, D.M., Lei, X.G., Baker, D.H. 2003. Efficacy of an *E. coli* phytase expressed in yeast for releasing phytate-bound phosphorus in young chicks and pigs. **Journal of Animal Science**, 81: 474-483.
- Baldi, B.G., Scott, J.J., Everard, J.D., Loewus, F.A. 1988. Localization of constitutive phytases in lily pollen and properties of the pH 8 form. **Plant Science**, 56: 137-147.
- Baruah, K., Sahu, N.P., Pal, A.K., 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 The World Aquaculture Society**, 38: 238-249.
- Bennett, T.P., Frieden, E. 1969. Modern Topics in Biochemistry. Macmillan, pp. 43-45, London.
- Berka, R.M., Rey, M.W., Brown, K.M., Byun, T., Klotz, A.V. 1998. Molecular characterization and expression of a phytase gene from the thermophilic

- fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Applied Environmental Microbiology**, 64: 4423-4427.
- Bhandari, M.R., Kawabata, J. 2004. Assessment of antinutritional factors and bioavailability of calcium and zinc in wild yam (*Dioscorea* spp.) tubers of Nepal. **Food Chemistry**, 85: 281-287.
- Bhavsar, K., Kumar, V.R., Khire, J.M. 2010. High level phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 in solid state culture: response surface optimization, up-scaling, and its partial characterization. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, 38: 1407-1417.
- Bitar, K., and Reinhold, J.G. 1972. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf, and man. **Biochemica Biophysica Acta**, 268: 442-452.
- Boyce, A., and Walsh, G. 2007. Purification and characterisation of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis* Wehmer. **Journal of Biotechnology**, 132: 82-87.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254, Athens.
- Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M. 2000. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. **Microbiology and Molecular Biology**, Reviews 64: 573-606.
- Buxbaum, E. 2007. Fundamentals of Protein Structure and Function. Springer, pp. 59-63, West Indies.
- Campbell, G.L., and Bedford, M.R. 1992. Enzyme applications for monogastric feeds: A review. **Canadian Journal of Animal Science**, 72: 449-466.
- Cao, L., Wang, W., Yang, C., Yang, Y., Diana, J., Yakupitiyage A., Luo Z., Li, D. 2007. Application of microbial phytase in fish feed. **Enzyme and Microbial Technology**, 40: 497-507.

- Casey, A., Walsh, G. 2004. Identification and characterisation of phytase of potential commercial interest. **Journal of Biotechnol**, 3: 313-322.
- Casey, A., Walsh, G., 2003. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. **Bioresource Technology**, 86: 183–188.
- Chadha, B.S., Harmeet, G., Mandeep, M., Saini, H.S. and Singh, N. 2004. Phytase production by the thermophilic fungus *Rhizomucos pusillus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 20: 105–109.
- Chantasartasamee, K., Ayuthaya, D.I. Na, Intarareugsorn S., Dharmsthiti S. 2005. Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. **Process Biochemistry**, 40: 2285–2289.
- Chen, J.C. 1998. Novel screening method for extracellular phytase-producing mikroorganisms. **Biotechnology Techniques**, 12: 759-761.
- Cheng, C. and Lim, B.L. 2005. Beta-propeller phytases in the aquatic environment: characterization of a novel phytase from *Shewanella oneidensis* MR-1. In: Inositol Phosphates in the Soil-Plant-Animal System: Linking Agriculture and Environment. Proceedings of the Bouyoucos Conference to Address the Biogeochemical Interaction of Inositol Phosphates in the Environment (Turner, B.L., Richardson, A.E., Mullaney, E.J.) Sun Valley, pp. 55-56, Idaho, USA.
- Cho, J.S., Lee, C.W., Kang, S.H., Lee, J.C., Bok, J.D., Moon, Y.S., Lee, H.G., Kim, S.C., and Choi, Y.J. 2003. Purification and characterization of a phytase from *Pseudomonas syringae* MOK1. **Current Microbiology**, 47: 290-294.
- Choi, Y.M., Dong, O.N., Cho, S.H., Lee, H.K., Suh, H.J., and Chung, S.H. 1999. Isolation of a phytase producing *Bacillus* sp. KHU-10 and its phytase production. **Journal Microbiology Biotechnology**, 9: 223-226.
- Choi, Y.M., Suh, H.J., and Kim, J.M. 2001. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. **Journal of Protein Chemistry**, 20: 287-292.

- Cosgrove D.J. 1966. The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates Review. **Pure and Applied Chemistry**, 16: 209-224.
- DeBoland, A.R., Garner, G.B. and O'Dell, B.L. 1975. Identification and properties of 'phytate' in cereal grains and oilseed products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 23: 1186-1189.
- Dvorakova, J. 1998. Phytase, sources, preparation and exploitation. **Folia Microbiologica**, 43: 323-338.
- Dvorakova, J., Volfova, O., and Kopecky, J. 1997. Characterization of phytase produced by *Aspergillus niger*. **Folia Microbiologica**, 42: 349-352.
- Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G., Mullaney, E.J., Dischinger, Jr., H.C. and Ullah, A.H.J. 1993. Identification and Cloning of a Second Phytase Gene (phyB) from *Aspergillus niger (ficuum)*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 195: 53-57
- Ellestad, L.E., Angel, R., and Soares Jr, J.H. 2002. Intestinal phytase II: A comparison of activity and in vivo phytate hydrolysis in three teleost species with differing digestive strategies. **Fish Physiology and Biochemistry**, 26: 259-273.
- Erdman, J.W., and Poneros-Schneier, A. 1989. Phytic acid interactions with divalent cations in foods and in the gastrointestinal tract. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 249: 161-171.
- Escobin-Mopera, L., Ohtani, M., Sekiguchi, S., Sone, T., Abe, A., Tanaka, M., Meevootisom, V., and Asano, K. 2012. Purification and characterization of phytase from *Klebsiella pneumoniae* 9-3B. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 113: 562-567.
- Feil, B., 2001. Phytic Acid. **Journal of New Seeds**, 3: 1-35.
- Fox, M.R.S., and Tao, S.H. 1989. Antinutritive effects of phytate and other phosphorilated derivatives. **Nutrition Toxicology**, 3: 59-96.
- Freund, W.D., Mayr, G.W., Tietz, C. and Schultz, J.E. 1992. Metabolism of inositol phosphates in the protozoan *Paramecium*. Characterization of a

- novel inositol-hexakisphosphate-dephosphorylating enzyme. **European Journal of Biochemistry**, 207: 359–367.
- Gargova, S., Roshkova, Z., Vancheva, G. 1997. Screening of fungi for phytase production. **Biotechnology Techniques**, 11: 221–224.
- Gargova, S., Sariyska, M. 2003. Effect of culture conditions on the biosynthesis of *Aspergillus niger* phytase and acid phosphatases. **Enzyme and Microbial Technology**, 32: 231-235.
- Gargova, S., Sariyska, M., Angelov, A., Stoilova, I. 2006. *Aspergillus niger* pH 2.1 optimum acid phosphatase with high affinity for phytate. **Folia Microbiologica**, 6:541-545.
- Ghareib, M. 1990. Biosynthesis, purification, and some properties of extracellular phytase from *Aspergillus carneus*. **Acta Microbiologica Hungarica**, 37: 412-418.
- Gibson, D.M., and Ullah, A.B.J. 1990. Phytases and their action on phytic acid. Inositol Metabolism in Plants (Morre, Zn D. J., Boss, W. F., Loewus, FA.) Wiley-Liss, pp 77-92, New York.
- Gibson, D.M., and Ullah, A.H. 1988. Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. **Archives of Biochemistry Biophysics**, 260: 503-513.
- Golovan, S.P., Wang, G., Zhang, J., and Forsberg, C.W. 2000. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli* appA encoded bifunctional enzyme that inhibits both phytase and acid phosphatase activities. **Canadian Journal Microbiology**, 46: 59-71
- Greaves, M.P., Anderson, G., and Webley, D.M. 1967. The hydrolysis of inositol phosphates by *Aerobacter aerogenes*. **Biochemica et Biophysica Acta**, 132: 412-418.
- Greiner, R., and Farouk, A.E. 2007. Purification and characterization of a bacterial phytase whose properties make it exceptionally useful as a feed supplement. **The Protein Journal**, 26: 467-474.

- Greiner, R., da Silva, L.G., Couri, S. 2009. Purification and characterisation of an extracellular phytase from *Aspergillus niger* 11T53A9. **Brazilian Journal of Microbiology**, 40: 795-807.
- Greiner, R., Haller, E., Konietzny, U., and Jany, K.D. 1997. Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. **Archives Biochemistry Biophysics**, 341: 201-206.
- Greiner, R., Konietzny, U., and Jany, K.D. 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 303: 107-113.
- Greiner, R., Larsson Alminger, M., Carlsson, N.G., Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., Pedrosa, M., and Goyoaga, C. 2002. Pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytases of legume seeds. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 50: 6865-6870.
- Gulati, H.K., Chadha, B.S., Saini H.S. 2007a. Production and characterization of thermostable alkaline phytase from *Bacillus laevolacticus* isolated from rhizosphere soil. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, 34: 91-98.
- Gulati, H.K., Chadha, B.S., Saini H.S. 2007c. Production, purification and characterization of thermostable phytase from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* TL-7. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, 54: 121-138.
- Gulati, H.K., Chadha, B.S., Saini, H.S. 2007b. Production of feed enzyme (phytase and plant cell Wall hydrolizing enzymes) by *Mucor indicus* MTCC 6333: purification and characterization of phytase. **Folia Microbiologica**, 52: 491- 497.
- Gümüşel, F. 2002. Biyoteknoloji, genetik ve sağlık sektörü. **Kocaeli Sanayii için teknolojik uzgörü ortak projesi**, s. 73-135.
- Ha, N.C., Oh, B.C., Shin, S., Kim, H.J., Oh, T.K., Kim, Y.O., Choi, K.Y., and Oh, B.H. 2000. Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states. **Nature Structural Biology** 7: 147-153.

- Han, Y., Wilson, D.B., and Lei, X.G. 1999. Expression of an *Aspergillus niger* Phytase Gene (phyA) in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environmental Microbiology**, 65: 1915-1918.
- Han, Y.M. and Lei, X.G. 1999. Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris*. **Archives Biochemistry Biophysics**, 364: 83-90.
- Han, Y.M., Yang, F., Zhou, A.G., Miller, E.R., Ku, P.K., Hogberg, M.G. and Lei, X.G. 1997. Supplemental phytases of microbial and cereal sources improve dietary phytate phosphorus utilization by pigs from weaning through finishing. **Journal of Animal Science**, 75: 1017–1025.
- Hara, A., Ebina, S., and Kondo, A. 1985. A new type of phytase from pollen of *Typha latifolia* L. **Agricultural and Biological Chemistry**, 49: 3539-3544.
- Haros, M., Bielecka, M., and Sanz, Y. 2005. Phytase activity as a novel metabolic feature in *Bifidobacterium*. **FEMS Microbiology Letters**, 247: 231-239.
- Hegeman, C.E., and Grabau, E.A. 2001. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. **Plant Physiology**, 126: 1598–1608.
- Hogg, S. 2005. *Essential Microbiology*. Wiley, 481, United Kingdom.
- Holum, J. 1968. *Elements of General and Biological Chemistry*, Wiley, 2nd ed., 377, New Jersey.
- Hong, S.W., Chu, In H., and Chung, K.S. 2011. Purification and Biochemical Characterization of Thermostable Phytase from Newly Isolated *Bacillus subtilis* CF92. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, 54: 89-94
- Honke, J., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, C., Frias, J., and Gorecky, R. 1998. Changes in quantities of inositol phosphates during maturation and germination of legume seeds. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, 206: 279-283.

- Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology**, Reviews 63: 735-750.
- Houde, R.L., Alli, I., and Kermasha, S. 1990. Purification and characterisation of canola seed (*Brassica* sp.) phytase. **Journal of Food Biochemistry**, 114: 331-351.
- Howson, S.J., and Davis, R.P. 1983. Production of phytate-hydrolyzing enzyme by some fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, 5: 377-382.
- Huang, H., Luo, H., Yang, P., Meng, K., Wang, Y., Yuan, T., Bai, Y., Yao, B. 2006. A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 350: 884-889.
- Idriss, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T. and Borriss, R. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plantgrowth- promoting effect. **Microbiology**, 148: 2097–2109.
- Irving, G.C., and Cosgrove, D.J. 1971. Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin: some properties of a partially purified bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. **Australian Journal of Biological Sciences**, 24: 547-557.
- Jackson, J.F., and Linskens, H.F. 1982. Phytic acid in petunia hybrida pollen is hydrolysed during germination by a phytase. **Acta Botanica Neerlandica**, 315: 441–447.
- Jareonkitmongkol, S., Ohya, M., Watanabe, R., Takagi, H. and Nakamori, S. 1997. Partial purification of phytase from a soil isolate bacterium, *Klebsiella oxytoca* MO-3. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 83: 393-394.
- Jog, S.P., Garchow, B.G., Mehta, B.D. and Murthy, P.P.N. 2005. Alkaline phytase from lily pollen: Investigation of biochemical properties. **Archives Biochemistry Biophysics**, 440: 133–140.

- Jones, D.B., and Csonka, F.A. 1925. Proteins of the cottonseed. **Journal of Biological Chemistry**, 64: 673-683.
- Kasim, B.A., and Edwards Jr, H.M. 1998. The Analysis for Inositol Phosphate Forms in Food Ingredients. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 76: 1-9.
- Kerovuo, J., 2000. A Novel Phytase from *Bacillus*. Characterization and Production of the Enzyme. Academic Dissertation, p. 68, Helsinki.
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N. and Apajalahti, J. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. **Applied Environmental Microbiology**, 64: 2079–2085.
- Kim, D.S., Godber, J.S., Kim, H.R. 1999. Culture conditions for a new phytase-producing fungus. **Biotechnology Letters**, 21: 1077–1081.
- Kim, H., Kim, Y., Lee, J., Kim, K. and Kim, Y. 2003. Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*. **Biotechnology Letters**, 25: 1231-1234.
- Kim, T.W., and Lei, X.G. 2005. An improved method for a rapid determination of phytase activity in animal feed. **Journal of animal science**, 83: 1062-1067
- Kim, Y.O, Kim, H.K., Bae, K.S., YU, J.H., and OH, T.K. 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus sp.* DS11. **Enzyme and Microbial Thecnology**, 22: 2-7.
- Kirk, O., Borchert, T.V. and Fuglsang, C.C. 2002. Industrial Enzyme Applications. **Current Opinion in Biotechnology**, 13: 345-351.
- Konietzny, U., and Greiner, R. 2002. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). **International Journal of Food Science and Technology**, 37: 791-812.
- Konietzny, U., Greiner, R., and Jany, K.D. 1995. Purification and characterization of a phytase from spelt. **Journal of Food Biochemistry**, 18: 165-183.

- Kornegay, E.T., J.S. Radcliffe, and Denbow, D.M. 1996. Influence of natuphos phytase on calcium bioavailability in plant ingredients and development of calcium equivalency values for swine and poultry. Phytase in Animal Nutrition and Waste Management. (Coelho, M. B. and Kornegay, E. T.). BASF Corporation, Mount Olive, p. 419, New Jersey.
- Kostrewa, D., Grueninger-Leitch, F., D'Arcy, A., Broger, C., Mitchell, D. and van Loon, A.P.G.M. 1997. Crystal structure of phytase from *Aspergillus ficuum* at 2.5 Å resolution. **Nature Structure Biology**, 4: 185-190.
- Kostrewa, D., Wyss, M., D'Arcy, A. and van Loon, A.P.G.M. 1999. Crystal structure of *Aspergillus niger* pH 2.5 acid phosphatase at 2.4 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, 288: 965-974.
- Kumar V., Sinha A.K. , Makkar H.P.S., Becker K. 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food Chemistry**, 120: 945-959.
- Laboure A.M., Gagnon J., and Lescure A.M. 1993. Purification and characterization of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. **Biochemical Journal**, 295: 413-419.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685.
- Lamosa, P., Burke, A., Peist, R., Huber, R., Liu, M.Y., Silva, G., Rodrigues-Pousada, C., LeGall, J., Maycock, C., Santos, H. 2000. Thermostabilization of proteins by diglycerol phosphate, a new compatible solute from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. **Applied Environmental Microbiology**, 66: 1974-1979.
- Lan, G.Q., Abdullah, N., Jalaludin, S., and Ho, Y.W. 2011. Purification and characterization of a phytase from *Mitsuokella jalaludinii*, a bovine rumen bacterium. **African Journal of Biotechnology**, 10: 12796-12806.

- Lassen, S.F., Breinholt, J., Østergaard, P.R., Brugger, R., Bischoff, A., Wyss, M. and Fuglsang, C.C. 2001. Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp. and *Trametes pubescens*. **Applied Environmental Microbiology**, 67: 4701-4707.
- Lee D., Choi, S., and Hwang, Y. 2005. Culture Conditions and Characterizations of a New Phytase-Producing Fungal Isolate, *Aspergillus* sp. L117. **Mycobiology**, 33: 223-229.
- Lee, S.H., Park, H.J., Chun, H.K., Cho, S.Y., Cho, S.M., and Lillehoj, H.S. 2006. Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice. **Nutrition Research**, 26: 474-479.
- Lehrfeld, J. and Morris, E.R. 1992. Over estimation of Phytic Acid in Foods by the AOAC Anion-Exchange Method. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 40: 2208-2210.
- Lei, X.G., Porres, J.M., Mullaney, E.J. and Brinch-Pedersen, H. 2007. Phytase: source, structure and application. In: Industrial Enzymes (Section E) (Polaina, J. And MacCabe, A. P.), Springer, pp. 505–529, The Netherlands.
- Lenis, N.P., and Jongbloed ,A.W. 1999. New technologies in low pollution swine diets: diet manipulation and use of synthetic amino acids, phytase and phase feeding for reduction of nitrogen and phosphorus excretion and ammonia emission Review. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, 12: 305-327.
- Li, J., Hegeman, C.E., Hanlon, R.W., Lacy, G.H., Denbow, M.D., and Grabau, E.A. 1997. Secretion of active recombinant phytase from soybean cell-suspension cultures. **Plant Physiology**, 114: 1103–1111.
- Li, X., Chi, Z., Liu, Z., Li, J., Wang, X., Hirimuthugoda, N.Y. 2008. Purification and characterization of extracellular phytase from a marine yeast *Kodamaea ohmeri* BG3. **Marine Biotechnology**, 10: 190-197.

- Lim, D., Golovan, S., Forsberg, C.W., and Jia, Z. 2000 Crystal structure of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate. **Nature Structure Biology**, 7: 108–113.
- Lim, P.E. and Tate, M.E. 1973. The phytases. II. Properties of phytase fractions F 1 and F 2 from wheat bran and the myoinositol phosphates. **Biochimica et Biophysica Acta**, 302(2): 316-28.
- Liu, B.L., Jong, C.H., Tzeng, Y.M. 1999. Effect of immobilization on pH and thermal stability of *Aspergillus ficuum* phytase. **Enzyme and Microbial Technology**, 25: 517-521.
- Liu, B.L., Rafiq, A, Tzeng Y., and Rob, A. 1998. Induction and characterization of phytase and beyond. **Enzyme and Microbial Technology**, 22: 415-424.
- Maenz, D.D. 2001. Enzymatic characteristics of phytases as they relate to their use in animal feed. In: *Enzymes in farm animal nutrition* (Bedford, M.R. and Partridge, G.G.) CABI Publishing, pp. 61–84, Wallington, UK.
- Maenz, D.D. and Classen, H.L. 1998. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. **Poultry Science**, 77: 557–563.
- Maenz, D.D., Engele-Schaan, C.M., Newkirk, R.W., and Classen, H.L. 1999. The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytases-resistant and phytases-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. **Animal Feed Science and Technology**, 81: 177-192.
- Mandviwala, T.N., Khire, J.M. 2000. Production of high activity thermostable phytase from thermotolerant *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Journal Indian Microbiology Biotechnology**, 24: 237-243.
- Matsui, T., Nakagawa, Y., Tamura, A. 2000. Efficacy of yeast phytase in improving phosphorus bioavailability in a corn-soybean meal-based diet for growing pigs. **Journal of Animal Science**, 78: 94–99.
- Metin, K. 2007. Moleküler Biyoloji Teknikleri II: Protein Analiz Teknikleri. Moleküler Biyoloji (Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B.), Nobel Yayıncılık, Sayfa 555-598, Ankara

- Mittal, A., Singh G., Goyal V., Yadav, A., Aggarwal, N. K. 2012. Production of phytase by acido-thermophilic strain of *Klebsiella sp.* DB-3FJ711774.1 using orange peel flour under submerged fermentation. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, 10: 18-27
- Mitchell, D.B., K. Vogel, B. J. Weimann, L. Pasamontes, and A.P.G.M. Van Loon. 1997. The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. **Microbiology**, 143: 245-252.
- Mukesh, P., Suma, S., Singaracharya, M.A., Lakshmipathi, V. 2004. Isolation of phytate-hydrolysing microbial strains from traditional waste water of rice fermentation and liquid cattle feeds. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 20: 531–534.
- Mullaney, E.J. and Ullah, A.H.J. 2005. Conservation of cysteine residues in fungal histidine acid phytases. **Biochemical and Biophysical Reserach Communications**, 328: 404–408.
- Mullaney, E.J., Daly, C.B. and Ullah, A.H.J. 2000. Advances in phytase research. **Advances in Applied Microbiology**, 47: 157–199.
- Mullaney, E.J., Daly, C.B., Kim, T., Porres, J.M., Lei, X.G., Sethumadhavan, K. and Ullah, A.H.J. 2002 Site-directed mutagenesis of *Aspergillus niger* NRRL 3135 phytase at residue 300 to enhance catalysis at pH 4.0. **Biochemical and Biophysical Reserach Communications**, 297: 1016-1020.
- Nagashima, T., Tange, T., and Anazawa, H. 1999. Dephosphorylation of phytate by using the *Aspergillus niger* phytase with a high affinity for phytate. **Applied and Environmental Microbiology**, 65: 4682–4684.
- Nakamura, Y., Fukuhara, H. and Sano, K. 2000. Secreted phytase activities of yeasts. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 64: 841-844.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. 2004. Enzymes. Lehninger Principles of Biochemistry (Nelson, D.L., Cox, M.M). W. H. Freeman, p. 190-249, Madison.

- Nelson, T.S., Shieh, T.R., Wodzinski, R.J., and Ware, J.H. 1968. The availability of phytate phosphorus in soya bean meal before and after treatment with a mold phytase. **Poultry Science**, 47: 1842-1848.
- Odibo, F.J.C. and Ulbrich-Hofmann, R. 2001. Thermostable α -amylase and glucoamylase from *Thermomyces lanuginosus* F1 **Acta Biotechnology**, 21: 141-153.
- Oh, B.C., Chang, B.S., Park, K.H., Ha, N.C., Kim, H.K., Oh, B.H. and Oh, T.K. 2001. Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloloquefaciens* DS11. **Biochemistry**, 40: 9669–9676.
- Oh, B.C., Choi, W.C., Park, S., Kim, Y.O. and Oh, T.K. 2004. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phosphatase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 63: 362-372.
- Özler, A. 2009. Malatya kayısısından (*Prunus armeniaca* L.) pektinesteraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Palacios, M.C., Haros, M., Rosell, C.M., Sanz, Y. 2005. Characterization of an acid phosphatase from *Lactobacillus pentosus*: regulation and biochemical properties. **Journal of Applied Microbiology**, 98: 229-237.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A., and Nigam. P. 2001. SolidState Fermentation in Biotechnology. Asiatech Publishers, First edition, New Delhi,
- Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M. and van Loon, A.P.G.M. 1997. Gene cloning and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Applied Environmental Microbiology**, 63: 1696-1700.
- Persson, H., Türk, M., Nyman, M. and Sandberg, A.S.1998. Binding of Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Cd^{2+} to inositol tri-,tetra-, penta-, and hexaphosphates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46: 3194-3200.

- Phillippy, B.Q. and Wyatt, C.J. 2001. Degradation of phytate in foods by phytases in fruits and vegetable extracts. **Journal of Food Science**, 66: 535-539.
- Powar, V.K. and Jagannathan, V. 1982. Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, 151: 1102-1108.
- Quan, C., Zhang, L., Wang, Y., and Ohta, Y. 2001. Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 92: 154-160.
- Quan, C.S., Fan, S.D., Zhang, L.H., Wang, Y.J., and Ohta, Y. 2002. Purification and properties of a phytase from *Candida krusei* WZ-001. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 94: 419-425.
- Quan, C.S., Tian, W.J., Fan, S.D. and Kikuchi, Y. 2004. Purification and properties of a low-molecularweight phytase from *Cladosporium* sp. FP-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 94: 260-266.
- Raboy, V. 2001. Seeds for a better future: Low phytate grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. **Trends in Plant Science**, 6: 458-462.
- Ragon, M., Aumelas, A., Chemardin, P., Galvez, S., Moulin, G., Boze, H. 2008. Complete Hydrolysis of myo-inositol hexakisphosphate by a novel phytase from *Debaryomyces castellii* CBS 2923. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 78:47-53.
- Rao, B.M., Tanksale, M.A., Ghathe, S.M., and Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology**, 62: 597-635.
- Ravindran, V.B.W.K.E. 1995. Phytates: Occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. **Poultry and Avian Biology**, Review 6: 125-143.
- Reddy, N.R., Sathe, S.K., and Salunkhe, D.K. 1982. Phytases in legumes and cereals. **Advances in Food Research**, 28: 1-92.

- Rodriguez, E., Wood, Z.A., Karplus, P.A., and Lei, X.G. 2000. Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*. **Archives Biochemistry Biophysics**, 382: 105–112.
- Rojas, S.W., and Scott, M.L. 1969. Factors affecting the nutritive value of cottonseed meal as a protein source in chick diets. **Poultry Science**, 48: 819-835.
- Sajidan, A., Farouk, A., Greiner, R., Jungblut, P., Müller, E.C. and Borriss, R. 2004. Molecular and physiological characterization of a 3-phytase from soil bacterium *Klebsiella sp.* ASR1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 65: 110-118.
- Sandberg, A.S. 2002. Bioavailability of minerals in legumes. **British Journal of Nutrition**, 8: 281-285.
- Sandberg, A.S. and Andersson, H. 1988. Effect of dietary phytase on the digestion of phytate in the stomach and small intestine of humans. **Journal of Nutrition**, 118: 469-473.
- Sandberg, A.S., Andersson, H., Carlsson, N.-G., Sandstrom, B. 1987. Degradation products of bran phytate formed during digestion in the human small intestine: effect of extrusion cooking on digestibility. **Journal of Nutrition**, 117: 2061-2065.
- Sandstead, H.H. 1992. Fiber, phytates and mineral nutrition. **Nutrition Reviews**, 50: 30-31.
- Sano, K., Fukuhara, H., Nakamura, Y. 1999. Phytase of the yeast *Arxula adenivorans*. **Biotechnology Letters**, 21: 33-38.
- Sarı, O. 2006. Bezelye (pısum satıvum)'den lipoksijenaz enziminin saflaştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

- Sariyska M.V., Gargova S.A., Koleva L.A., Angelov A. I. 2005. *Aspergillus niger* phytase: purification and characterization. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, 3: 93-105.
- Schallmeyer, M., Singh, A. and Ward, O. P. 2004. Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. **Canadian Journal of Microbiology**, 50: 1-17.
- Scott, J.J., and Loewus, F.A. 1986. A calcium-activated phytase from pollen of *Lilium longiflorum*. **Plant Physiology**, 82: 333-335.
- Segueilha, L., Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G., and Galzy, P. 1992. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 74: 7-11.
- Selle, P.H., and Ravindran, V. 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, 135: 1-41.
- Selle, P.H., Gill, R.J., and 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., Caldwell, R.A., and Bryden, W.L. 2000. Phytate and phytase: Consequences for protein utilisation. **Nutrition Research Reviews**, 13: 255-278.
- Shah, V., Parekh, L.J. 1990. Phytase from *Klebsiella* sp. No. PG-2: purification and properties. **Indian Journal of Biochemistry Biophysics**, 27: 98-102.
- Shamsuddin, A.M. 1999. Metabolism and cellular functions of IP6: a review. **Anticancer Research**, 19: 3733-3736.
- Shamsuddin, A.M. 2002. Anti-cancer function of phytic acid. **International Journal of Food Science Technology**, 37: 769-782.
- Shieh, T.R., and Ware, J.H. 1968. Survey of microorganism for the production of extracellular phytase. **Journal of Applied Microbiology**, 16: 1348-1351.

- Shieh, T.R., Wodzinski, R.S. and Ware, J.H. 1969. Regulation of the formation of acid phosphatases by inorganic phosphate in *Aspergillus ficuum*. **Journal of Bacteriology**, 100: 1161-1165.
- Shimizu, M. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (nato) N-77. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 56: 1266-1269.
- Shimizu, M. 1993. Purification and characterisation of phytase and acid phosphatase produced by *Aspergillus oryzae* K1. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 57: 1364-1365.
- Shin, S., Ha, N.C., Oh, B.C., Oh, T.K., and Oh, B.H. 2001. Enzyme mechanism and catalytic property of β -propeller phytase. **Structure**, 9: 851-858.
- Simon, O, Igbasan F. 2002. In vitro properties of phytase from various microbial origins. **International Journal of Food Science and Technology**, 37: 813-822.
- Simons, P.C.M., Versteegh, H.A.J., Jongbloed, A.W., Kemme, P.A.P., Slump, K.D. Bos., Wolters M.G.E., Beudeker R.F., Verschoor, G.J. 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. **British Journal of Nutrition**, 64: 525-540.
- Singh, B. and Satyanarayana, T. 2008. Phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and its potential applications. **Bioresource Technology**, 99: 2824-2830.
- Singh, B., and Satyanarayana, T. 2009. Characterization of a HAP-phytase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*. **Bioresource Technology**, 100: 2046-2051.
- Skowronski, T. 1978. Some properties of partially purified phytase from *Aspergillus niger*. **Acta Microbiologica Polonica**, 27: 41-48.
- Soni, S.K., and 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.
- Soni, S.K., Magdum, A., Khire, J.M. 2010. Purification and characterization of two distinct acidic phytases with broad pH stability from *Aspergillus niger* NCIM 563. **World Journal Microbiology Biotechnology**, 26: 2009-2018
- Spier, M.R., Fendrich, R.C., Almeida, P.C., Nosedá, M., Greiner, R., Konietzny, U., Woiciechowski, A.L., Socol, V.T., Socol, C.R. 2011. Phytase produced on citric byproducts: purification and characterization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 27: 267-274.
- Staden, Van J., den Haan, R., van Zyl, W.H., Botha A. and Viljoen-Bloom M. 2007. Phytase activity in *Cryptococcus laurentii* ABO510. **Federation of European Microbiological Societies**, 7: 442-448.
- Sunitha, K., Kim, Y. O., Lee, J. K., and Oh, T.K. 2000. Statistical optimization of seed and induction conditions to enhance phytase production by recombinant *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**, 5: 51-56.
- Tahir, A., Mateen, B., Saeed, S., Uslu, H. 2010. Studies on the production of commercially important phytase from *Aspergillus niger* st-6 isolated from decaying organic soil. **Micología Aplicada Internacional**, 22: 51-57.
- Tambe, S.M., Kaklij, G.S., Kelkar, S.M., and Parekh, L.J. 1994. Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: evidence for unusually small active enzyme peptide. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 77: 23-27.
- Tang, J., Leung, A., Leung, C., Lim, B.L. 2006. Hydrolysis of precipitated phytate by three distinct families of phytases. **Soil Biology and Biochemistry**, 38: 1316-1324.
- Tekman, B. 2007. Gökkuşığı alabalık (*oncorhynchus mykiss*) karaciğer dokusundan glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı metallerin enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.

- Telefoncu, A. 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir.
- Thyagarajan, R., Namasivayam S.K.R. 2010. Influence of carbon source on phytase production by *Aspergillus niger*. **International Journal Of Biological Technology**, 1: 78-80.
- Tseng, Y.H., Fang, T.J., Tseng, S.M. 2000. Isolation and characterization of a novel phytase from *Penicillium simplicissimum*. **Folia Microbiology**, 45: 121-127.
- Türk, M., Sandberg, A.S., Carlsson, N.G., and Andlid, T. 2000. Inositol hexaphosphate hydrolysis by baker's yeast. Capacity, kinetics and degradation products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48: 100-104.
- Ullah, A.H.J, Sethumadhavan, K., Lei, X.G., Mullaney, E.J. 2000. Bio-chemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* phytase (phyA). **Biochemical and Biophysical Reserach Communications**, 275: 279-285
- Ullah, A.H.J. 1988. Production, rapid purification and catalytic characterization of extracellular phytase from *Aspergillus ficuum*. **Preparative Biochemistry**, 18: 443-458.
- Ullah, A.H.J. and Cummins, B.J. 1987. Purification, N-terminal amino acid sequence and characterization of pH 2.5 optimum acid phosphatase (E.C.3.1.3.2) from *Aspergillus ficuum*. **Preparative Biochemistry**, 17: 397-422.
- Ullah, A.H.J. and Phillippy, B.Q. 1988. Immobilization of *Aspergillus ficuum* phytase: product characterization of the reactor. **Preparative Biochemistry**, 18: 483-489.
- Ullah, A.H.J. and Sethumadhavan, K. 1998. *Myo*-inositol hexasulfate is a potent inhibitor of *Aspergillus ficuum* phytase. **Biochemical and Biophysical Reserach Communications**, 251: 260-263.

- Ullah, A.H.J., and Gibson, D. 1987. Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8.) from *Aspergillus ficuum* 3135: purification and characterization. **Preparative Biochemistry**, 17: 63-91.
- Ullah, A.H.J., Mullaney, E.M., and Dischinger, H.C. 1994. The complete primary structure elucidation of *Aspergillus ficuum* (*niger*), pH 6.0, optimum acid phosphatase by Edman degradation. **Biochemical and Biophysical Reserach Communications**, 203: 182-189
- Van Beilen, J.B., Li, Z. 2002. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, 13: 338-344.
- Van der Kaay, J., and Van Haastert, P.J.M. 1995. Stereospecificity of inositol hexakisphosphate dephosphorylation by *Paramecium* phytase. **Biochemical Journal**, 312: 907-910.
- Van Etten, R.L. 1982. Human prostatic acid phosphatase: a histidine phosphatase. **Annals of the New york Academy of Science**, 390: 27-51.
- Van Etten, R.L., Davidson, R., Stevis, P.E., MacArthur, H. and Moore, D.L. 1991 Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, 266: 2313-2319.
- Van Hartingsveldt, W., C.M.J., Van Zeijl, M. Harteveld, R.J., Gouka, M.E.G., Suykerbuyk, R.G.M., Luiten, P.A., Van Paridon, G.C.M., Selten, A.E., Veenstra, R.F.M., Van Gorcom, and C.A.M.J.J. Van den Hondel. 1993. Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (phyA) of *Aspergillus niger*. **Gene**, 127: 87-94.
- Vats, P. and Banerjee, U.C. 2004. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphates phosphohydrolases): An overview, **Enzyme and Microbial Technology**, 35: 3-14.
- Vats, P., and Banerjee, U.C. 2002. Studies on the production of phytase by a newly isolated strain of *Aspergillus niger* var teigham obtained from rotten wood-logs. **Process Biochemistry**, 38: 211-217.

- Vats, P., and Banerjee, U.C. 2005. Biochemical characterisation of extracellular phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) from a hyper-producing strain of *Aspergillus niger* van Teighem. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 32: 141-147.
- Viveros, A., Centeno, C., Brenes, A., Canales, R., and Lozano, A. 2000. Phytase and acid phosphatase activities in plant feedstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48: 4009-4013.
- Vohra, A., and Satyanarayana, T. 2001. Phytase production by the yeast, *Pichia anomala*. **Biotechnology Letters**, 23: 551-554.
- Vohra, A., and Satyanarayana, T. 2002. Purification and characterization of a thermostable and acid-stable phytase from *Pichia anomala*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 18: 687-691.
- Vohra, A., and Satyanarayana, T. 2003. Phytases: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, 23: 29-60.
- Volfova, O., Dvorakova, J., Hanzlikova, A., Jandera, A. 1994. Phytase from *Aspergillus niger*. **Folia Microbiologica**, 9: 481-484.
- Walker, A.R.P., and Walker, B.F. 1992. Fiber, phytic acid and mineral metabolism. **Nutrition Reviews**, 50: 246-247.
- Wang, H.L., Swain, E.W. and Hesseltine, C.W. 1980. Phytase of molds used in oriental food fermentation. **Journal of Food Science**, 45: 1262-1266
- Wang, X.Y., Meang, F.G. and Zhou, H.M. 2004. The role of disulfide bonds in the conformational stability and catalytic activity of phytase. **Biochemistry Cell Biology**, 82: 329-334.
- Weremko, D., Fandrejewski, H., Zebrowska, T., Han, K., Kim, J.H., and Cho, W. T. 1997. Bioavailability of phosphorus in feeds of plant origin for pigs Review. **Asian-Australians Journal of Animal Sciences**, 10: 551-566.
- Whitehurst, R.J., van Oort, M. 2010. Enzymes in Food Technology. Wiley-Blackwell, pp. 388, USA.

- Wise, A., and Gilbert, D. J. 1982. Phytate hydrolysis in germfree and conventional rats. **Applied Environmental Microbiology**, 43: 753–756.
- Wiseman, A. 1987. **The Application of Enzymes in Industry**. Handbook of Enzym Biotechnology (Wiseman, A.), John Wiley Sons, p:274-373, New york.
- Wodzinski, R.J., and Ullah, A.H.J. 1996. Phytase. **Advances in Applied Microbiology**, 42: 263-303.
- Wolfgang, A. 2004. Enzymes in industry: Production and applications. Wileyvch Verlag GmbH&Co. KgaA, pp 485, Weinheim.
- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Rémy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehmann, M. and van Loon, A.P.G.M. (1999a). Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Catalytic properties. **Applied Environmental Microbiology**, 65: 367-373.
- Wyss, M., Pasamontes, L., Friedlein, A., Rémy, R., Tessier, M., Kronenberger, A., Middendorf, A., Lehmann, A., Scnoebelen, L., Röthlisberger, U., Kuszniir, E., Wahl, G., Müller, F., Lahm, H.W., Vogel, K. and van Loon, A.P.G.M. (1999b) Biophysical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. **Applied Environmental Microbiology**, 65: 359-366.
- Yamada, K., Minoda, Y., Yamamoto, S. 1968. Phytase from *Aspergillus terreus*. Part I. Production, purification and some general properties of the enzyme. **Agriculturel Biology Chemistry**, 32: 1275-1282.
- Yamamoto, S., Minoda, Y., and Yamada, K. 1972. Chemical and physicochemical properties of phytase from *Aspergillus terreus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, 36: 2097-2103.
- Yanke, L. J., Bae, H.D., Selinger, L. B. and Cheng, K. J. 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. **Microbiology**, 144: 1565-1573.

- Yanke, L. J., Selinger, L. B. and Cheng, K. J. 1999. Phytase activity of *Selenomonas ruminantium*: a preliminary characterization. **Letters in Applied Microbiology**, 29: 20-25.
- Yoon, S.J., Choi, Y.J., Min, H.K., Cho, K.K., Kim, J.W., Lee, S. C., Jung, Y. H. 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, 18: 449-454.
- Zhang, G.Q., Dong, X.F., Wang, Z.H., Zhang, Wang, Q.H.X., Tong, J.M. 2010. Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. **Bioresource Technology**, 101: 4125-4131.
- Zhao, J., Li, X. Qu, Y. 2006. Application of enzymes in producing bleached pulp from wheat straw. **Bioresource Technology**, 197: 1470-1476.
- Zinin, N.V., Serkina, A.V., Gelfand, M.S., Shevelev, A.B. and Sinepky, S.P. 2004. Gene cloning, expression and characterization of novel phytase from *Obesumbacterium proteus*. **FEMS Microbiology Letters**, 236: 283-290.
- Zubay, G. 1988. Biochemistry. Machmillon Publishing Company, 866 Third Avenue, New York 10022, pp.131-414, ISBN-0-22-432080-3.
- Zyla, K., Leudoux, D.R. and Veum T.L., 1995. Complete enzymic dephosphorylation of cornsoybean meal feed under simulated intestinal conditions of the turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 43: 288-294.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Gamze Sevri Ekren

Doğum Yeri ve Tarihi : Aydın/ 31. 05. 1987

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Ege Üniversitesi

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİM FAALİYETLERİ

A) Uluslararası Bildiriler

1. Fitaz üreten fungustan enzimin üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu.

Gamze Sevri EKREN, Kubilay METİN

13. European Biotechnology Congress, Bratislava, SLOVAKİA

B) Katıldığı Projeler

a. Adnan Menderes Üniversitesi Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı tarafından desteklenen ve 2012 yılında başlatılan “*Aspergillus* sp.’den Fitaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” (FEF-13011) adlı kişisel araştırma projesi Doç. Dr. Kubilay Metin ve Yüksek Lisans öğrencisi Sedef Soyal ile birlikte halen devam etmektedir.

İLETİŞİM

E-posta Adresi : gmz-svr@hotmail.com

Tarih : 27.06.2013