***Bacillus invictae* ve *Lactobacillus kefiri'* DEN MANNANAZ VE FİTAZ ENZİMLERİNİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI ve KARAKTERİZASYONU**

Şeyma ALIM

Yüksek Lisans Tezi
Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ
Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı
2021
(Her hakkı saklıdır)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bacillus invictae ve *Lactobacillus kefiri'* DEN MANNANAZ VE FİTAZ ENZİMLERİNİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

(Partial Purification and Characterization of Mannanase and Phytase Enzymes From *Bacillus invictae* and *Lactobacillus kefiri*)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şeyma ALIM

Danışman: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Erzurum

Haziran, 2021

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Bacillus invictae ve *Lactobacillus kefiri*' DEN MANNANAZ VE FİTAZ ENZİMLERİNİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ danışmanlığında, Şeyma ALIM tarafından hazırlanan bu çalışma, 28/06/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Doç. Dr. Kenan KARAGÖZ *Ağrı İbrahim Çeçen ÜNİVERSİTESİ*	Aslı ıslak imzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ *Atatürk Üniversitesi*	Aslı ıslak imzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Merve ŞENOL KOTAN *Atatürk Üniversitesi*	Aslı ıslak imzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü

Aslı ıslak imzalıdır

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

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Natural and Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ danışmanlığında sunulan *Bacillus invictae* ve *Lactobacillus kefiri*'DEN MANNANAZ VE FİTAZ ENZİMLERİNİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	**24**	**30**
Kuramsal Temeller	**19**	**30**
Materyal ve Yöntem	**20**	**35**
Bulgular	**8**	**20**
Tartışma	**7**	**20**
Tezin Geneli	**19**	**25**

Not: *Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının* ***%5'den*** *büyük olmaması gerekir.*

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	**Tez Danışmanı**
Şeyma ALIM	Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ
28.6.2021	**28.6.2021**
İmza: Aslı ıslak imzalıdır	İmza: Aslı ıslak imzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve …… sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun …./…/…. tarih ve …… sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

Not: Bu form, Tezin son şekline uygun olarak bilgisayar ortamında doldurulmalı, çıktısı imzalanıp Tezin sonuna eklenmelidir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarı ve Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezi (DAYTAM)'nde gerçekleştirilmiştir.

Bütün çalışmalarım süresince anlayışını, sabrını ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve deneyimleri ile bu yolda bana öncü olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ'a,

Laboratuvar çalışmalarımın her aşamasında, benden yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans arkadaşlarım Sevda UÇAR ve Yusuf Can ORMAN'a

Yaşamım boyunca her türlü destek ve teşviklerini esirgemeyen, takıldığım her engelde arkamda duran ve sonsuz sabır gösteren aileme sonsuz teşekkürler.

Şeyma ALIM

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bacillus invictae ve *Lactobacillus kefiri*' DEN MANNANAZ VE FİTAZ ENZİMLERİNİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Şeyma ALIM

Danışman: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Amaç: Stok kültürden alınan 15 farklı bakterinin fitaz ve mannanaz enzimlerini üretebilme yeteneklerinin belirlenmesi, bu bakterilerden yüksek enzim aktivitesine sahip olanların seçilerek fitaz ve mannanaz enzimlerinin kısmi saflaştırılması, ZnO nanopartiküllerine immobilize edilerek serbest haldeki enzimlerle (fitaz, mannanaz) karşılaştırılması ve endüstriye kazandırılabilirliğinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Yöntem: Test edilen 15 farklı bakteri geliştirildikten sonra bakterilerin mannanaz ve fitaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. En iyi aktivite gösteren iki bakteri seçilmiştir. Bu bakterilerden mannanaz ve fitaz enzimleri kısmi saflaştırılmış ve çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerine immobilize edilmiştir. İmmobilizasyonun varlığını kontrol etmek amacıyla, FTIR, SEM ve XRD ölçümleri yapılmıştır. İmmobilize ve serbest enzimlerin optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir.

Bulgular: En iyi fitaz ve mannanaz aktivitesi gösteren bakteriler sırasıyla *L. kefiri* (10.217 EU/mL) ve *B. invictae* (0,461 EU/mL) olarak belirlenmiştir. *L.kefiri* ve *B. invictae*'den kısmi olarak saflaştırılan serbest ve immobilize (ZnO) fitaz ve mannanaz enzimlerinin optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla pH 5 ve pH 6-7; 70-80 ºC ve 40-50 ºC olarak belirlenmiştir. İmmobilize enzimlerin karakterizasyonu FTIR, SEM ve XRD ile yapılmış ve immobilizasyonun başarılı olduğu sonucuna varılmıştır.

Sonuç: Her iki bakteri tarafından salgılanan enzimlerin asidik ve nötr pH'ya yakın ve yüksek sıcaklıkta kararlı bir yapıda olduğu, fitaz ve mannanaz enziminin ZnO nanopartikülüne immobilizasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği belirlenmiştir. Her iki enziminde endüstriyel uygulamalarda çeşitli biyoproseslerde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakteri, Kısmi Saflaştırma, Fitaz, Mannanaz, İmmobilizasyon

Haziran 2021, 89 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

PARTIAL PURIFICATION and CHARACTERIZATION of MANNANASE and PHYTASE ENZYMES from *Bacillus invictae* and *Lactobacillus kefiri*

Şeyma ALIM

Supervisor: Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Purpose: It is aimed to determine the ability of 15 different bacteria taken from the stock culture to produce phytase and mannanase enzymes, to select the ones with high enzyme activity from these bacteria and to partially purify phytase and mannanase enzymes, to compare them with free enzymes (phytase, mannanase) by immobilizing them on ZnO nanoparticles and to investigate their industrial availability.

Method: After developing 15 different bacteria tested, mannanase and phytase enzyme activities of the bacteria were determined. The two bacteria with the best activity were selected. Mannanase and phytase enzymes from these bacteria were partially purified and immobilized to zinc oxide (ZnO) nanoparticles. FTIR, SEM and XRD measurements were made to check for the presence of immobilization. Optimum pH and temperature values of immobilized and free enzymes were determined.

Result: The bacteria with the best phytase and mannanase activity were determined as *L. kefiri* (10.217 EU/mL) and *B. invictae* (0.461 EU/mL), respectively. Optimum pH and temperature values of free and immobilized (ZnO) phytase and mannanase enzymes partially purified from *L. kefiri* and *B. invictae* were pH 5 and pH 6-7, respectively; It is determined as 70-80 ºC and 40-50 ºC. Characterization of immobilized enzymes was done with FTIR, SEM and XRD and it was concluded that the immobilization was successful.

Conclusion: It was determined that the enzymes secreted by both bacteria were stable at acidic and neutral pH and at high temperature, and the immobilization of phytase and mannanase enzymes into ZnO nanoparticles was successfully performed. It has been determined that both enzymes have the potential to be used in various bioprocesses in industrial applications.

Keywords: Bacteria, Partial Purification, Phytase, Mannanase, Immobilization

Jun 2021, 89 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZET iv
ABSTRACT v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR DİZİNİ viii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ x
GİRİŞ 1
Enzimler ve Tarihçesi 2
Enzimlerin Yapısal Özellikleri 3
Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler 5
Sıcaklık 5
Ortam pH'sı 5
Enzim konsantrasyonu 6
Substrat konsantrasyonu 6
Reaksiyon süresi 7
Enzim inhibitörleri 7
Enzim aktivatörleri 9
Fitaz ve Fitik Asit 9
Fitaz enziminin kaynakları 12
Fitaz enziminin endüstrideki kullanım alanları 14
Mannan ve Mannanaz Enzimi 17
Mannanaz ve mikrobiyal mannanaz enzimi 19
Mannanaz enziminin endüstrideki kullanım alanları 20
Enzim İmmobilizasyonu 23
KURUMSAL TEMELLER 26
MATERYAL VE METOD 36
Materyal 36
Çalışmada Kullanılan Alet ve Ekipmanlar 36
Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler 36
Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı 37

Metod 39
Bakteri strainleri 39
Bakterilerin geliştirilmesi 39
Bakterilerin enzim (Mannanaz, fitaz) aktivitelerinin belirlenmesi 40
Mannanaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi 40
Fitaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi 40
Mannanaz ve fitaz enzimlerinin kısmi saflaştırılması 41
Enzimlerin ZnO nanapartiküllerine immobilizasyonu 41
İmmobilize ve serbest enzimlerin optimum sicaklik değerlerinin belirlenmesi 42
İmmobilize ve serbest enzimlerin optimum pH değerlerinin belirlenmesi 42
İmmobilize enzimlerin karakterizasyonu 42
ARAŞTIRMA BULGULARI 44
Bakterilerin Enzim (Mannanaz, Fitaz) Aktivitelerinin Belirlenmesi 44
Mannanaz ve Fitaz Enzimlerinin Kısmi Saflaştırılması 45
FTIR Analizi 46
XRD Analizi 50
SEM Analizi 52
İmmobilize ve Serbest Enzimlerin Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi 56
İmmobilize ve Serbest Enzimlerin Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi 57
TARTIŞMA VE SONUÇ 58
KAYNAKLAR 64
ÖZGEÇMİŞ 77

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Bazı Mikrobiyal Fitaz Kaynakları ve Özellikleri. 14
Tablo 2. Test Edilen 15 Farklı Bakterinin Mannanaz ve Fitaz Aktivite Sonuçları 44
Tablo 3. Amonyum Sülfat Doygunluk Aralıkları 46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Enzimlerin yapısı 4
Şekil 2. Anahtar kilit modeli-İndüklenmiş uyum modeli 4
Şekil 3. Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi 5
Şekil 4. pH'nın enzim aktivitesine etkisi 6
Şekil 5. Enzim konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi 6
Şekil 6. Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi 7
Şekil 7. İnhibitörlerin gruplandırılması 7
Şekil 8. Tersinir enzim inhibisyon çeşitleri 8
Şekil 9. Allosterik inhibitörlerin çalışma mekanizması 9
Şekil 10. A. Fitik asitin 2 boyutlu kimyasal yapı görüntüsü, B. Fitik Asitin 3 boyutlu kimyasal yapı görüntüsü 10
Şekil 11. Fitik asitin 3-fitaz ve 6-fitaz enzimleri ile hidrolizi 12
Şekil 12. *Trichoderma reesei* baktersinden izole edilmiş β-manannazın üç boyutlu yapısı 19
Şekil 13. Enzim immobilizasyon yöntemleri 24
Şekil 14. Ekim yapılan bakteri görüntüleri 40
Şekil 15. Test edilen 15 farklı bakterinin mannanaz aktivite sonuçları 45
Şekil 16. Test edilen 15 farklı bakterinin fitaz aktivite sonuçları 45
Şekil 17. Mannanaz ve Fitaz Enzimlerinin amonyum sülfat çöktürme aralıklarındaki enzim aktiviteleri 46
Şekil 18. ZnO nanopartikülünün FTIR görüntüsü 48
Şekil 19. Fitaz enziminin FTIR görüntüsü 48
Şekil 20. Fitaz immobilize ZnO nanopartikülünün FTIR görüntüsü 49
Şekil 21. Mannanaz enziminin FTIR görüntüsü 49
Şekil 22. Mannanaz immobilize ZnO nanopartikülünün FTIR görüntüsü 50
Şekil 23. Saf ZnO parçaıklarının ve immobilize fitaz enziminin XRD spektrumları. 51
Şekil 24. Saf ZnO parçaıklarının ve immobilize mannanaz enziminin XRD spektrumları. 51
Şekil 25. ZnO nanopartikülünün SEM görüntüsü 53
Şekil 26. Fitaz immobilize ZnO nanopartikülünün SEM görüntüsü 54
Şekil 27. Mannanaz immobilize ZnO nanopartikülünün SEM görüntüsü 55
Şekil 28. İmmobilize ve serbest fitaz enzimine sıcaklığın etkisi 56
Şekil 29. İmmobilize ve serbest mannanaz enzimine sıcaklığın etkisi 56
Şekil 30. İmmobilize ve serbest mannanaz enzimine pH'nın etkisi 57
Şekil 31. İmmobilize ve serbest fitaz enzimine pH'nın etkisi 57

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

% : Yüzde

°C : Santigrat derece

µL : Mikrolitre

Å : Ångström

AFM : Atomik kuvvet mikroskobu

dH$_2$O : Distile su

dk : Dakika

DNSA : 3,5-Dinitrosalicylic acid

EU/mL : Enzim Ünitesi/mililitre

FTIR : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

g : Gram

HCl : Hidroklorik asit

KBr : Potasyum Bromür

L : Litre

LAB : Laktik Asit Bakterisi

M : Molar

mg : Miligram

mL : Mililitre

mM : Milimolar

NaOH : Sodyum hidroksit

nm : Nanometre

rpm : Dakikada devir sayısı

SEM : Taramalı elektron mikroskobu

TCA : Trikloroasetik Asit

Tris : Tris (hydroxymethyl) aminomethane

XRD : X Işını Kristalografisi

β : Beta

GİRİŞ

Son yıllarda hızla artan sanayileşme sürecinde gıda, tekstil, ilaç, kimya, kâğıt gibi endüstriyel alanlar ön plana çıkmaktadır. Sanayinin gelişmesi ile birlikte ortaya çıkardığı zararlı yan ürünlerin ve atıkların arıtılması için yeni nesil çalışmalar yapılmaktadır (Kıran vd 2006). Bu dezavantajların daha da azaltılması için endüstriyel enzimleri kullanmak birçok yönden önemlidir.

Enzimler, canlı organizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran, protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Hücrelerde yaşamın sürdürülmesi için çok önemli görevleri olan enzimler, hücreden çıkarak ekonomik ve günlük hayatın yanı sıra sanayide de kullanılmaya başlamıştır (Kıran vd 2006).

Enzimler kompleks organik polimerler olmakla birlikte yüksek moleküllü, genellikle stereo selektif biyokatalizörler olarak etki gösterirler. Günümüzde enzimlerin endüstriyel kullanımları giderek artmaktadır. Bu enzimler bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar olmak üzere üç kaynaktan elde edilirler. Bu kaynaklar arasındaki en önemli grup mikroorganizmalar olarak görülmektedir (Kızılkaya 2018). Mikroorganizmaların enzim kaynağı olarak daha fazla kullanılmalarının nedeni, bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, daha ucuz olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları ve yüksek oranlarda saf olarak elde edilebilmeleridir (Burg 2003). Mikroorganizma kaynaklı enzimlere örnek olarak fitaz, lipaz, mannanaz, selülaz, ksilanaz, amilaz, alkalin proteazlar ve diğer proteazlar gibi enzimler verilebilir. Enzimler, başta gıda sanayisi olmak üzere, kâğıt ve kâğıt hamuru üretiminde, deri işlenmesinde, ziraatte, deterjan üretiminde, tekstil endüstrisinde ve kimya endüstrisi gibi birçok endüstriyel alanda kullanılır. Ayrıca tıpta tanı ve tedavide de geniş bir kullanım alanına sahiptirler (Kirk et al. 2002). Enzim kaynağı olarak kullanılan bu mikroorganizmalar sadece enzim üretebilme yeteneklerine göre değil, patojenik ve toksik özelliklerine göre de seçilmektedir.

Mikrobiyal enzimlerin, endüstriyel uygulamalar için farklı mikroorganizma kaynaklarından elde edilen üstün enzimler olduğu bilinmektedir. Mikrobiyal enzimler, ekonomik fizibiliteleri, yüksek verimleri, ürün modifikasyon ve optimizasyonlarının kolaylığı, uygun olmayan ortamlarda bakterilerin hızlı büyümesi, stabilitesi ve daha fazla katalitik aktivitesi nedeniyle tercih edilmektedir (Gurung et al. 2013). Mikrobiyal enzimler 20. yüzyılda keşfedilmiş olsalar da izolasyon, karakterizasyon, üretim ve biyo-endüstride uygulamaları ile ilgili çalışmalar sürekli ilerlemiş ve bilgiler düzenli olarak güncellenmiştir. Bakteriler, küf ve

mayalar ticari uygulamalar için çeşitli enzimlerin ekonomik olarak uygun preparatlarının biyo-sentezi için incelenmiştir (Nigam 2013). Biyokatalizörleri kullanan katalitik reaksiyonlarda, enzimlerin serbest veya immobilize formlarda kullanılması enzimin özgüllüğüne bağlıdır (Chirumamilla et al. 2001).

Endüstriyel enzimlerin üretimindeki biyoteknolijik çalışmaların artmasının temel sebepleri, üretilen ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin artmasından kaynaklanmaktadır. Enzimlerin %15'inin yem sanayisinde, %29'unun gıda sektöründe ve %56'sının ise genel teknik alanlarda kullanıldığı görülmektedir (Kirk et al. 2002; Schallmey et al. 2004). Özellikle stratejik bir alan olan rekombinant DNA tabanlı enzim üretim teknolojisi hızla büyüyerek endüstride kullanımı giderek artmıştır (Gessese 1998; Gurung et al. 2013).

Mikroorganizmaların salgıladığı enzimler intraselüler ve ekstraselüler olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. Ekstraselüler enzimler; hücre içinde sentezlendikten sonra dışarı salınarak besinleri parçalayıp mikroorganizmalar tarafından kullanılabilir forma dönüştüren enzimlerdir. Ekstraselüler enzimlere, genel olarak hidrolazlar adı verilmektedir (Sümengen 2011). İntraselüler enzimler de hücre içinde sentezlenmelerine karşın, dışarı çıkmayarak burada dissimilasyon ve assimilasyon reaksiyonlarında etkinlik gösterirler. Bu enzimlerin substratları karboksilik asit, aminoasit ve şekerler gibi moleküler ağırlığı küçük olan, hücre zarından geçebilen bileşiklerdir. Ekstraselüler enzimlerin stabilitesi intraselüler enzimlere göre daha yüksektir ve çevre şartlarına karşı aktivitelerini uzun süre koruyabilirler (John 1987; Furlan and Pant 2006).

Enzimler ve Tarihçesi

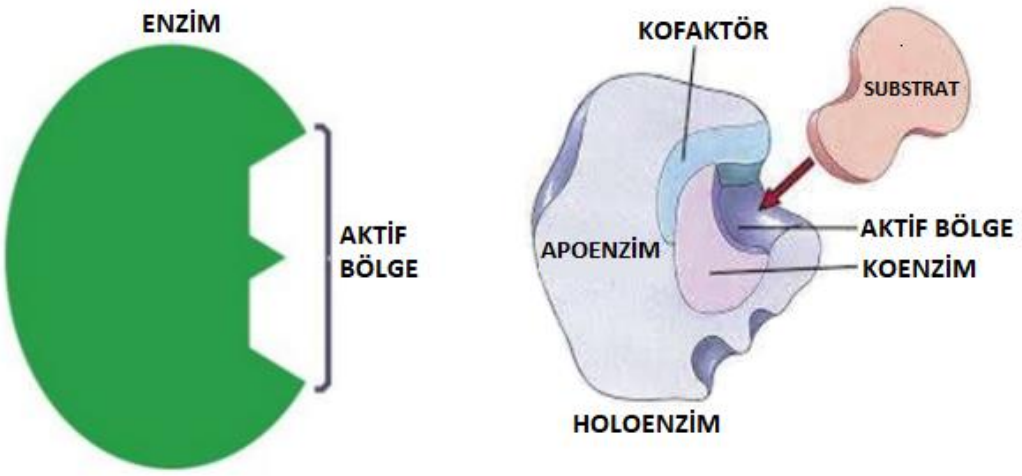
Enzimler; hidrojen, azot, oksijen ve karbondan oluşan, hücrelerde gerçekleşen kimyasal reaksiyonların hızını artıran ve bir molekülü diğer bir moleküle dönüştüren biyolojik katalizörlerdir. Bu reaksiyonlar tüm canlı organizmaların metabolizmasının temelini oluşturarak endüstrinin verimli ve ekonomik biyokatalitik dönüşümlerini destekler (Beilen and Li 2002). Katalizleme işlevini enzim yapısını bozmadan yerine getirir (Karademir vd 2002; Lehninger et al. 2004).

Biyolojik katalizörlerin varlığı ilk olarak 18. yüzyılın sonlarına doğru etin mide salgısı aracılığıyla sindirilmesi için yapılan çalışmalarla tanımlanmış ve 19. yüzyılda nişastanın tükürük ve çeşitli bitki ekstraktları aracılığıyla parçalanmasının araştırılması ile devam etmiştir. Fransız bilim adamı Reamur 18.yüzyılda atmacalarda yaptığı araştırmalarda mide suyunun birtakım besinleri parçaladığını, fakat kemik gibi sert maddeleri sadece yumuşattığı ayrıca bitki kökenli besinleri parçalayamadığını saptayarak enzim spesifikliğini göstermiştir (Buxbaum,

2007). 1850'lerde Louis Pasteur, şekerin alkole fermentasyonunun "ferment" adını verdiği organizmalarla katalizlendiği ve bunların hücrelerin yapılarından ayırt edilemeyeceği sonucuna varmıştır. Bu görüş, 1897'de Eduard Buchner'in maya (yeast) hücre özütünün şekeri alkole fermente ettiğini kanıtlayana kadar devam etmiştir. 1878'de Frederick W. Kühne bu moleküllere (fermentlere) *in yeast* anlamına gelen 'enzim' adını vermiştir. 1922-1928 yılları arasındaki çalışmalarında Willstaetter ve arkadaşları, günümüzde de kullanılan ilk saflaştırma çalışmalarına başlamışlardır. 1926'da James Summer'ın saf kristal üreazı elde etmesiyle enzim çalışmaları hız kazanmıştır. Summer, üreazın tamamen proteinden meydana geldiğini belirterek bütün enzimlerin protein yapısında olduklarını ileri sürmüştür. 1930'larda Summer'ın vardığı sonuç John Northrop ve Moses Kunitz'ın tripsin, pepsin ve diğer sindirim enzimlerini kristalize edip protein yapıda olduklarını belirledikten sonra kabul görmüştür. Yirminci yüzyılın sonlarından itibaren enzimler ile ilgili çalışmalar artmıştır. Bu çalışmalar; binlerce enzimin saflaştırılmasına ve kimyasal yapısının açıklanmasına yol açmıştır (Lehninger et al. 2004).

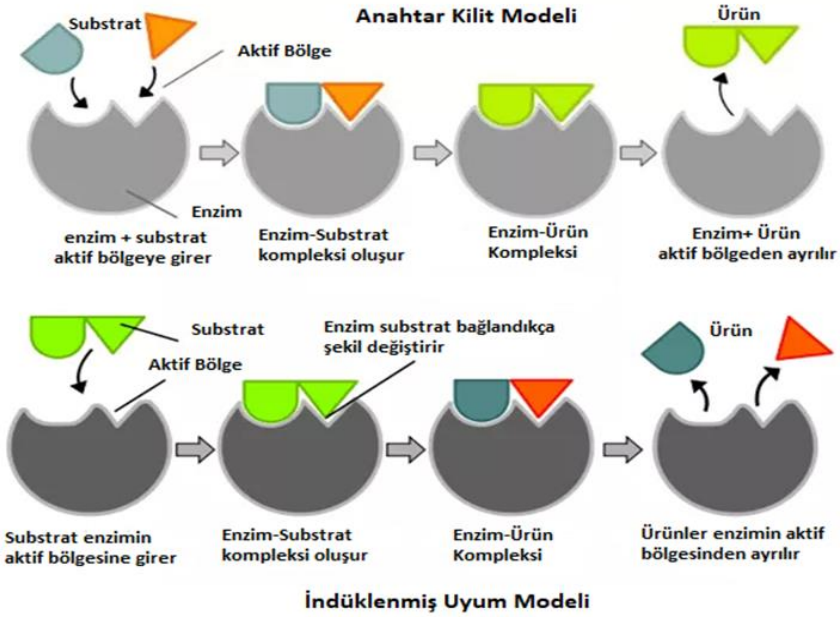
Enzimlerin Yapısal Özellikleri

Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç bütün enzimler protein yapıdaki moleküllerdir. Enzimler yapı ve işlevleri bakımından iki gruptan oluşmaktadırlar. Bunlar; "Koenzim/Kofaktör" ve "Apoenzim" dir. Enzimlerin protein kısmına *"***Apoenzim***"* denir. Apoenzim; enzimin belirli reaksiyonları hızlandırmasını sağlayan yani enzimin spesifikliğini belirleyen kısmıdır. Bu grup ısı ile kolayca denatüre olabilmektedir. Bazı enzimler, işlevlerini protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bazıları da aktivite gösterebilmek için, protein yapısında olmayan organik bileşiğe veya metal iyonuna bazen de her ikisine birden ihtiyaç duyarlar. Metal iyonlarından oluşan ve enzimlerin aktivite göstermeleri için gerekli olan gruplara **"kofaktör"** denilmektedir. Katalitik olarak aktif olan enzim-kofaktör kompleksine **"haloenzim"**, kofaktörsüz enzime ise **"apoenzim"** denir. Koenzimlerin yapısında çoğunlukla vitaminler bulunmaktadır. Üretildikten sonra görevlerini bitirmek için hücre dışına salınan enzimlere **"ekzoenzimler"** ve hücre içinde kalanlara ise, **"endoenzimler"** adı verilir. Katalizledikleri reaksiyon aynı olan farklı protein yapısındaki enzimlere ise, **"izoenzim"** veya **"izozim"** adı verilmektedir (Maruta et al. 2010).



Şekil 1. Enzimlerin yapısı (Anonim 2021a)

Enzimin etki ettiği bileşiğe **"substrat"**, reaksiyon sonunda oluşan maddeye ise **"ürün"** adı verilir. Enzim ile substratın bağlanması ile ilgili 2 model ileri sürülmüştür. Anahtar kilit modelinde, enzimin aktif bölgesine substrat bağlanırken anahtar kilit gibi bir yapı gösterdiği kabul edilir. İndüklenmiş-uyum modelinde ise; enzim substrat olmadığında serbest halde bulunur. Enzimin aktif merkezi substrat varlığında, substra uygun olarak şekillenir. Enzim substrata aktif bölgeden bağlandığı zaman substrat-enzim bileşiği (SE) oluşur ve substrat ürüne dönüşür. Substrat parçalandığında ve reaksiyon sona erdiğinde enzim değişmeden ayrılır. Enzimler genellikle çift yönlü çalışır yani geri dönüşümlüdür (Lehninger et al. 2004;). Enzimler, ürüne dönüştürdükleri substratlara ve katalizledikleri reaksiyon türlerine karşı spesifiktirler.

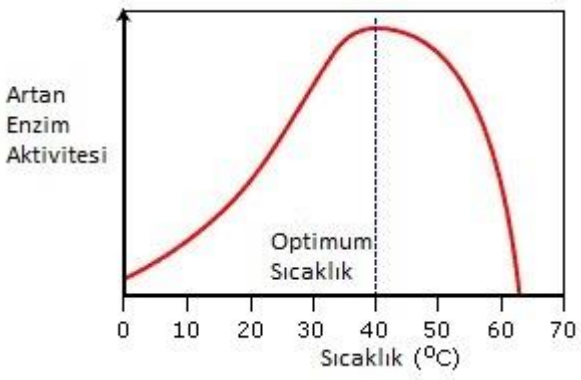


Şekil 2. Anahtar kilit modeli-İndüklenmiş uyum modeli (Anonim 2021b)

Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler

Sıcaklık

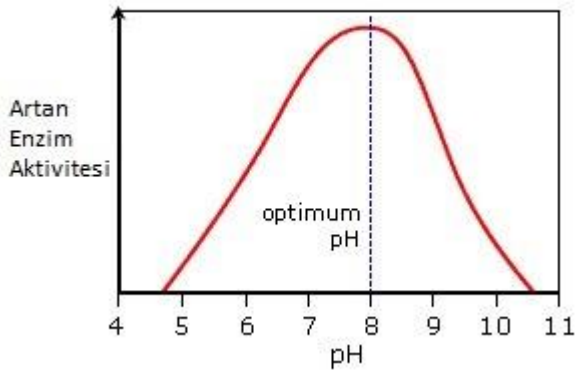
Sıcaklık enzimlerin hızını ve stabilitesini etkileyen önemli bir faktördür. Diğer tüm koşulların sabit olduğu durumlarda (özellikle pH'nın tampon kullanılarak sabit tutulduğu ortamlarda), reaksiyon ortamının sıcaklığı arttıkça moleküller arası çarpışmanın artışına bağlı olarak genellikle reaksiyon hızı da belli bir noktaya kadar artmaktadır. Bu noktadan sonra enzim hızında ani düşüşler oluşmaktadır. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri bu noktaya optimum sıcaklık adı verilir. Enzimler protein yapısında bulundukları için optimum sıcaklığın üzerinde molekül içi veya arası bağların kopmasıyla üç boyutlu yapılarını kaybederek denatüre olurlar ve bu nedenle reaksiyon hızında düşüş meydana gelir. Birçok hayvansal enzimin optimum sıcaklığı 40-50^{o} C arasında iken bitkisel kaynaklı enzimlerde ise 50-60^{o} C arasındadır.



Şekil 3. Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi

Ortam pH'sı

Enzimin reaksiyon hızı, ortamın pH'sine bağlıdır. Enzimler genellikle belirli bir pH değerinde en yüksek aktiviteyi gösterirler. Bu pH'ya enzimin optimum pH'sı denir. Enzimlerin optimum pH'ları 2-10 arasında değişmektedir. Optimum pH'nın altında ve üstünde enzim aktivitesi düşer. Ayrıca kuvvetli asitler ve bazlar enzimlerin yapısını bozarak çalışmalarını engeller (Aehle 2004; Lehninger et al. 2004).



Şekil 4. pH'nın enzim aktivitesine etkisi

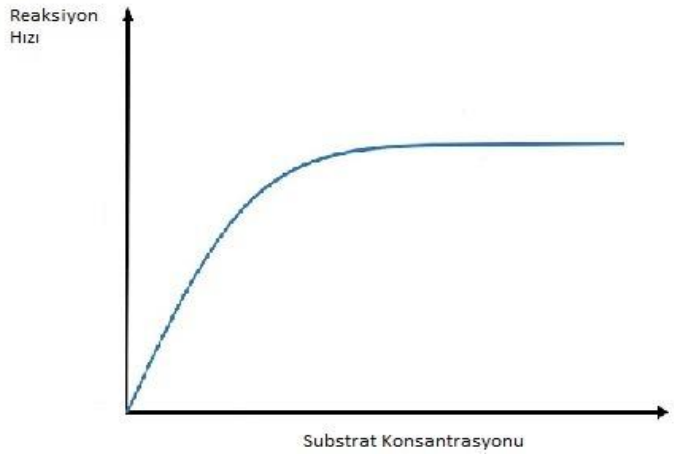
Enzim konsantrasyonu

Enzim konsantrasyonu enzimatik reaksiyonların hızına etki eder. Diğer koşullar sabit tutulduğunda enzim konsantrasyonunun enzim hızına etkisi doğrusal bir ilişki gösterir. Ortamda yeterli substrat olduğu sürece ne kadar çok enzim molekülü varsa reaksiyon da hızla devam edecektir (Anonim 2021).

Şekil 5. Enzim konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi

Substrat konsantrasyonu

Substrat konsantrasyonunun arttırılması, reaksiyonu ilk başlarda doğrusal olarak arttırır. Sonrasında substrat ilave edildikçe hız gittikçe daha az artar. Maksimum doygunluğa erişildiğinde enzimde substrat bağlayacak tüm boşluklar dolu olduğundan, eklenen substrat artık enzime bağlanamaz ve hız sabit kalır (Anonim 2021).



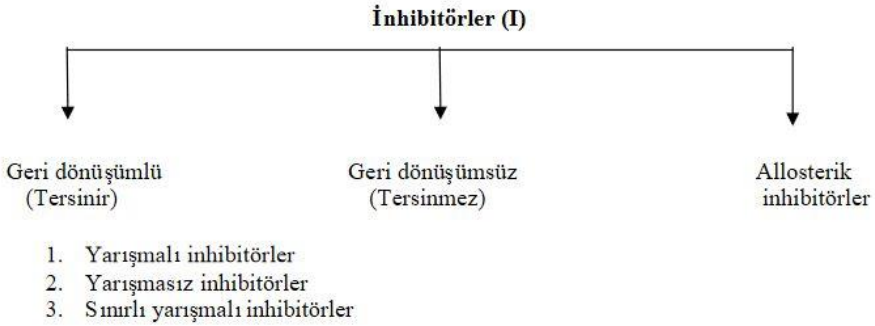
Şekil 6. Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi

Reaksiyon süresi

Enzim aktivitesinde hız, süre ilerledikçe azalmaktadır. Bunun sebebi ortamda bulunan substratın azalması ya da tükenmesiyle substratın yapısının bozuluyor olabilmesidir. Bu yüzden genellikle enzim ölçümleri başlangıç süresi dolaylarında yapılmaktadır (Şenol 2014).

Enzim inhibitörleri

Reaksiyon ortamına girdiğinde enzimin faaliyetini düşüren doğal veya yapay kimyasal maddelere "enzim inhibitörleri", bu olaya ise "enzim inhibisyonu" denir. Enzim inhibitörleri; tersinir-geri dönüşümlü (reversible), tersinmez-geri dönüşümsüz (irreversible) ve allosterik inhibitörler olmak üzere 3 gruba ayrılır. İnhibitörlerin sınıflandırılması Şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 7. İnhibitörlerin gruplandırılması (Anonim 2021c)

Tersinir inhibitörler

Tersinir inhibitörler enzimle çok kısa sürede kovalent olmayan, difüzyon kontrollü denge kompleksleri yaparlar ve oluşan kompleksler diyaliz veya jel filtrasyonla kolayca ayrılabilir ve enzim tekrar aktif şekline dönüşebilir.

Kompetetif (yarışmalı) inhibitörler

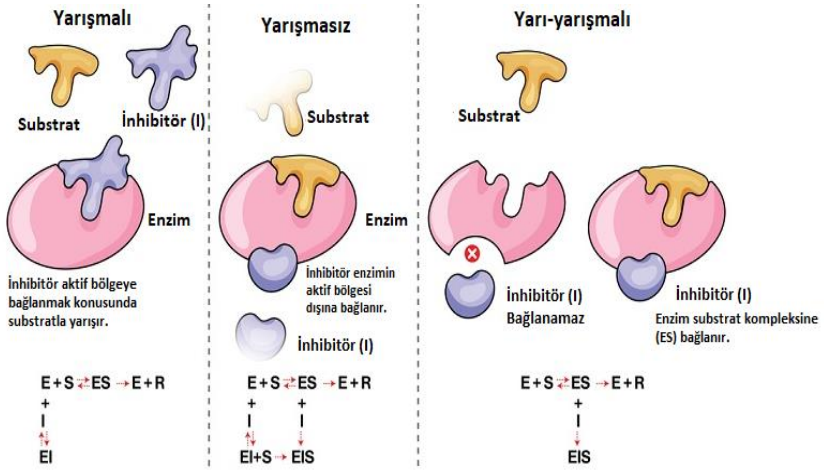
Kompetetif inhibitörün kimyasal yapısı ve şekli substratınkine benzer ve enzimin aktif merkezi ile geri dönüşümlü olarak birleşebilmektedir. Ancak enzim inhibitör (EI) kompleksinden ürün oluşmaz. Ortamda kompetetif inhibitör varsa, bu inhibitörle substrat arasında bir yarışma olur. Böylece ortamdaki enzim moleküllerinin bir kısmı substrat ile birleşir ve ürün oluşumu gerçekleşir. Bir kısım enzim ise inhibitör ile birleşir ve ürün oluşmaz. Bu tip inhibisyonu azaltmak için ortamdaki substratın konsantrasyonu arttırabilir. Ortamda substrat çok ise enzimin substratla birleşme olasılığı artar.

Non-kompetetif (yarışmasız) inhibitörler

Bu inhibitörler substrata hiç benzemez veya çok az benzer. İnhibitör enzimin aktif bölgesinin dışına bağlanır. Bu nedenle, substrat ile inhibitör arasında enzimle kompleks oluşturma yönünden bir yarışma olmaz. Ortamdaki enzimlerin bir kısmı E, S ve EI kompleksleri halinde ise E, I, S kompleksi oluştururlar. E, I, S kompleksinden ürün oluşmaz. Ancak enzim bu kompleksten ayrılarak tekrar serbest hale geçip substrat ile birleşerek ürün oluşturabilir.

Un-kompetetif (sınırlı yarışmalı) inhibitörler

Sınırlı yarışmalı inhibitörler ES kompleksine bağlanarak inhibisyona neden olur. İnhibitör direkt olarak enzime bağlanamaz.



Şekil 8. Tersinir enzim inhibisyon çeşitleri

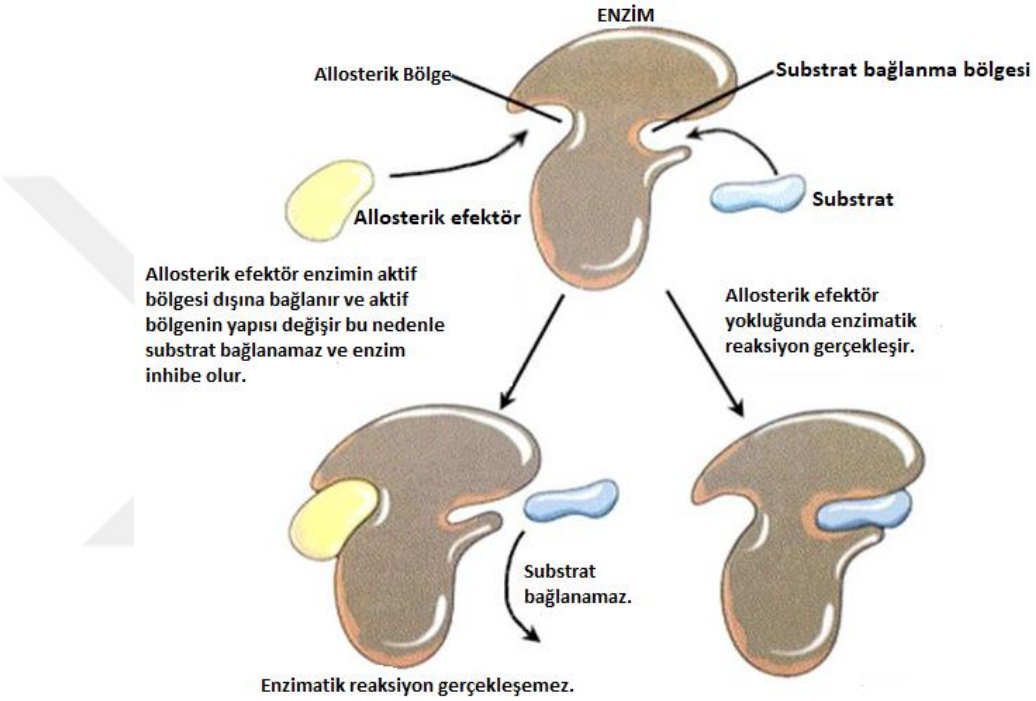
Tersinmez inhibitörler

Tersinmez inhibitörler enzime kovalent bağlarla geri dönüşümsüz olarak bağlanır ve bu yüzden EI kompleksinden tekrar serbest enzime dönüş veya ürün oluşumu meydana gelmez. Ürün, serbest enzimle birleşebilen substrat üzerinden oluşur. Geri dönüşümsüz inhibitörlere;

oksidan maddeleri (hidrojen peroksit vb.), ağır metal iyonları (Hg^{+2}, Ag^{+2} gibi), hidroksilamin örnek olarak verilebilir.

1.3.6.c. Allosterik inhibitörler

Allosterik inhibitörler yapısında aktif bölge dışında modifikatör denilen bir başka bölge daha bulundururlar. Allosterik inhibitörler modifikatöre bağlanarak enzimin aktif merkezinde substratın bağlanmasına imkân vermeyen şekilsel bir değişim meydana getirirler ve bu sebeple ES kompleksi oluşamaz.



Şekil 9. Allosterik inhibitörlerin çalışma mekanizması (Anonim 2021d)

Enzim aktivatörleri

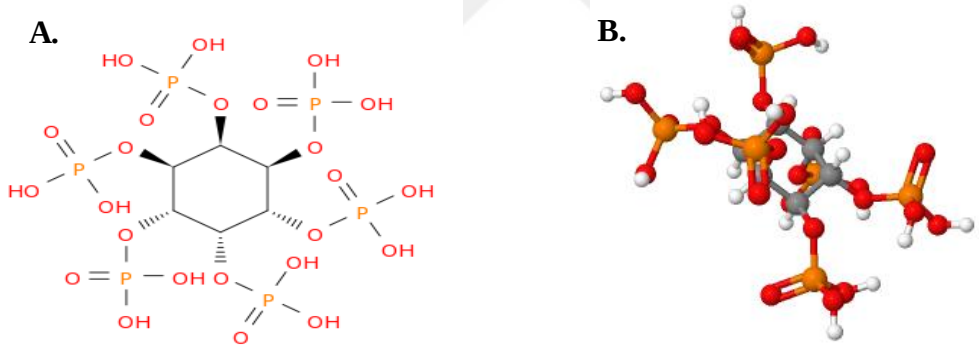
Bazı enzimler aktivitelerini artırmak için aktivatör adı verilen küçük moleküllere veya iyonlara gereksinim duymaktadırlar. Aktivatörler genellikle metal iyonlarıdır ve kataliz olayına her zaman katılmazlar. Aktivatörlerin bir kısmı enzimle, diğer bir kısmı ise substratla birleşerek aktivatör rolü oynar. Enzimle birleşen aktivatörler küçük metal iyonlarıdır. Fe^{+2}, Ca^{+2}, K^{+}, Zn^{+2}, Mg^{+2}, Co^{+2} ve gibi katyonların yanı sıra F^{-}, Cl^{-}, I^{-}, Br^{-}ve OH^{-} vb. gibi anyonlar da aktivatördür (Saldamlı 2005)

Fitaz ve Fitik Asit

Fitatların keşfi ilk olarak 1855 ve 1856 yıllarında Hartig ve ark. tarafından, farklı bitkilerin tohumlarından nişastasız küçük partikülleri izole etmeleriyle başlamıştır. Çeşitli araştırıcılar fitatı küresel **"globoid"** formda izole etmiş kimyasal yapısının fosfor, karbon ve

metal iyonlarından oluştuğu belirlenmiştir. 1897 yılında fosforik asit ile hidroliz edildiğinde inositolün açığa çıktığı gözlemlenmesinden dolayı Winterstein tarafından **"inositol-fosforik asit"** ismi verilmiştir. 1968 yılında da IUPAC-IUB (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği ve Uluslararası Biyokimya Birliği) tarafından "Myo-inositol 1,2,3,4,5,6 hekzakis dihidrojen fosfat" olarak adlandırılmıştır (Fredrikson et al. 2001).

Fitaz enzimi histidin asit fosfataz grubuna ait olup, fosforil transfer reaksiyonunda, fosfohistidin ara ürünlerini kullanan fosfotazların alt sınıfıdır (Lei et al. 2007). Fitazlar, fitik asitten fosfatın ayrılmasını ya da fitatın inorganik fosfata ve indirgenmiş inositol fosfat esterlere hidrolizini katalize etmektedirler (Lei and Porres 2003; Konietzny and Greiner 2004). Fitazlar, genellikle 40-100 kDa moleküler ağırlığındaki monomerik proteinlerdir. Genellikle optimum pH 4.5-6.0 ve optimum sıcaklığı 45-60^{o}C'dır. Fitazın kristal yapısı, 2.5 A^{o} çözünürlükte tespit edilmiştir. Fitazın ısı stabilitesini arttırmak için çeşitli immobilizasyon çalışmaları yapıldığı bildirilmiştir (Pandey et al. 2001). Fitik asitin moleküler ağırlığı 660.04 g mol^{-1} ve moleküler formülü $C_6H_{18}O_{24}P_6$' dır (Kumar et al. 2010). Fitik asit; baklagil, tahıl ve yağlı tohumlarda fosforun ana depo formudur. Ayrıca birçok bitki türünün yumrularında, köklerinde, polen ve sporlarında da daha az miktarlarda bulunabilmektedirler (Feil 2001).



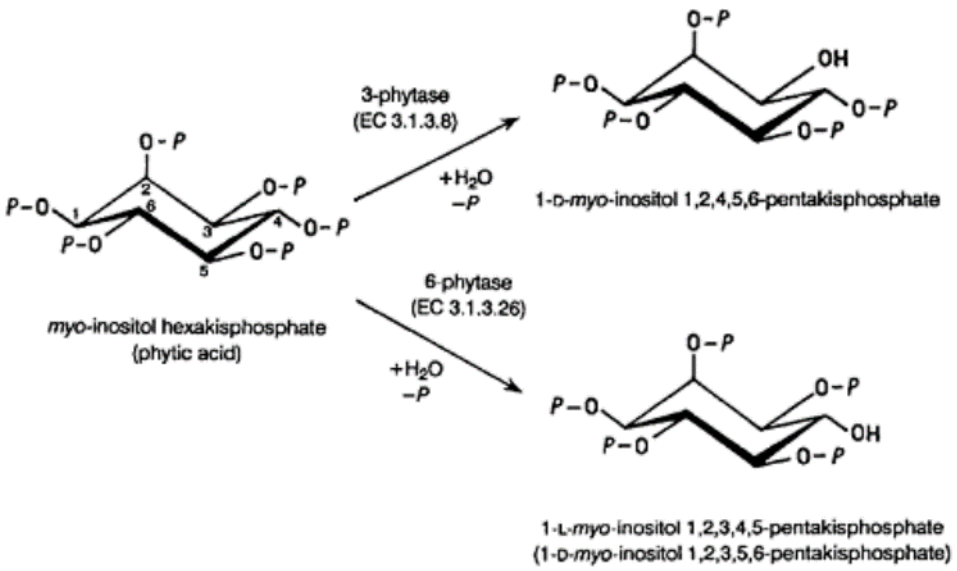
Şekil 10. A. Fitik asitin 2 boyutlu kimyasal yapı görüntüsü, B. Fitik Asitin 3 boyutlu kimyasal yapı görüntüsü (Anonim 2021e)

Fitik asitin tuzlarına fitat adı verilmektedir. Fitat, fitik asitin potasyum, magnezyum ve kalsiyum tuzlarının karışımı olarak bilinmektedir (Vohra and Satyanarayana 2003). Tohumlarda olgunlaşma döneminde nişasta, yağ ve protein gibi maddelerle birlikte fitik asit de hızla birikir. Tohumlarda bulunan fitik asit, tohum çimlenmesinde antioksidanların korunması, yüksek enerjili fosfor grupları halinde enerjinin depolanması ve çimlenme sırasında yapılarındaki katyonların kullanımı gibi çok önemli görevlerde etkili olmaktadır (Holm et al. 2002). Fitik asit merkez inositol halka yapısının çevresinde altı fosfat grubundan meydana gelen çok yüksek afiniteye sahip olan şelatlama özelliğindeki bir bileşiktir. Fitik asit, düşük ve yüksek pH değerlerinde proteinler ile çeşitli kompleksler oluşturarak proteinlerin yapısını

değiştirmektedir. Bu reaksiyonlar sonucunda ise sindirim enzimlerinin çalışması (α-amilaz, tripsin, pepsin gibi endojen proteazlar) engellenirken, proteinler proteolitik sindirime karşı dirençli hale gelmektedir (Casey and Walsh 2004).

Fitat, geniş pH aralığında negatif yüklü iyon olarak görev yapmaktadır ve bu yüzden Zn^{+2}, Mn^{+2}, $Fe^{+2/+3}$, Mg^{+2}, Ca^{+2} gibi pozitif yüklü divalent ve trivalent iyonlarla şelat oluşturarak ince bağırsağa bağlı metallerin emilimini azaltıp biyoyararlığını olumsuz bir şekilde etkilemektedir (Lopez et al. 2002; Lönnerdal 2002; Fredlund et al. 2006). Fitatlar, tripsin ve kemotripsin gibi endojen proteazlara bağlanarak fitat-protein komplekslerini oluşturmaları sonucunda amino asit ve proteinlerin sindirilebilirliğini azaltırlar (Midilli vd 2003). Fitik asitin antikanserojenik (prostat kanseri, rabdomiyosarkom, pankreas, göğüs, karaciğer, kan, kolon ve kemik iliği kanseri), hipokolesterolemik, hipolipidemik, pıhtılaşmayı önleyici, antioksidan, antimutajenik, diş çürümesini önleyici, kolestrolü düşürücü, böbrek taşı oluşumunu önleyici, Alzheimer ve Parkinson hastalığının tedavisinde, obezite, diabet, HIV ve kalp rahatsızlıkları gibi hastalıkları önleyici etkisi nedeniyle ön plana çıkmaktadır (Vats and Banerjee 2004; Tolay vd 2005; Kumar et al. 2010). Son yıllarda fıtazlar, çevrenin korunması, beslenme ve insan sağlığı açısından önemli enzimlerden birisi olarak literatürdeki yerini almıştır.

Doğada bitkilere, mikroorganizmalara ve hatta bazı hayvan dokularına kadar uzanan geniş bir dağılım gösteren fitazlar iki temele dayandırılarak sınıflandırılmıştır. Bunlardan birincisi; fitat molekülünün parçalandığı başlangıç bölgesine göre ikincisi ise; pH aktivitesine göre yapılmıştır. IUPAC-IUB (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği ve Uluslararası Biyokimya Birliği) tarafından fitazların, fitat molekülünün hidrolizini başlatan bölgeye göre iki sınıfa ayrılması uygun görülmüştür. 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) (Selle and Ravindran 2007). Bitkisel fitazlar genellikle 6-fitaz sınıfında bulunurken, mikrobiyal fitazlar 3-fitaz sınıfında bulunmaktadır. Bu duruma istisna olarak *Peniophoralycii* ve *E. coli*' den izole edilen fitaz 6-fitaz aktivitesi gösterirken, *Aspergillus niger*'den izole edilen fitaz, 3-fitaz aktivitesi gösterir (Kumar et al. 2010).



Şekil 11. Fitik asitin 3-fitaz ve 6-fitaz enzimleri ile hidrolizi (Dvořáková 1998).

Fitazlar optimum pH değerlerine göre 2 gruba ayrılmaktadır. pH 5.0 civarında histidin asit fosfotazlar optimum aktivite gösterirken, pH 8.0'e yakın değerlerde alkalin fitazlar optimum aktivite göstermektedir (Baruah et al. 2007). Asidik pH' da histidin fosfatazlar substrat spesifikliği gösterdiği için içerisinde metal olmayan fitatın parçalanması sonucu son ürün olarak miyo-inositol fosfat belirlenmiştir. Daha az substrat spesifikliği gösteren alkalin fosfataz enzimi Ca^{2+} fitata karşı oldukça spesifik olduğundan ürün olarak miyo-inosital trifosfat belirlenmiştir (Oh et al. 2004).

Fitaz enziminin kaynakları

Üretildikleri kaynağa göre fitaz enzimleri 3 gruba ayrılmaktadır.

Bitkisel Fitazlar: İlk olarak pirinç kepeğinden izole edilen bitki fitazlarının daha sonra yapılan çalışmalarda bitki türlerinde büyük bir çeşitlilik gösterdiği gözlenmiştir. Bitkisel fitazların çoğu histidin asit fosfataz grubuna dahildir ve 6-fitaz sınıfında yer almaktadır. Baklagil, hububat, yağlı bitkilerin tohumları ve ayrıca filizlenmeye yeni başlamış bitkilerin genelinde fitaz aktivitesi tespit edilmiştir. Çavdar, arpa, buğday, tritikale ve malt çiminde yüksek oranda bitkisel kaynaklı fitaz bulunmaktadır ve enzim özellikle tanenin kepek kısmında yoğunlaşmıştır. Pamuk tohumu, mısır ve soya fasulyesi küspesinde fitaz etkinliği düşük düzeydedir ve mikrobiyal fitazlar kadar etkili değildirler. Ayrıca marul, turp, ıspanak ve zambaktan da fitaz elde edilmiştir (Woyengo and Nyachoti 2011). Bitkisel kaynaklı fitazlar pH aralıklarının dar olmasından dolayı düşük performans gösterirler (Greiner and Konietzny 2006). Bitkilerden elde edilen fitazların moleküler ağırlıkları 47-76 kDa, optimum sıcaklıları 38-55°C ve optimum pH' ları 4.5-6.0 aralığındadır (Lei et al. 2007). Bazı çalışmalarda; 5.000 unit/kg'dan

daha fazla fitaz aktivitesi gözlenmiş ve bitkisel fitaz kaynakları hayvan beslemesinde kullanılmıştır. (Viveros et al. 2000). Yapılan çalışmalar bitkisel fitazların 70°C üzerinde birkaç dakika içerisinde geri dönüşümsüz olarak inaktive olduğunu göstermiştir. Ayrıca bitkisel fitazların biyolojik etkinliği mikrobiyal fitazlarla kıyaslandığında %40 oranında kalmaktadır (Cao et al. 2007).

Hayvansal Fitazlar: 1908 yılında, buzağıların karaciğer ve kanından Mc Collum ve Hart tarafından ilk hayvansal fitaz keşfedilmiştir. Çeşitli hayvan dokularında fitaz aktivitesi tespit edilmesine rağmen, hayvansal kaynaklı fitazların moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmemiştir. Hayvansal fitazların birçoğu nötral ve alkalin pH değerlerinde aktivite göstermelerine rağmen kümes hayvanlarının bağırsak epitel hücrelerinde optimum pH 5.5-6.0'dır. Rumenlerde bulunan fitaz aktivitesi esasen mikrobiyal kökenlidir. Çoğu hayvansal kaynaklı fitazlarda, fitat için Km değeri, 0.03-2.6 mM aralığındadır. (Ellestad et al. 2002). Bitki veya bakteri gibi kaynaklardan elde edilen ve hayvanlara yem ile verilebilen fitazlar maliyeti ve kullanılabilirliği açısından kıyaslandığında hayvansal fitazları gölgede bırakmıştır (Yanke et al. 1998).

Mikrobiyal fitazlar: Mikroorganizmalarda, bitkilerde ve bazı hayvansal dokularda fitaz enzimi bulunmasına rağmen yapılan son araştırmalar, mikrobiyal fitazların biyoteknolojik alanlarda yararlanılabilecek en önemli enzim kaynağı olduğunu göstermiştir (Pandey et al. 2001, Vohra and Satyanarayana 2003). Mikrobiyal fitaz kaynakları içerisinde birçok maya, bakteri ve fungus türü bulunmaktadır. Bu enzimler genellikle histidin asit fosfataz veya alkali fitazlar grubunda bulunmaktadırlar. Stereospesifiklikleri, kinetikleri ve biyokimyasal özellikleri birbirleri içerisinde önemli farklılıklar gösterebilmektedir. Çeşitli mikrobiyal fitazlar, optimum pH'larının düşük olması sebebiyle, fitatın en fazla çözündüğü mide şartlarına uyumlu olmasından dolayı günümüzde hayvan yem katkısı olarak ticarileştirilmiştir (Lei et al. 2007). Mikrobiyal fitaz aktivitesi genellikle *Aspergillus* türlerinde tanımlanmıştır. Ancak proteolizize karşı direnç göstermesi, katalitik aktivitesi ve substrat spesifitesi gibi özelliklerinden dolayı bakteriyel fitazlar, fungal enzimlere alternatif oluşturabilmektedir (Konietzyn and Greiner 2004).

Bakteriyel kaynaklı fitazlar *Bacillus licheniformis, Shigella sp., Escherichia coli, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens* gibi birçok bakteri türünden elde edilmiştir (Kumar et al. 2011). Bazı bakteriyal fitazların, özellikle de *Bacillus* cinsi içinde yer alan mikroorganizmalardan elde edilenlerin çoğunun sıcaklıklarının 50^{o}C ve optimum pH'larının ise 7.0-7.5 olduğu gözlemlenmiştir (Lei et al. 2007). Bakteri kaynaklı fitazlar genellikle intraselüler olmalarına rağmen *Bacillus* türlerinde ekstraselüler fitaz aktivitesi de

gözlenmiştir (Kumar et al. 2010). Birçok fungal kaynaklı fitaz *Aspergillus sp.*'den izole edilmiştir. Ayrıca *Penicillum* ve *Mucor* türlerinden de fitaz izole edilmiştir. Mayalardan ise *Candida tropicalis, Candida intermedia, Saccharomyces cerevisiae, Clavispora lusitaniae* türlerinden izole edilmiştir (Zhang et al. 2013). Fungal kaynaklı birçok fitaz enzimi ekstraselülerdir. Glikolizasyon farkı olduğu için bakteriyel fitazların ortalama moleküler ağırlığı fungal fitazlardan (80-120 kDa) daha düşüktür ve 40-55 kDa aralığındadır (Aşan 2007a). İzole edilen fitazların çoğunun optimum pH değeri 4.5-6.0 arasında yer almaktadır. Ancak *Bacillus sp*.'ye ait alkali veya nötral fitaz enzimleride bulunmaktadır (Choi et al. 2001). Mikrobiyal fitazların çoğunun optimum sıcaklık derecesi 45-60 °C arasında yer almaktadır.

Tablo 1. Bazı Mikrobiyal Fitaz Kaynakları ve Özellikleri (Greiner and Konietzny 2006).

Fitaz Kaynağı	Optimum pH	Optimum Sıcaklık
Aspergillus niger	2.2 – 5.5	55-58
Aspergillus terreus	5.0-5.5	70
Myceliophthora thermophila	5.5	-
Bacillus amyloliquefaciens	7.0-8.0	70
Penicillium lycii	5.5	58
Saccharomyces castelii	4.4	77
Cladosporium	3.5	40
Escherichia coli	4.5	55-60
Klebsiella pneumoniae	5.0-5.5	50-60
Klebsiella aerogenes	4.5-5.2	68
Bacilus subtilis	6.5-7.5	55-60
Penicillium simplicissimum	4.0	55

Fitaz enziminin endüstrideki kullanım alanları

Yem sanayi

Son zamanlarda, hayvan yemlerine enzim eklenmesi ile yemlerin besin değerini arttırma çalışmaları oldukça önem kazanmıştır. Fitazların mide koşullarında biyo yarayışlılığının yüksek olması ve optimum pH' sının düşük olması nedeni ile yem endüstrisinde kullanımı artmıştır. Fosfor hayvanların üreme, büyüme ve kemiklerdeki mineralizasyonu için gerekli minerallerden biridir (Pandey et al. 2001).

Ticari olarak yetiştirilen kümes hayvanlarının beslenmesinde kullanılan yemler bitkisel kaynaklı dane yemlerden oluşmaktadır. Kanatlı karmalarında kullanılan küspelerde, bitkisel kaynaklı yan ürünlerde ve dane yemlerde bulunan fosforun yaklaşık 2\3'ü fitin fosforu

formundadır ve kanatlılar sindirim aktivesine sahip olmadıklarından dolayı bu fosfordan faydalanamazlar. Fosforun büyük bir kısmı gübreyle dışarı atılır (Aşan 2007b).

Kanatlı hayvanların beslenmesinde başlıca bileşen bitkisel yemlerdir. Bitkisel kaynaklarda fitik asit, fosfor kaynağı olarak bulunmaktadır. Ruminant hayvanların mikroflorasında fitik asit enzimatik reaksiyonlarla parçalanmaktadır. Ancak, domuz ve kanatlı hayvanlar gibi tek mideli canlıların barsaklarında fitaz enzimi çok az üretildiği için bu canlıların besinlerine yem katkısı olarak inorganik fosfor ilave edilmektedir. Bu durum hayvancılık yapılan alanlarda doğaya atılan fosfor miktarının artmasına neden olmaktadır. Fosfor ilavesi hem fosfat kirliliğini hem de maliyeti artırmaktadır (Marlida et al. 2010). Kanatlı yemleri hazırlanırken fıtaz kullanılması fosfatın yem karışımı içerisinde iyice dağılmasını sağlarken atıklardaki (gübredeki) çevreye karışacak olan fosfat miktarını düşürmektedir (Sariyska et al. 2005).

Domuz ve kanatlılarda olduğu gibi balık yetiştiriciliğinde kullanılan bitkisel yemlerde fitik asit bulunmaktadır. Balıklarda fitaz enzimi bulunmadığından fitik asitin fosforundan yararlanılması için yemlere fitaz ilavesi yapılmaktadır. Bunun sonucunda, sularda fosfor miktarının artışı önlenmekte ve bitkisel fosforun yararlılığı artırılmaktadır (Mullaney et al. 2002).

Hayvan yemlerine eklenecek olan mikrobiyal fitazlarda aranılan özelliklerden en önemlileri yüksek sıcaklıklarda stabilite göstermesi, sindirim sistemindeki tripsin, pepsin gibi proteazlara karşı dayanıklı olması ve üretim maliyetlerinin düşük olmasıdır (Singh and Satyanarayana 2015). Yem katkısı olarak *A. niger* (3-fitaz), *Peniophora lycii* (6-fitaz) ve *Escherichia coli* (6-fitaz) fitazları en yaygın kullanılan ticari fitazlardır. Kanatlı yemlerine fitaz ilavesi, enzim denatürasynu olmaması için peletleme sonrasında ya da sıvı veya granüler formda uygulanabilmektedir (Selle ve Ravindran 2007).

Gıda sanayi

Fitazın uygulanabileceği bir diğer alan ise insan gıdalarının işlenmesi ve imalatıdır. Fitat, temel besin maddesi olan tahıllar ve baklagiller gibi bitkilerden elde edilmiş gıdaların ortak bileşenidir. Tahıl ve baklagil gibi gıdalarda fitik asitin yüksek mevcudiyeti, mineral ve proteinlerin emilimini azaltır ve ayrıca diyetlerine inorganik fosfor ilavesini gerektirir (Greiner and Konietzny 2006). Fitat alınımını tahıl, baklagil ve soya proteinlerince zengin diyetler artırmaktadır. Fazla miktarda tahıl yiyen, dengesiz beslenen ve mayasız ekmek yiyen insanlar, soya içerikli mama ile beslenen bebekler, vejeteryanlar fazla oranda fitat almaktadır (Simell et al. 1989). Vejeteryan diyetlerle beslenen insanların günlük aldığı fitat miktarı (2000-2600 mg),

kırsal bölgelerde yaşayan ve karışık diyetlerle beslenen insanların günlük aldıkları fitat miktarından (150-1400 mg) daha fazladır (Sarıbuğa 2013).

Fitik asitin divalent iyonlarla şelat yapma özelliğinden dolayı fitat diyetlerde kalsiyum, manganez, çinko, bakır, demir ve magnezyum gibi minerallerin alınımını olumsuz etkilemektedir (Lopez et al. 2002; Konietzny and Greiner 2003). Şelat halindeki fitik asit-mineral kompleksi haldedir. Fitik asit içeriği yüksek diyetlerle beslenen insanlarda düşük mineral emilimi şelat halde bulunan fitik asit-mineral kompleksinin fizyolojik pH değerlerinde çözünmez halde olmasından kaynaklanmaktadır. Gıda üretiminde fitazın kullanılması ile insanlarda mineral madde emilimini artırma amaçlanmaktadır (Lei et al. 2013).

Gıda üretim prosesi sırasında, fitat bitki ve mikroorganizmalardan elde edilen fitazlarla tamamen hidrolize olmamaktadır. Minerallerin özellikle demirin yarayışlılığını artırmak için fitat miktarı azaltılmalıdır (Hurrell 2003). Bu nedenle gıda üretiminde fitazın kullanılması ile fonksiyonel gıdaların üretilmesi ve insanlarda mineral maddelerin emilimi mümkün olacaktır (Konietzny and Greiner 2002). Gıda sanayinde fitaz kullanımı ile bitkisel protein izolatlarının üretimi, ekmek yapımı ve tahıl kepeklerinin parçalanması gerçekleşmektedir (Quan et al. 2002).

Myo- inositol fosfat eldesi

İnositol fosfatlar ve fosfolipidler hücre içi kaynaklardan kalsiyumun iletiminde ve transmembran sinyalizasyonunda görev almaktadır. Fitaz, myo-inositol fosfatı parçalayarak serbest myo-inositol türevleri meydana getirmektedir. (Kumar et al. 2010).

Mikroorganizmalar, yüksek bitkiler ve memeli hücrelerinde myo-inositol ve izomerleri ve bunların biyokimyasal türevleri çok önemli biyolojik fonksiyonlarda görev almaktadır. Çeşitli araştırıcılar çalışmalarında inositol fosfat türevlerinin eklem iltihabı ve astım gibi solunum hastalıklarına karşı kullanıldığını ve spesifik inositol trifosfatların ağrı kesici olarak önerildiğini bildirmiştirler (Raghavendra et al. 2010).

İnositol fosfat türevleri enzim inhibitörü, enzim stabilizatörü, biyokimyasal ve metabolik çalışmalarda enzim substratı ve ilaç olarak da kullanılmaktadır (Vohra and Satyanarayana 2003; Haefner et al. 2005). Gıda üretiminde fitaz enziminin kullanılması ile fonksiyonel gıdalar üretilmesi sonucu myo-inositol fosfat esterleri oluşur ve insanlarda minerallerin absorbsiyonu sağlanır (Dokuzparmak 2015).

Kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisi

Kâğıt endüstrisinde, bitkisel kaynaklı fitatın arıtılması önemli bir konudur. Termostabil fıtaz enzimi, kâğıt üretim sektöründe ve kâğıt yapımı aşamalarında fıtik asiti hidrolizlemede ve

uzaklaştırmada yararlanılan biyolojik bir ajandır. Bitkisel fitatın enzimatik proses kullanılarak yıkımı ile mutajenik, toksik veya kanserojenik maddeler içeren ürünler meydana gelmez. Bu nedenle kâğıt endüstrisinde fitazın kullanımı, çevreyi koruma açısından oldukça önemlidir (Selle et al. 2000).

Toprak zenginleştirme

Çeşitli alanlardaki topraklarda toplam organik fosforun %50'sini fitik asit ve türevleri oluşturmaktadır. Fitazın topraktaki fitik asitten gelen fosfordan yararlanımı ile ilgili olarak mısır bitkisinde çalışmalar yapılmıştır. Toprağa fitaz enzimi eklendiğinde fitik asitin daha fazla parçalandığını ve büyümenin de uyarıldığını belirtmişlerdir. Bu çalışma bitki köklerinde fitazın ekspresyonu ile topraktaki fosforun kullanılabileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır (Şabahat 2019).

Mannan ve Mannanaz Enzimi

Hemiselüloz yapısının önemli parçası olan mannan molekülleri bir polimer oluşturmak için birbirine bağlı mannoz moleküllerinin homo ve hetero yapılarının bir araya gelmesiyle oluşur. Mannanlar hücre duvarında yer alan selüloz ve ligninle yakından ilişkili kompleks biyopolimerlerdir. Bu biyopolimerler selüloz mikrofibrillerine çapraz bağlı yapısal karbonhidratlar veya farklı bitkilerin çekirdeklerinde depo karbonhidratlar olarak bulunabilmektedirler (Chauhan et al. 2012). Mannanlar yapı itibariyle mannoz, glukoz ve galaktoz alt ünitelerinin farklı miktar ve yapılarda birleşmesinden oluşan polisakkaritlerdir. Mannanların enzimatik hidrolizi sonucunda mikroorganizmalar, insanlar veya hayvanlar tarafından kullanılabilir şekerler oluşmaktadır (Wang 2015).

Mannan polisakkariti 4 ayrı alt gruba ayrılır. Bunlar; galaktomannan, lineer mannan, glukomannan ve galaktoglukomannan olarak isimlendirilirler. Bu gruplar, hücre duvarının yapısında, büyüme faktörü için sinyal oluşumunda ve bitkilerde depo polisakkariti olarak görev almaktadırlar (Dinçyürek 2019).

Galaktomannan baklagiller familyasının tohumlarında depo polisakkariti görevi görmektedir ve tohumun kuru ağırlığının %30'unu oluşturmaktadır. Galaktomannanların reolojik özelliklerinden (kıvam arttırıcı ve diğer etkileri) dolayı gıda uygulamaları ve endüstriyel kullanımları oldukça yaygındır. Galaktomannanlar çekirdeğin çimlenme esnasında enerji kaynağı olarak kullanılmasının yanı sıra suyu çekirdekte muhafaza ederler. Yüksek sıcaklıklarda çekirdeğin su kaybını önleyerek burada yer alan enzimlerin denatürasyonunun önüne geçmektedirler (Moreira 2008; Wang 2015).

Keçiboynuzu gamı (*Ceratonia siliqua*), guar gamı (*Cyamopsis tetragonoloba* veya *Cyamopsis psoraloides*) ve tara gamı (*Caesalpinia spinosa*) endüstriyel açıdan önemli üç galaktomannandır. Keçiboynuzu gamı, yüksek moleküler ağırlığa sahip galaktomannandan oluşmaktadır ve yenilebilir filmler, içecekler, unlu mamuller, makarnalar, dondurma, az yağlı yoğurt, diğer gıda ürünleri ve ilaçlarda çok yaygın kullanılır (Prajapati et al. 2013; Barak and Mudgil 2014). Guar gamın kimyasal yapısı da keçiboynuzu gamına benzemektedir. Keçiboynuzu gamı gibi guar gam da çok yaygın kullanım alanına sahiptir. Bu alanlardan bazıları içecekler, işlenmiş peynirler, süt ürünleri, işlenmiş et ürünleri, unlu mamuller ve soslardır (Mudgil et al. 2014). Tara gam, donmuş tatlılarda buz kristallerinin büyüklük kontrolünde ve işlenmiş et ürünlerinin jel yapısının geliştirilmesinde kullanılmaktadır (Wang 2015).

Lineer mannanlar homopolisakkarittirler. Bu mannanlardan bazıları, özellikle "aloe vera"da bulunanlar immüno-farmakolojik ve tedavi edici özellikler gösterebilmektedirler. Lineer mannanlar ağaçların ve bazı bitki çekirdeklerinin özellikle Afrika hurma kozalağı (*ivory nuts*; *Phytelephas macrocarpa*), domates (*Solanum lycopersicum*) ve yeşil kahve çekirdeğinin majör bileşenlerindendir. Lineer mannanlar suda çözünmezler ve bu nedenle de bitki dokularının yapısal hemiselülozlarında mekanik zararlara karşı önemli roller üstlenirler (Moreira 2008; Wang 2015).

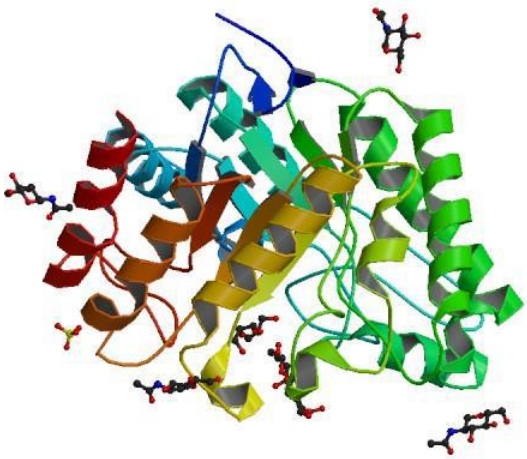
Glukomannanlar, kozalaklı ağaçların hemiselüloz fraksiyonunun majör bileşeni iken iğne yapraklı ağaçların da hemiselüloz fraksiyonunun %50'sini oluşturmaktadırlar. Glukomannanlar hücre duvarı bileşenlerinden selüloz ve ksilan ile yakından ilişkilidir (van Zyl et al. 2010). Konjac bitki yumrusunun %60-80'ini oluşturan glukomannanlar ana depo karbonhidratı olarak görev yapmaktadır. Konjac glukomannanı suda çözünebilir ve çok fazla bulunması nedeniyle gıda endüstrisi ve ilaç araştırmalarında çok geniş bir kullanım alanına sahiptir (Wang 2015).

Mannanlara etki edecek enzimler ise, odunsu materyallerden enerji elde edebilen fungus ve bakteriler vasıtasıyla üretilmektedir (van Zyl et al. 2010). Bu enzimler; β-mannosidaz (ß-1,4-D-mannopiranozid hidrolaz, E.C. 3.2.1.25), β-mannanaz (β-1,4-D-mannan mannohidrolaz, E.C. 3.2.1.78) ve β-glukosidazdır (ß-1,4-D-glukozid glikohidrolaz, E.C. 3.2.1.21). Mannanın parçalanmasına yardımcı olan enzimler ise α-glukosidaz (α-1,6-D-galaktosid galaktohidrolaz, E.C. 3.2.1.22) ve asetil mannan esteraz (E.C. 3.1.1.6) dır. Degredasyona yardımcı enzimler mannan yapılarına bağlanmış yan grupların ayrılmasından sorumludurlar (Dhawan and Kaur 2007; Moreira 2008).

Mannanaz ve mikrobiyal mannanaz enzimi

β -Mannanaz (EC 3.2.1.78), doğada yaygın olarak bulunan mannan ve heteromannanların (galaktomannan, glukomannan, galaktoglukomannan) β-1,4-D mannozidik bağlarını hidrolize ederek oligosakkaritleri ve mannobiyozu meydana getiren hücre dışı enzimlerdir (Öztürk vd 2010). Mannanlar ve heteromannanlar, sert ve yumuşak ağaçlar, baklagillerin tohumları ve fasulyelerde hemiselüloz fraksiyonunun bir parçası olarak doğada yaygın olarak bulunurlar (Dawood and Ma 2020).

Mikroorganizmalar, daha küçük ortamda çoğalma, daha kısa sürede büyüme ve genetik manipülasyonların kolay olması sebebiyle en güçlü enzim üretim kaynakları haline gelmektedir. Mannanaz enzimi bakteri, mantar, bitki ve hayvanlardan saflaştırılmış bir enzimdir. Mikrobiyal mannanaz genellikle ekstrasellüler ve reaksiyonu yükselten bir enzimdir. Mannanaz enzimi yüksek pH ve sıcaklık değerlerinde çalışabilmektedir. Bu sebepten dolayı; kâğıt hamuru, gıda, beslenme, petrol ve tekstil endüstrisi gibi sektörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mannanaz, mikrobiyal kaynaklardan genelikle gram pozitif ve *Bacillus* cinsine ait olan bakterilerden izole edilmiştir. Bazı gram negatif bakterilerden (*Klebsilla oxytoca*) de elde edildiği bilinmektedir. Mantarlarda ise genellikle *Aspergillus, Penicillium* ve *Trichoderma* cinslerinde mannanaz enziminin varlığı görülmüştür (Chauhan et al. 2012).



Şekil 12. *Trichoderma reesei* baktersinden izole edilmiş β-manannazın üç boyutlu yapısı (Sönmez 2016)

Ortam koşulları, fiziksel koşullar, zaman, sıcaklık, pH, nitrojen, karbon kaynakları, mineral tuzlar ve oksijen oranı mannanazın üretimini etkileyen en önemli faktörlerdir. Mikrobiyal mannanaz farklı sıcaklıklarda aktivite gösterebilmektedir ve bu sıcaklık aralığı 37-70^{o}C olarak belirlenmiştir. Genel olarak bakteriyal mannanaz, mantar mannanazı ile karşılaştırıdığında, bakteriyal mannanazlar sıcaklığa daha dayanaklıdırlar (Aziz et al. 2008; Chauhan et al. 2012). Ortamın pH değeri ise bakteriler için bazik, funguslar için ise asidik olarak ayarlandığında mikroorganizmanın gelişimi ve β-mannanaz üretimi olumlu

etkilenmektedir (Chauhan et al. 2012). Mikrobiyal mannanazlar hem indükleyici hem de yapısal enzimler olması, nedeniyle genellikle mikroorganizmanın yetiştirildiği ortama hücre dışında salgılanması ve yığın halinde üretimin daha kolay olması sebebiyle ticari öneme sahiptir (Dhawan and Kaur 2007).

Mannanaz enziminin endüstrideki kullanım alanları

Mannooligosakkarit (MOS) üretimi

Mannooligosakkaritler suda çözünen diyet lifleridir. Suda çözünebilen diyet lifleri insanlar tarafından sindirilemeyen polisakkaritlerdir. Mannooligosakkaritler suda çözündükleri için sindirim sisteminden geçerken bağırsak mikroflorası tarafından besin kaynağı olarak kullanılırlar ve bu sayede insan sağlığı için yararlı maddeler oluşmaktadır. Keçiboynuzu gamı, guar gam, tara gam ve konjak unu suda çözünür MOS'ları içermektedir. Bu MOS'lar β-mannanaz enzimi vasıtasıyla kısmi olarak parçalandıklarında mikroorganizmalar tarafından kullanılabilir MOS ortaya çıkmaktadır (Erkan vd 2020).

İnsan sağlığı açısından önemli olan bu MOS'ların üretimi β-mannanaz enziminin kullanım alanlarından biridir. Günde 3 g MOS tüketiminin yağ emilimini azalttığı ve bunun yağ metabolizmasını olumsuz etkilemediği tespit edilmiştir. Kısmi olarak hidrolize edilen guar gamın içeceklerde kullanılması ile kronik bağırsak rahatsızlığında azalma olduğu görülmüştür. MOS'ların bu ve buna benzer birçok yararı bulunmaktadır. MOS üretiminde kompleks enzim çözeltileri yerine β-mannanaz kullanımının yeterli olduğu bildirilmiştir (van Zyl et al. 2010, Chauhan et al. 2012).

İlaç endüstrisi uygulamaları

İlaçların hızlı çözünmesi ve yapısal özelliklerinin oluşturulmasında mannozların kullanımı her geçen gün artmaktadır. Mannoz, zengin mannan içeren substratların β-mannanaz ile parçalanmasıyla elde edilmektedir (Fu et al. 2006). Mannozların yapı katkı maddesi oldukları için toz halinde daha fazla biyo uyumluluk göstermesi, tablet içinde sıkıştırılabilme özelliklerinden dolayı ağızda kolay erimemesi ve su oranı fazla olmayan ortamda çözünebilme özelliklerinden dolayı hızlı çözünebilen tablet üretiminde kullanılmaktadır (Fu et al. 2006)

Kahve endüstrisi uygulamaları

Kahve ekstraktında bulunan mannanlar viskoziteyi arttırdığından hazır kahvenin işlenmesinde olumsuz etkiler yaratmaktadır. Bu nedenle küflerden elde edilen β-mannanaz enzimi kullanılmakta ve mannanlar parçalanarak viskozite azaltılmaktadır. Bu sayede kahve ekstraktının konsantrasyon maliyeti de düşmektedir. Farklı mannanaz karışımlarının kahve

çekirdeklerinin işlenmesi ve fermantasyonu, sıvı kahve ekstrelerinin viskozitesinin azaltılması, sıvı kahve ekstraktlarında galaktomannanları hidrolizlemede, instant kahvelerde dondurarak kurutma sırasında jel oluşumunu inhibe etme işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Oosterveld et al. 2003; Nunes et al. 2006). Kahve çekirdeği artıkları da β-mannanaz enzimi ile muamele edilerek MOS'lar üretilmektedir (Chauhan et al. 2012).

Hayvan yemlerinin iyileştirilmesinde kullanım

Doğada yaygın olarak bulunan mannanlar hayvan yemlerinde bulunan ve yemlerin besinsel değerini arttırıcı olarak kullanılan soya unu, guar unu, hindistan cevizi unu, palmiye çekirdeği unu, hurma çekirdeği unu ve susam unu gibi yem katkı maddelerinde bulunan bir polisakkarittir. Mannan substratları yüksek oranda lif içermeleri, bazı esansiyel amino asitlerinden yoksun olmaları, lezzet oranlarının düşük olması, birçok anti-besinsel faktörlerle birleştiğinde yüksek viskozite özelliği göstermeleri ile bilinir. Bu özelliklerinden dolayı insan ve hayvanların bağırsak sistemlerinde sindirimleri kısıtlıdır (Dhawan and Kaur 2007).

Hayvan beslenmesinde yem katkı maddelerine β-mannanaz ilave edilerek, mannanların parçalanması ve kapsüllenmiş besinlerin salınımı sağlanmakta, hayvan bağırsaklarındaki villusların yüksekliğini arttırarak besinlerin absorbsiyon düzeylerinin arttırılması ve sindirilmiş besin maddelerinin vizkozitesinin azaltılması sağlanmıştır (Adibmoradi et al. 2007; Chauhan et al. 2012). Hayvan yemlerinde kullanılmak üzere, geniş pH aralığına sahip olan, pepsin ve tripsin gibi protezlara dirençli mannanazlar tercih edilmektedir (Mussini et al. 2011). Farklı enerji seviyelerine sahip olan yemlerle beslenmiş broyler tavuklarında β-mannanaz enziminin yem sindirimi ve gelişim parametreleri üzerinde etkisinin araştırıldığı bir çalışmada bu enzimin besin maddelerine eklenmesi ile incelenen hayvanların vücut ağırlık artışı, gut morfolojisi, yem dönüşüm oranı, kuşların bağışıklık oranı ve organların nispi ağırlığını önemli derecede iyileştirdiği belirtilmiştir (Imran et al. 2014; Muhammad et al. 2015). Mananaz enziminin sadece kanatlı hayvanlarda değil ruminant hayvanlarda da yemlerin sindirilmesi yemden yararlanma oranı, performans özellikleri ve hayvanların vücut ağırlıklarının artışında önemli etkileri olduğu ortaya konmuştur (Pettey et al. 2002; Lv et al. 2013).

Kâğıt ve selüloz endüstrisi

Mannanaz, en fazla yumuşak dokulu ağaç hamurlarının enzimatik ağartılmasında galaktomannanların parçalanması için kullanılır. Ligninin ağaç liflerinden ekstrakte edilmesi ağaç hamurlarının enzimatik olarak ağartılmasında önemli bir adımdır. Bu işlemler için ilk adımda alkali şartlarda lignine kovalent bağlı hemiselülozun hidrolizlenmesi sağlanarak ligninin uzaklaştırılması kolaylaştırılmış olur ancak bu işlem klorlu bileşiklerin salınmasına

bağlı olarak çevre kirliliğine sebebiyet verdiği için dezavantajlıdır (Dhawan and Kaur 2007). Yumuşak dokulu ağaçları hamur haline getirmek için yüksek sıcaklık ve pH'da aktif olan mannanazlar daha faydalıdır, çünkü hamur haline getirme bu koşullar altında gerçekleştirilir (He et al. 2008; Pan et al. 2011). Mannanaz, kâğıt hamurunun parlaklığını artırmak ve klorsuz ağartma ile hidrojen peroksit ihtiyacını azaltmak veya ortadan kaldırmak için yararlıdır (Dhawan and Kaur 2007).

Deterjan endüstrisinde kullanımı

Son yıllarda deterjan formülasyonlarında alkali stabil mannanazlar leke çıkarıcı güçlendiriciler olarak deterjanlarda kullanılmaktadır. Mannanlar genel olarak dondurmalara, soslara, saç kremlerine, şampuanlara ve diş macunlarına kıvam artırıcı ajanlar olarak eklenmektedir. Mannanların selüloz liflerine tutunma eğiliminden dolayı mannan içeren lekelerin çıkarılması da bir hayli zor olmaktadır. Ayrıca mananın zamklama etkisi de vardır yani mannanlar yıkama esnasında temiz kumaşlara aktarılmakta ve bu da kumaşların grileşmesine sebep olmaktadır (Dhawan and Kaur 2007).

Mannanaz enzimi mannoz birimlerini biribirine bağlayan β-1,4-bağlarını parçalayarak gam polimerini daha küçük karbonhidrat parçalarına bölmektedir. Bu küçük parçalar kumaşların liflerinden ayrılır ve yıkama esnasında parçalanarak uzaklaştırılır. Böylelikle mannanazlar, yıkama sırasında açığa çıkan kirlerin yeniden birikmesini de önlemektedir (Kirk et al. 2002; Schafer et al. 2005). Bu bileşimler aynı zamanda sağlık ve güzellik bakım ürünleri, sanitasyon ürünleri, kontakt lens temizleyicileri, bulaşık deterjanı ve sert yüzey temizleyicileri olarak da formüle edilebilmektedir. Farklı kaynaklardan izole edilen alkalitik-termotolerantları yüksek mannanaz enzim kaynaklarının deterjan endüstrisinde kullanılabilirliği üzerinde durulmuştur (Takeda et al. 2004; He et al. 2008; Sharounya et al. 2015).

Meyve sularında durultma işlemlerinde kullanım alanları

Sebze ve meyve suları, düşük enerji içeriğine sahip önemli bir vitamin kaynağıdır. Meyve suyu üretiminde temel işlem, kaliteyi, biyoaktif bileşikleri ve meyve suyu stabilitesini artırmak için enzimin sıvılaştırılmasıdır. Gıda endüstrisinde, meyve-sebze maserasyonu ve meyve sularının durultulması için glikozil hidrolazlarla birlikte mannan bozucu enzimler de kullanılmaktadır (Moreira 2008). β -mannanaz enzimi, meyve-sebze maserasyonu ve meyve suyu durultması gibi işlemler sırasında hem kaliteyi (verimi) ve β-karoten değerini artırmak hem de bulanıklığı azaltmak amacıyla kullanılmaktadır.

Bir çalışmada *Bacillus pumilus* M27 suşundan izole edilmiş β-mannanaz enziminin meyve sularında verimi artırma ve durutma etkisinin araştırılması sonucu β-mannanaz

enziminin uygulandığı meyve sularında özellikle elma suyunda verimin %154 oranında artığı ve mannanaz enziminin meyve sularında durultma ve verim artırma proseslerinde kullanılabilirliği üzerinde durulmuştur (Adiguzel vd 2015). Zhao et al. (2010) tarafından asidofilik *Phialophora sp*. P13 bakterisinden izole etmiş oldukları mannanaz enziminin gastrik ortamda mannanları hidrolize etme ve meyve suyu arıtma prosesinde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Enzim İmmobilizasyonu

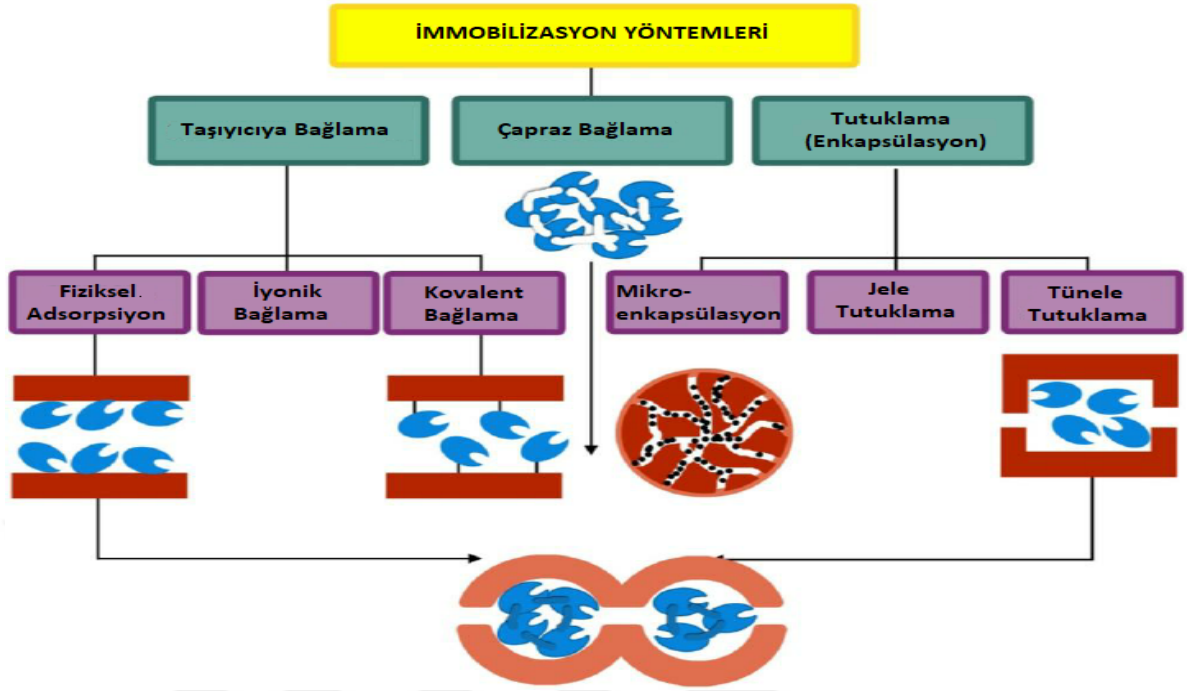
İmmobilizasyon, enzimlerin ya da mikroorganizmaların fiziksel ve/veya kimyasal yöntemlerle katalitik aktifliğini koruyarak, tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla organik veya inorganik taşıyıcılara tutulmasıdır (Yetim vd 2019).

Enzimlerin kullanımının birçok avantajı olmasına rağmen, endüstriyel alanlardaki kullanımlarıyla ilgili birkaç sorun vardır. Enzimler genellikle pahalıdır ve serbest halde enzimin aktivitesini kaybetmeden endüstriyel alanlarda tekrar kullanılması zordur, bu da onların izolasyon ve saflaştırma maliyetlerinin, sıradan katalizörlerden çok daha yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Geleneksel heterojen kimyasal katalizörlerin aksine, çoğu enzim homojen kataliz sistemlerinde suda çözünmüş olarak çalışır, bu da ürün kontaminasyonuna yol açar ve reaksiyon karışımlarının çoğundan aktif formda yeniden kullanım için geri kazanımlarını ortadan kaldırır (Homaei et al. 2013). Bu ve benzeri sorunları ortadan kaldırmak için enzim immobilizasyonu teknikleri geliştirilmiştir.

Enzimlerin hareketsizleştirilmiş formu, canlı hücrelerdeki (hücre iskeletine, zarına ve organel yapılarına bağlı olan) doğal modlarını taklit eder. Katı destek sistemleri genellikle enzimlerin yapısını stabilize ederek faaliyetlerini sürdürmelerini sağlar. Bu nedenle, çözelti içindeki serbest enzimlerle karşılaştırıldığında, hareketsizleştirilmiş enzimler daha sağlamdır ve çevresel değişikliklere karşı daha dirençlidir (Kress et al. 2002; Cao et al. 2003). Ek olarak, heterojen hareketsizleştirilmiş enzim sistemleri hem enzimlerin hem de ürünlerin kolayca geri kazanılmasına, enzimlerin birden çok yeniden kullanımına, enzimatik işlemlerin sürekli çalışmasına, reaksiyonların hızlı sonlandırılmasına ve daha çeşitli biyoreaktör tasarımlarına izin verir. (Kress et al. 2002).

Enzim immobilizasyon teknolojisi, modern endüstriyel biyoteknolojinin anahtarlarından biridir. 1960'larda ilk immobilize enzimlerin ticari kullanımından bu yana, enzim immobilizasyon teknolojileri ve teorileri ile immobilizasyon malzemeleri ve kimyası hızlı bir gelişme göstermiştir. Günümüzde, farklı özel uygulamalara uyan immobilize enzimlerin tasarımı, geleneksel deneme-yanılma yaklaşımını terk etmiş ve yavaş yavaş rasyonel

tasarıma geçmiştir. Enzim immobilizasyon teknolojisi, aktivite, kararlılık ve seçicilik gibi enzimlerin katalitik fonksiyonlarının iyileştirilmesinde kullanılmaktadır (Cao 2011).



Şekil 13. Enzim immobilizasyon yöntemleri (Hartmann and Jung 2010)

Taşıyıcıya bağlamada enzim molekülünün protein yapısından yararlanılır. Molekül yüzeyindeki iyonik-fonksiyonel gruplar ve hidrofobik bölgeler bağlamada rol alırlar. (Telefoncu 1997). Taşıyıcıya bağlama fiziksel (van der Waals ve hidrofobik etkileşimler), kovalent ya da iyonik bağlar ile gerçekleştirilebilir (Vaghari et al. 2016).

Çapraz bağlama yöntemi enzimlerin iki ya da çok fonksiyonlu reaktantlar vasıtasıyla serbest amin ve karboksil gruplarıyla veya aktif molekülleri ile bağ kuracakları protein moleküllerine ya da çözünmeyen bir taşıyıcı üzerinde bulunan fonksiyonel gruplara, kovalent bağlarla üç boyutlu çapraz bağlanarak suda çözünmeyen kompleksler oluşturması yöntemidir (Sheldon et al. 2007). Proteinlerin çözünmeyen taşıyıcıya çapraz bağlanmasıyla enzimin substrat çözeltisinde kaybolması önlenir. Çapraz bağlı enzim kristalleri ve çapraz bağlı enzim kümeleri gibi taşıyıcı içermeyen hareketsizleştirilmiş enzimleri hazırlamak için en yaygın olarak glutaraldehit olmak üzere iki işlevli bir çapraz bağlama maddesi kullanır (Gröger et al. 2001). Çapraz bağlama maddesinin moleküler ağırlığı, enziminki ile karşılaştırıldığında önemsizdir, böylece elde edilen biyokatalizör %100 aktif enzim içerir.

Tutuklama; enzimin sırasıyla poliakrilamid ve silika sol-jel gibi tipik olarak organik veya inorganik polimer matrisler içinde tutulmasıdır. Fiziksel tutuklama genellikle çok zayıftır, bu nedenle enzim kaybını önlemek için çoğunlukla kovalent bağlamanın da ek olarak kullanılması gerekmektedir (Sheldon and van Pelt 2013). Bu yöntem, enzimi tutarken substrat

ve ürünlerin geçmesine izin vermektedir. Jel veya fiber içinde tutuklama ve mikro kapsülleme gibi enzim immobilizasyon metotları kullanılmaktadır. Tutuklama metodunda genellikle polimerik matriks sentezi için reaksiyon ortamında enzimin de bulunması gerekmektedir (Homaei et al. 2013; Najafi et al. 2014; Vaghari et al. 2016). Bu yöntemi çapraz ve kovalent bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli fark, enzimin kimyasal veya fiziksel olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır.

Tutuklama metodunun en önemli avantajı, farklı yapıda birden fazla enzimin, hücresel organel ve farklı çaptaki mikroorganizmanın eş yöntemler kullanılarak aynı anda immobilizasyonunun yapılabilinmesidir. İmmobilizasyon sonucunda enzimin modifikasyona uğramaması ve immobilizasyonun yüksek molekül ağırlıklı enzim inhibitörlerinin etkisini yok etmesi yöntemin avantajları arasında sayılmaktadır. Yüksek molekül ağırlıklı substratların hapsedilmiş enzimlerle etkileşime geçmelerinin zor olması, taşıyıcıların yenilenememesi ve aktive olmamış enzim moleküllerinin membrana yapışıp reaksiyon çözeltisine geçişte azalmaya neden olmaları yöntemin dezavantajları arasında sayılmaktadır.

En önemli metal oksit nanopartiküllerinden biri olan çinko oksit nanoparçacıkları kendine özgü fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Smijs and Pavel 2011; Ruszkiewicz et al. 2017; Ishwarya et al. 2018). Çinko oksit nanopartikülleri, yüksek yüzey alanı-hacim oranına, agrega eğilimi göstermelerine, yüksek elektron hareketliliğine sahip olduklarından dolayı immobilizasyon için uygun koşullar yaratmaktadır (Liu et al. 2005; Hooda 2018b) Ek olarak, nano ZnO, yüksek fotostabilitesi, biyolojik bozunabilirliği, biyouyumluluğu ve kimyasal stabilitesi nedeniyle çok işlevli bir malzeme olarak sınıflandırılmıştır (Kołodziejczak-Radzimska and Jesionowski 2014; Malini et al. 2015; Chen et al. 2017). Çinko oksit, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından “GRAS” (Generally Recognized As Safe) bir madde olarak derecelendirilmektedir (Rasmussen et al. 2010).

KURUMSAL TEMELLER

Zamudio et al. (2001), yaptıkları çalışmada altı laktik asit bakteri kültürü için fitaz aktivitesi incelenmiştir. *Lactobacillus plantarum'* un en yüksek aktivite gösteren bakteri olduğu bulunmuş olmasına rağmen, fitaz aktivitesinin düşük olduğu belirtilmiştir. Enzimin fitat indirgeme aktivitesi ile daha ileri karakterizasyonu, 52 kDa'lık bir moleküler ağırlık ve optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcalık değerlerini sırasıyla pH 5.5 ve 65°C olarak göstermiştir.

Phothichitto et al. (2005), Mananaz üretimi gösteren 19 bakteri ve dört mantar yirmi üç toprak örneğinden izole edilmiştir. İzolat NT 6.7, yüksek mannanaz aktivitesi (0.306 birim / mL) göstermiştir, patojenlere karşı geniş inhibisyon sergilemiştir. Tür morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve 16 S rDNA dizisi testleri ile *Bacillus circulans* olarak tanımlanmıştır. Bu suştan elde edilen manannaz aktivitesi optimum pH 7.0-9.0, optimum sıcaklık 50 °C'de ve yüksek stabiliteye 50 °C'de sahip olduğu belirtilmiştir. *B. circulans* NT 6.7'den üretilen mannanazın prebiyotik preparasyonda uygulanabileceğini göstermiştir.

Haros et al. (2005), *Bifidobacterium spp*. 'de fitaz aktivitesini ilk kez tespit etmişledir. Bu bakteriler fitik asidi defosforile edebilmiştir (miyo-inositol heksafosfat, IP6) ve birkaç miyo-inositol fosfat ara ürünü oluşturmuştur. *B. pseudocatenulatum*, en yüksek fitaz aktivitesi seviyelerini göstermiştir. Bu bakteri türleri büyümenin üstel fazında ve frukto-oligosakaritler kültür ortamında karbon kaynağı olarak kullanıldığında maksimum aktivite göstermiştir. IP6'nın antinutritional özelliklerinin azaltılmasında *Bifidobacterium spp.* 'den fitaz aktivitesinin potansiyel rolü tartışılmıştır.

Songre-Ouattara et al. (2008), Beslenme için önemli olan darıdan mayalanmış yulaftan izole edilen laktik asit bakterilerinin enzim aktivitesini araştırmışlardır. Seçilmiş 30 adet LAB suşlarının amilaz, fitaz ve α- galaktosidaz üretme yeteneklerini incelemişlerdir. Bu enzimleri üretebilen iki *L. plantarum* suşu (4.4 ve 6.1) ve üç *L. fermentum* suşu (11.11.2, 3.7, 7.4) saptanmıştır. Bu 5 suşta fitaz enzim aktivitesi belirlenmiş ve en yüksek fitaz aktivitesi *Lb. Plantarum'* un 4.4 ve 6.1 suşlarında (348.7 + 17.4 U/mL ve 276.3+51.4 U/mL), *Lb. fermentum'*da ise 7.4 (276.3 +13.2 U/mL) olarak belirlenmiştir.

Sümengen (2011), fermente gıda ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus sp.* suşlarından fitaz enzimi izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirmiştir. Fitaz enzimi üreten mikroorganizmaların etrafında şeffaf zonlar saptanmıştır. *Lactobacillus sp.* 12.1 ve *Lactobacillus sp.* 13.1'den izole edilen enzimlerin en iyi fitaz aktivitesi gösterdiği

belirlenmiştir. *Lactobacillus sp.* 12.1 suşundan üretilen fitazın SDS-PAGE analizinde iki protein bandı elde edilmiş ve molekül ağırlıkları 73 kDa ve 34 kDa olarak belirlenmiştir. Sırasıyla 12.1 intraselüler ve 12.1 ekstraselüler enzim optimum aktivitesini 110 ^{o}C ve pH 3.4, 120 ^{o}C ve pH 3.4'de gösterdiği belirlenmiştir. *Lactobacillus sp.* 13.1 suşundan izole edilen fitazın moleküler ağırlığı 45 kDa olarak saptanmıştır. 13.1 intraselüler ve ekstraselüler enzimin optimum aktivitesini 120 ^{o}C ve pH 3.4'de gösterdiği belirtilmiştir. Her iki *Lactobacillus sp.* suşundan elde edilen enzimlerin endüstriyel alanda kullanımının uygun olduğu belirtilmiştir.

Yin et al. (2012), Keçiboynuzu zamkı (LBG) mannanaz üreten bakterileri taramak için kullanılmıştır. En yüksek mannanaz kabiliyetine sahip bakteri, *Paenibacillus cookii* olarak tanımlanmıştır. 27°C'de 4 gün inkübasyondan sonra % 1.5 soyaton ve % 0.5 tripton ile % 0.1 LBG' de yetiştirildiğinde en yüksek aktiviteyi (6.67 U / mL) göstermiştir. GLFGINAY'in bir N-terminaline sahip saflaştırılmış mannanaz, sırasıyla pH 5.0 ve 50 °C'de optimum pH ve sıcaklığa sahip olduğu ve pH 5.0-7.0, ≤50°C'de stabil olduğu belirlenmiştir. Saflaştırılmış mannanaz, LBG ve konjac'a yüksek spesifiteye sahip olduğu belirtilmiştir.

Sarıbuğa (2013), *Lactobacillus sp.* suşlarından fitaz enziminin izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Suşların fitaz üretimi kolonilerin etrafında oluşan zon üretimi ile belirlenmiştir. En iyi aktivite gösteren *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacilus acidophilus'*dan üretilen enzimlerin maksimum aktiviteleri pH 6,0'da 167,3 EU/mL ve pH 5,0'de 163,1 EU/mL olarak belirlenmiştir. *Lactobacillus plantarum* ekstraselüler enzimi, 25°C'de 10 dakika süreyle en yüksek aktivite gösterirken, 10-100°C arasındaki sıcaklıklarda 2 saat boyunca enzim aktivitesini %90'nın üzerinde koruyabildiği saptanmıştır. *Lactobacilus acidophilus* extraselüler enzimi 30°C'de 10 dakika süreyle en yüksek aktivite gösterirken, 10-100°C arasındaki sıcaklıklarda 2 saat boyunca enzim aktivitesini %90'nın üzerinde koruyabilmiştir. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacilus acidophilus* enzimlerinin karakteristik özelliklerden dolayı endüstriyel alanda kullanıma uygun olduğu belirlenmiştir.

Khodaii et al. (2013), ticari probiyotik preparatlardan, süt ürünlerinden ve tip suşlardan izolatlar da dahil olmak üzere 43 laktik asit bakterisinin fitat parçalanma aktivitesi ölçülmüştür. Farmasötik probiyotikler, süt ürünleri ve tip suşlardan bifidobakteri ve laktobasil izolatlarının fitat parçalayıcı aktivitesi belirlenmiştir. Probiyotik bakterilerin enzim aktivitesi 1.1-5.4 mU arasında değişmiştir ve türe özgü olmadığı belirlenmiştir. Fitaz aktivitesinin, gıda katkı maddesi olarak kullanılmak üzere probiyotiklerin yararlı bir ek özelliği olabileceği belirtilmiştir.

Sadigh (2014), serbest ve immobilize *Brevibacillus brevis* (P14) ve *Brevibacillus borstelensis* (P35) bakterileri kullanılarak keçiboynuzu (KB) ve mısır (MSR) bulunan doğal besiyeri ortamında fitaz ve mannanaz enzim üretimi yapılmıştır. KB ve MSR doğal karbon

kaynakları kullanılarak yapılan *B. brevis* ve *B. Borstelensis* bakterilerinin fitaz ve mannanaz enzim üretiminin, serbest haldeki izolatlara göre, bağlı olanlarda yaklaşık % 59-81 civarında bir artış gözlemlenmiştir. Sonuç olarak magnetit florosil nanopartiküle bağlı test strainlerinin gıda, ziraat, ilaç başta olmak üzere birçok endüstriyel alanda güvenle kullanılabileceği belirtilmiştir.

Adiguzel vd (2014), Termo alkalin mannanaz, *Bacillus pumilus* (M27)'den saflaştırılmıştır. Jel filtrasyon kromatografisi ve SDS-PAGE elektroforez sistemlerinde enzimin 35 kDa ve 55 kDa olmak üzere 2 alt birimine sahip olduğu ve optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla pH 8 ve 60°C olarak belirlenmiştir. Enzimin pH 3-11 aralıklarında ve yüksek sıcaklıklarda aktivitesini kaybetmediği, bazı metal iyonlarının mannanaz enzim aktivitesini etkilediği belirlenmiştir. Saflaştırılmış mannanaz enziminin portakal, kayısı, üzüm ve elma gibi bazı meyve suları ile arındırma işlemi de araştırılmıştır. En yüksek saf enzimin elma suyunun %154 oranında arıtılmasında etkili olduğu belirtilmiştir.

Dokuzparmak (2015), Fitaz enzimi yeni tanımlanmış bir termofilik bakteri türü olan *Geobacillus sp.* TF16'dan saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim SDS-PAGE ile analiz edildiğinde 106,04 kDa molekül ağırlığına sahip tek bir protein bandı tespit edilmiştir. Saflaştırılan enzimin sodyum fitat substratı varlığında 85°C'de pH 4,0'de optimum sıcaklık ve pH'ya sahip olduğu belirlenmiştir. Proteaz enzimleri varlığında *Geobacillus sp*. TF16 fitazının %62 oranında aktivitesini koruduğu saptanmıştır. *Geobacillus sp*. TF16 fitazının soya sütü fitatını parçalama etkinliği incelenerek 4. saatin sonunda fitaz enziminin yaklaşık %20 oranında hidrolizleme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Baygın (2015), Farklı bölgelerdeki toprak örneklerinden 300 adet bakteri izole edilmiş 236 bakteri *Bacillus* cinsi olarak tanımlanmıştır. Bütün suşların fitaz aktiviteleri tespit edilmiş ve toplam 20 *Bacillus sp.* suşunun ekstraselüler fitaz ürettiği belirtilmiştir. *Bacillus sp.* EBD 9-1 suşunun 48. saate maksimum seviyede fitaz ürettiği saptanmıştır. Sırasıyla laktoz ve buğday kepeği, et özütü, $CaCl_2$ varlığında enzim üretimi %94, %74 ve %34 oranında arttığı belirtilmiştir. Fitaz üretimini artırmak için nitrojen kaynakları, karbon ve metal iyonlarının birleştirilmesi ile yeni bir ortam elde etmişlerdir. Enzim veriminin bu ortamda, bazal ortamına kıyasla %48 artırıldığı belirtilmiştir.

Çelenkli (2015), *Lactobacillus plantarum* bakterisi kullanılarak, mısır (MSR) ve buğday (BGDY) bulunan doğal besiyeri ortamında serbest ve immobilize fitaz ve mannanaz enzimlerinin üretimi yapılmıştır. Fitaz ve mannanaz enzimlerinin üretimi hem serbest hem de matrikse bağlı mikroorganizmalar ile gerçekleştirilmiştir. *L. plantarum* bakterisinin fitaz ve mannanaz enzimleri üretiminin, serbest haldeki izolatlara göre bağlı olanlarda yaklaşık %10-

15 civarında bir artış gözlemlenmiştir. Manyetit florisil nanopartiküller bağlı test sonuçlarının gıda, ziraat, ilaç başta olmak üzere birçok endüstriyel alanda güvenle kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Patki et al. (2015), çalışmanın amacı, fitaz üreten bakterileri mangrov toprağından izole etmek ve ardından enzimin ekstraksiyonu ve saflaştırılması olarak belirtilmiştir. Hidroliz verimi hesaplanmış ve hidroliz verimi daha yüksek olan 5 izolat fitaz üretimi için incelenmiştir. Fitaz enzimi, çalkalanmış şişe fermantasyonu kullanılarak üretilmiş ve amonyum sülfat çökeltmesi ve diyaliz kullanılarak kısmen saflaştırılmıştır. Kısmen saflaştırılmış enzim, 45-55 °C'lik optimum bir sıcaklık aralığı göstermiş ve 60 °C'de %51 aktiviteyi korumuştur. Optimum pH değeri 5 olarak kaydedilmiş ve enzimin, pH 2-5 aralığında stabil olduğu belirtilmiştir.

Dhawan et al. (2015), Bir toprak örneğinden ekstraselüler β-mannanaz üretebilen *Paenibacillus thiaminolyticus* izole edilmiştir. Bakterinn, 50°C' de 45 U/mL β-mannanaz ürettiği belirtilmiştir. Saf enzimin aktivite gösterdiği optimum pH' nın 6.0 ve optimum sıcaklığın 60°C olduğu saptanmıştır. Enzim, 37°C'de %65 nispi enzim aktivitesi göstermiştir. *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus sp.* enzimatik olarak türetilmiş oligosakaritlerin eklenmesine olumlu yanıt vermiştir ve sayıları önemli ölçüde artmıştır.

Nadaroglu vd (2015), β-mannanaz *Lactobacillus plantarum* (M24) bakterisinden saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış mannanaz enzimi 50°C ve pH 8'de maksimum aktivitesini göstermiştir ve ayrıca enzimin 5-11 pH aralığında ve 50°C'nin üzerinde stabil olduğu belirlenmiştir. Fe^{2+}, Ca^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+} ve Zn^{2+} gibi bazı metal iyonlarının mannanaz enzimi üzerindeki etkileri incelenmiş ve tüm metal iyonlarının mannanaz enziminin aktivasyonu üzerinde önemli etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Saflaştırılmış mannanaz enziminin portakal, kayısı, üzüm ve elma gibi bazı meyve sularının arıtılmasındaki etkinliği araştırılmıştır. Durultma işlemleri sırasında şeftali suyunun berraklaştırılmasında en fazla % 223.1 oranında enzim ham ekstraktlara göre daha etkili olmuştur.

Adiguzel vd (2015), Erzurum'da yerel bir marketten toplanan fermente sosis numunesi ile laktik asit bakterilerinin izolasyon ve karakterizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA'nın sekans analizi sonucunda bu bakterinin %99 oranında *Weissella viridescens*'e (GenBank No: KM365459) benzer olduğu bulunmuştur. *Weissella viridescens*' den β-mannanaz enzimi saflaştırılmış ve elde edilen mannanaz, pH 5 ve 40 ° C'de maksimum aktivite göstermiştir ve enzimin, sıcaklık 50°C'den yüksek olduğunda pH 2–11 aralığında oldukça kararlı olduğu belirlenmiştir. Cu^{2+}, Fe^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+} ve Zn^{2+} gibi iyonların mannanaz aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmış ve Ca^{2+} dışındaki tüm metal iyonları enzim aktivitesini pozitif

yönde önemli ölçüde etkilemiştir. Saflaştırılmış enzimin %117,21 oranında kivi suyunun arıtılmasında kullanılabilecek en etkili enzim olduğu belirlenmiştir.

Marco et al. (2015), β-mannanaz, bir karbon kaynağı olarak soya fasulyesi kabuğu üzerinde büyütülen mezofilik mantar Aspergillus foetidus'un ham özütünün örneklerinden izole edilmiştir. Enzim, ultrafiltrasyon ve jel filtreleme kromatografisi prosedürleriyle kısmen saflaştırıldı ve Man 58 olarak adlandırılmıştır. Man 58' in, 60 °C' de ve pH 4.0'da en aktif olduğu belirtilmiştir. Çoğunlukla FeSO4 ve CoCl2 tarafından aktive edilmiştir ve MgSO4, FeCl3, CuSO4, MgCl2, ZnCl2, ZnSO4, CaCl2, CuCl2, KCl ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA) tarafından inhibe edilmiştir.

Kalkan (2016), daha önce Türkiye kıyılarındaki sediment ve sünger örneklerinden izole edilmiş olan 110 adet denizel türevli fungus suşu fitaz aktiviteleri bakımından değerlendirilmiştir. İlk taramadan sonra 45 izolatın (%41) aktif fitaz üreticisi olduğu belirlenmiştir. Bunların içinden tarama ortamındaki göreceli fitaz aktivitelerine göre altı izolat seçilmiş ve fungal tanımlamaları yapılmıştır. Tanımlama ve aktivite sonuçlarına göre iki izolat; *Aspergillus niger* MF28 ve *Penicillium polonicum* MF82 ileri çalışmalar için seçilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda, *Penicillium polonicum* MF82 fitazının endüstriyel uygulamalar için birçok üstün özelliğe sahip olduğu ortaya konulmuştur. *Penicillium polonicum* MF82 fitazının ticari uygulamalar için iyi bir aday olduğu görülmektedir.

Sandıkçıoğlu (2016), *Aspergillus niger* tarafından ekstrasellüler olarak sıvı besi ortamında üretilen fitaz enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve aseton çöktürmesi işlemleri uygulanarak kısmen saflaştırılmıştır. Enzim üretimi için en uygun kaynağın mısır nişastası olduğu belirlenmiştir. Enzimin aktivitesi pH 3.5 ve 16 °C maksimum olarak bulunmuştur. Broiler civcivleri ve gökkuşağı alabalıkları aralarındaki fark kısa sürelerde normal yem ile beslenen monogastrik hayvanlara göre daha az yem tüketimi ve hızlı büyüme olduğu belirlenmiştir.

Nadaroglu vd (2016), Erzurum'da yerel bir marketten Türk fermente edilmiş sosis satın alınmış ve laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve karakterizasyonu için kullanılmıştır. 16S rRNA analizi sonucunda bu bakteri %99 oranında *Pediococcus acidilactici* (Genbank erişim numarası KF895384) olarak belirlenmiştir. *P. acidilactici'den* (M17) elde edilen mannanaz saflaştırılmıştır. Mannanazın Mn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} ve Ca^{2+} 'ya direnci incelenmiş ve tüm metal iyonlarının enzimi önemli ölçüde aktive ettiği belirlenmiştir. Bazı meyve sularını berraklaştırmak için saflaştırılmış mannanaz kullanılmıştır. Saflaştırılan mannanazın %161.1 ile portakal suyunda maksimum verime sahip olduğu görülmüştür. Elma suyunda maksimum arıtma %84.65, üzüm suyu arıtma ve şeker azaltımı 19.26 mg / mL olarak elde edilmiştir. *P.*

acidilactici (M17) mannanazın meyve suyu endüstrisinde başarıyla kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Ge et al. (2016), *Bacillus licheniformis* HDYM-04 bakterisinden β-mannanaz saflaştırılmıştır. Enzim aktivitesi için optimum sıcaklık ve pH, sırasıyla 60°C ve 8.0 olduğu belirtilmiştr. Enzim aktivitesin bazı metal iyonlarının artırdığı ve β-mercaptoethanol, DTT, SDS, Tween and EDTA tarafından inhibe edildiği belirlenmiştir. Yapısal olarak farklı on boya, 24 saat içinde β-mannanaz ile etkin bir şekilde renksiz hale getirilebileceği belirtilmiştir. Bu özellik, bileşiğin tekstil ve kâğıt yapımı endüstrilerindeki gereksiz boyaların rengini açmak için kullanılabileceğini göstermiştir.

Yatmaz (2016), Magnezyum silikat ve alüminyum oksit mikropartikülleri kullanılarak rekombinant *Aspergillus sojae*'nin hücre gelişiminin keçiboynuzu ekstraktı besiyerinde kontrolünün sağlanması ve β-mannanaz enzimi üretiminin arttırılması amaçlanmıştır. β-mannanaz enziminin fermentasyon sıvısından kısmi saflaştırılması, liyofilizasyonu ve enzim karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. En yüksek β-mannanaz aktivitesi değeri 568,72 U/mL olarak 5 g/L magnezyum silikat ilave edilen erlenmayer denemesinde elde edilmiştir. Biyoreaktör denemelerinde ise en yüksek β-mannanaz aktivitesi değeri 643,16 U/mL olarak 3 g/L magnezyum silikat ilave edilen besiyerinde hesaplanmıştır. Enzimin optimum çalışma pH ve sıcaklık aralığı sırasıyla pH 5-6 ve 50-60°C olarak belirlenmiştir. Keçiboynuzu gamı da β-mannanaz enzimi için en iyi substrat olarak belirlenmiştir. Sonuçlar rekombinant *Aspergillus sojae* ile biyoreaktörde β-mannanaz enziminin üretiminde farklı mikropartikül ajanlarını içeren keçiboynuzu ekstraktının substrat olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Dhingani et al. (2017), 32 örnekten toplam 57 bakteri izolatı toplanmıştır. Bunlardan 33 LAB izolatı, morfolojik ve ön biyokimyasal karakterizasyon temelinde doğrulanmıştır. Probiyotik potansiyele sahip 8 LAB izolatları seçilmiştir. Bunlar, bağırsaktaki çeşitli mineral ve proteinlerin elde edilmesi için çok önemli olan fitaz aktivitesi için ayrıca değerlendirilmiş ve önemli fitaz aktivitesi gösteren 2 LAB izolatı bulunmuş, karakterize edilmiştir. Morfolojik, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyon çalışmaları, İzolat 21'in *Pediococcus acidilactici* (KU173544) ve Isolate 24'ün (KU173545) bir *Pediococcus lolii* suşu olduğunu ortaya koymuştur.

Malkoç (2017), taze kaşar peynirinden izolasyonu yapılmış olan *Lactobacillus brevis* suşunun 16S rRNA ile moleküler tanılanması, bakterinin fitaz enzimi aktivitesi ve endüstriye kazandırılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. % 99 oranında tanımlanan *Lactobacillus brevis*'ten üretilen ekstraselüler fitaz enziminin optimum sıcaklığı 50°C, optimum pH'sı ise 3,0 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre bu bakterinin ürettiği enzimin karakteristik

özelliklerinden dolayı endüstriye kazandırılabileceği, gıda sektöründe starter kültür olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Seesom et al. (2017), Isıya dayanıklı *Bacillus sp.* SWU60 saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve geni klonlanmış ve *Escherichia coli*'de aşırı eksprese edilmiştir. Enzimin moleküler kütlesi 38 kDa, enzim aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık, sırasıyla 6.0 ve 60°C olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi Hg^{2+} tarafından inhibe edilmiştir. *Bacillus sp*. SWU60'tan hem doğal hem de rekombinant ManS2, özellikle gıda ve yem olmak üzere birçok endüstride uygulanabileceği belirtilmiştir.

Kızılkaya (2018), doğal kaynaklardan izole edilen *Lactococcus lactis* ve *Lactobacillus brevis* suşlarının 16S rRNA ile moleküler tanılanması, bakterilerin fitaz enzim üretme aktivitelerinin test edilmesi, probiyotik özelliklerinin literatür çalışması yapılarak endüstriye uygunluğunun araştırılması amaçlanmıştır. %99 oranında tanılanan *Lactococcus lactis*'ten üretilen ekstraselüler fitaz enzimi optimum pH'sı 8.0, optimum sıcaklığı 60°C olarak bulunurken; *Lactobacillus brevis*'ten üretilen ekstraselüler fitaz enziminin optimum pH'sı 3.0, optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur. *L. lactis* ve *L. brevis*' in pH aralığının çok geniş olması ve optimum sıcaklıklarının endüstriyel uygulamalara uyumlu olduğundan ve probiyotik özelliklerinin üstünlüğünden dolayı endüstriye sunulabileceği belirlenmiştir.

Özdemir (2018), Ege bölgesinde yer alan sıcak su kaynaklarından alınan toprak ve sediment örnekleri ile mantar çiftliklerinden alınan kompost örneklerinden 50 adet termofilik/termotolerant fungus izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bu fungus izolatları polifazik yaklaşımla tanımlanmıştır. 50 adet izolatın fitaz aktivitesi kantitatif olarak belirlenmiştir. 50 adet izolattan 44 adedinin (%88) aktif fitaz üreticisi oldukları belirlenmiştir. İçlerinden en yüksek spesifik aktiviteye sahip izolat olan 4.5.37 numaralı izolat ileri çalışmalar için seçilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları ve tanımlama çalışması sonucunda *Aspergillus tubingensis* olarak tanımlanan, 4.5.37 numaralı izolatın ürettiği fitaz enziminin birçok koşul bakımından endüstriyel uygulamalarda kullanılması için uygun olduğunu gösterilmiştir. *Aspergillus tubingensis*, 4.5.37 fitazının ticari bir fitaz olarak kullanılabilecek bir enzim olduğu düşünülmektedir.

İşleyen (2018), *Bacillus subtilis*, recombinant fitaz üretimi için konakçı hücre olarak seçilmiştir. *B. subtilis* 168 suşundan klonlanan fitaz geni, proteaz yoksunu olan *B. subtilis* RIK1285 suşuna aktarılmıştır. Fitaz aktiviteleri 0.03-0.3 U/mL arası değişkenlik gösteren toplamda yirmi dokuz tane *B. subtilis* transformantı elde edilmiştir. Seçilen rekombinant plazmidlerin sekanslama sonuçları, kolonilerin lipB ya da dltD sinyal peptidi içerdiğini ortaya

çıkarmıştır. Çalışmada rekombinant enzim üretim verimini arttırmak için sadece moleküler düzeydeki modifikasyonların değil, büyüme ortamı seçiminin de önemi vurgulanmıştır.

Demir vd (2018), Lor peynir kaynaklarından izole edilen *Lactobacillus coryniformis* suşundan fitaz izolasyonu, fitaz saflaştırması ve karakterizasyonu çalışılmıştır. Enzim, % 2.60 geri kazanım ve 202.25'lik spesifik bir aktivite (EU / mg protein) ile elde edilmiştir. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi ile enzimin moleküler kütlesi 43,25 kDa olarak belirlenmiştir. Enzim için optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 60 ° C ve 5.0 olarak bulunmuştur. Ca^{2+}, Ag^{+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+} ve Ni^{2+} metal iyonlarının enzim üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Nadaroğlu ve Dikbaş (2018), Mannanaz alkalin termo *Lactobacillus plantarum*'dan (ATCC® 14917TM) % 36 verim ve 111 katında saflaştırılmıştır. Optimum pH 10 ve 40 ° C optimum sıcaklıkta belirlenmiştir. Enzim aktiviteleri 30-80 ºC arasında korunmuştur. Geniş bir aralıkta saflaştırılmış mannanazın çoğunlukla yüksek sıcaklıklarda stabil olduğu gözlenmiştir. $Ca^{2+,}$ Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+} ve Ni^{2+} gibi bazı metal iyonlarının mannanaz enzimlerinin aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiş ve tüm metal iyonlarının enzim aktivitesini artırdığı belirtilmiştir.

Bhagat et al. (2019), Laktik asit bakterileri (LAB) fitaz üretme potansiyelleri açısından taranmış. Maksimum fitaz aktivitesi gösteren suş, probiyotik özellikleri açısından incelenmiştir. Yenilebilir bir kaynak olan Kalarei'den izole edilen 20 LAB arasından, maksimum enzim aktivitesi gösteren iki izolat KJ (a) ve K (5.18 U / mL ve 5.0 U / mL) seçilmiştir. Fitaz üretimi için optimizasyon çalışmalarında, izolat K maksimum (5.92 U / mL) enzim aktivitesi göstermiştir. Tür, ribotipleme yoluyla *Lactobacillus paracasei* olarak tanımlanmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı 70 kDa idi ve optimum aktivite 37 °C, pH 5.5'te belirlenmiştir. Bu suş *Lactobacillus paracasei* SMVDUDB1 olarak adlandırılmış ve önemli probiyotik özellikler göstermiştir.

Şabahat (2019), *Bacillus licheniformis'* lerin yaşam alanlarından olan sıcak su kaynaklarından elde edilen fitazın termofilik olarak üretilmesi ve ticari kullanılabilirliği hedeflenmiştir. Affinite kromotografik tekniklerinde biri olan Nikel affinitesi ile rekombinant proteinler saflaştırılmıştır. *Bacillus licheniformis* ait fitazın, *E. coli*' de klonlanması sağlanmış ve rekombinant olarak üretilmiştir.

Suryawanshi et al. (2019), *Aspergillus quadrilineatus* RSNK-1, (U / gds) β-mannanaz (1021), endo-ksilanaz (19 1), α-galaktosidaz (3.42), β-ksilosidaz (0.07) ve β-glukozidaz içeren çok enzimatik bir sistem üretmiştir. İmmobilize enzim (Man-AOP) gelişmiş termal ve pH stabilitesi göstermiştir. Man-OP elma, kivi, portakal ve şeftali sularının temizlenmesinde etkili

olmuştur ve indirgeyici şeker içeriğini artırmıştır. Biyokonjugat, mannandan MOS üretimi ve meyve sularının zenginleştirilmesinde faydalı olduğu belirtilmiştir.

Blibech et al. (2019), Ekstraselüler β-mannanazları üretebilen toprakta doğan beş *Bacilli* (US134, US150, US176, US180 ve US191) seçilmiştir. *Bacillus subtilis* US191'in test edilen tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu, test edilen bakteriyel patojenlerin büyümesini inhibe ettiği ve termostabil bir β-mannanaz ürettiği gösterilmiştir. US191'in in vitro buğday kuru maddesini en yüksek sindirme kabiliyetine sahip suşlar arasında olduğu belirtilmiştir. β-mannanaz üreticisi olan *Bacillus subtilis* US191'in yem endüstrisi için önemli bir probiyotik adayı olduğu belirtilmiştir.

Ajith et al. (2019), Bu çalışmada, yeni bir mantar türü olan *Aspergillus foetidus* MTCC 11682, poli üretan küpler üzerinde immobilize edilmiş ve fitaz üretimi, saflaştırma ve moleküler karakterizasyon için kullanılmıştır. Bu yöntemle üretilmiş olan fitaz, % 13 protein geri kazanımı ile amonyum sülfat çökeltmesi ve Sephacryl S-200HR jel fltrasyonu ile 23.4 katına (ham özütle karşılaştırıldığında) kısmen saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış fitaz, daha geniş bir pH ve sıcaklık stabilitesi sergilemiştir. Elektroforez analizi, fitazın indirgeyici olmayan durumda 90.5 kDa ve indirgeyici SDS-PAGE üzerinde 129.6 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu çalışma, diğer uygulamalar için fitazın yeni özelliklerini keşfetmek için yeni bir ufuk açtı.

Karahalil vd (2019), bu çalışmanın amacının keçiboynuzu ekstraktında yetiştirilen *Aspergillus sojae* içinde eksprese edilen *Aspergillus fumigatus*'tan β-mannanazın saflaştırılması ve ardından fiziko-kimyasal, kinetik ve termodinamik özelliklerinin belirlenmesi olduğu belirtilmiştir. Üretilen β-mannanazın moleküler ağırlığı, optimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla 56-60 kDa, pH 6 ve 60 °C olduğu belirlenmiştir. β-mannanazın keçiboynuzu zamkına karşı en yüksek substrat spesifikliğini gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Zhao et al. (2020), 36.7 kDa'lık bir hücre dışı mannanaz bir laktik asit bakteri (LAB) türü *Lactobacillus casei* HDS-01'den saflaştırılmıştır. LC-GC/GC, HDS-01 mannanazın 338 amino asit kalıntısı içerdiğini belirlemiştir. HDS-01 mannanazın optimal reaksiyon koşulu 40 °C ve pH 5.0 olduğu belirlenmiştir. pH değeri 5.0–7.0 ve 30–60 °C koşullarında 2 saatlik inkübasyondan sonra% 50'den fazla aktivite göstermiştir. HDS-01 mannanaz, meyve sularını ticari mannanazdan daha verimli bir şekilde arıtmıştır. HDS-01 mannanazın çeşitli özellikle gıda sınıfı endüstriyel alanlarda kullanılacağı belirtilmiştir.

Penidez et al. (2020), Bu çalışmanın amacının, fitaz aktivitesine sahip psödokerlerden izole edilen laktik asit bakterilerini (LAB) seçmek, üretimlerini ve aktivitelerini karakterize etmek ve enzimi saflaştırmak olduğu belirtilmiştir. *Lactobacillus* (L.) *plantarum* CRL1964

(PhyLP)'un fitazı, değerlendirilen 73 LAB'den en yüksek spesifik aktiviteyi gösteren bakteri olduğu belirtilmiştir. PhyLP' nin termostabil olduğu ve asidik koşullar altında aktivitesini sürdürdüğü belrtilmiştir. PhyLP kısmen saflaştırılmış ve 55 kDa'lık bir moleküler kütle göstermiştir. *L. plantarum* CRL1964 ve / veya PhyLP' un, hayvan yemi ve / veya besin değerini iyileştiren gıda endüstrisi için tahıl ürünlerin işlenmesine dâhil olma potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir.

MATERYAL VE METOD

Materyal

Çalışmada Kullanılan Alet ve Ekipmanlar

- ✓ Steril Kabin (ESCO Class 2 Nuaıre 425-500E)
- ✓ Steril Öze (ORLAB)
- ✓ Plastik Petri Plakları (ISOLAB)
- ✓ 2mL Eppendorf Tüpleri (ISOLAB)
- ✓ 50 mL Falkon Tüpleri (ISOLAB)
- ✓ Etüv (MEMMERT)
- ✓ UV- Spektrofotometre (SHIMADZU UV-1800 UV-VIV)
- ✓ Santifrüf Cihazı (BECKMAN COULTER)
- ✓ Isıtmalı Magnetik Karıştırıcı (HEIDOLPH MR HEI STANDART)
- ✓ Buzdolabı (ARÇELİK)
- ✓ Cam Erlen (250 ml) (ISOLAB)
- ✓ Cam Beher (250 ml) (ISOLAB)
- ✓ pH Metre (METTLER TOLEDO)
- ✓ Hassas Terazi (SHIMADZU)
- ✓ Otoklav (HİCLAVE HV-50 L)
- ✓ Kar Makinesi (SCOTSMAN)
- ✓ Otomatik Pipet (1 ml) (EPPENDORF)
- ✓ Otomatik Pipet (0.5-5 ml) (EPPENDORF)
- ✓ Saf Su Cihazı (DIRECT-Q)
- ✓ Su Banyosu (TERMAL)
- ✓ Vorteks (IKA MS-3)
- ✓ Cam Kavanoz (TEKNİK CAM SANAYİ)
- ✓ Alüminyum Folyo (ISOLAB)
- ✓ Parafilm (ISOLAB)

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

- ✓ MRS Broth (Oxoid)
- ✓ MRS Agar (Oxoid)
- ✓ Nutrient Agar(Oxoid)

- ✓ Nutrient Broth(Oxoid)
- ✓ Hidroklorik Asit (HCl) (ISOLAB)
- ✓ Sodyum Hidroksit (NaOH) (SIGMA-ALDRICH)
- ✓ Locust Bean Gum
- ✓ Sodyum Sitrat ($C_6H_5Na_3O_7$) (ISOLAB)
- ✓ 3,5-dinitrosalisilik asit (SIGMA-ALFRICH)
- ✓ Potasyum Sodyum Tartarat
- ✓ Sodyum Fitat
- ✓ Sodyum Asetat ($C_2H_3NaO_2$) (ISOLAB)
- ✓ Trichloroacetic acid ($C_2HCl_3O_2$)
- ✓ Sülfirik Asit (H_2SO_4) (ISOLAB)
- ✓ Amonyum Molibdat ((NH4)6Mo7O24.4H2O) (SIGMA-ALDRICH)
- ✓ Demir Sülfat (FeSO4) (SIGMA-ALDRICH)
- ✓ Amonyum Sülfat **(**$(NH_4)_2SO_4$) (ISOLAB)
- ✓ Çinko oksit (ZnONps) (SIGMA-ALDRICH)
- ✓ Trizma base (MERCK)
- ✓ Sodyum karbonat (Na_2CO_3) (ISOLAB)
- ✓ Fitaz

Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı

%70'lik Etil alkol: 70 mL saf etil alkolün (Sigma) üzerine hacmi 100 mL oluncaya kadar saf su eklenmiştir.

MRS Agar: Hassas terazide tartılan 68,2g MRS Agar hazır haldeki ılık 1 L dH_2O içerisine ilave edilerek çözünene kadar karıştırılmıştır. Sterilizasyon işlemi için 121°C'de 15 dk otoklavlanmıştır.

MRS Broth: Hassas terazide tartılan 51 g MRS Broth hazır haldeki ılık 1 L dH_2O içerisine ilave edilerek çözünene kadar karıştırılmıştır. Sterilizasyon işlemi için 121°C'de 15 dk otoklavlanmıştır.

Nutrient Agar: Hassas terazide tartılan 28 g Nutrient Agar hazır haldeki ılık 1 L dH_2O içerisine ilave edilerek çözünene kadar karıştırılmıştır. Sterilizasyon işlemi için 121°C'de 15 dk otoklavlanmıştır.

Nutrient Broth: Hassas terazide tartılan 13 g Nutrient Broth hazır haldeki ılık 1 L dH_2O içerisine ilave edilerek çözünene kadar karıştırılmıştır. Sterilizasyon işlemi için 121^oC'de 15 dk otoklavlanmıştır.

0,1 M Sodyum asetat tamponu (pH 2,0-3,0): 0,82 g sodyum asetat tartılmış 60 mL dH_2O ile çözdürülmüş ve pH ayarlaması yapıldıktan sonra dH_2O ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. pH değerlerini ayarlayabilmek için 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCI kullanılmıştır.

0,02 M Sodyum sitrat tamponu (pH 4,0-5,0-6,0): 4,2 g Sodyum sitrat tartılıp, 60 mL dH2O ile çözdürülmüş ve pH ayarlaması yapıldıktan sonra dH_2O ile 150 mL'ye tamamlanmıştır. Uygun pH değerini elde etmek için konsantre NaOH ve/veya HCl kullanılmıştır.

10 mM Tris-HCl tamponu (pH 7,0-8,0-9,0): 0,182 g Trizma base tartılmış 60 Ml dH_2O ile çözdürülmüş ve pH ayarlaması yapıldıktan sonra dH_2O ile 150 mL'ye tamamlanmıştır. Uygun pH değerini elde etmek için konsantre NaOH ve/veya HCl kullanılmıştır.

Karbonat tamponu (pH 10,0-11,0): 0,105 g sodyum karbonat tartılmış ve 100 mL distile su ile üzeri tamamlanmıştır. Uygun pH değerlerini ayarlamak üzere 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl kullanılmıştır.

DNSA Çözeltisi:

a. 0,64 g Sodyum Hidroksit tartılıp 8 mL saf su içerisinde çözündürüldü. Üzerine 12 g potasyum sodyum tartarat eklenip çözündürüldü.
b. 0,438 g DNSA tartılıp 20 mL saf su içerisinde çözündürüldü.

a karışımı b karışımının üzerine eklenerek 40 mL ye tamamlanmıştır.

Sodyum Sitrat Tamponu: 1,6 g Sodyum Sitrat tartılıp, 400 mL saf suda çözüldü, pH'sı 6,0'ya ile ayarlandı ve son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

Sodyum Asetat Tamponu: 4,10 g Sodyum Asetat tartılarak 400 mL saf suda çözüldü, ph'sı 5,5'e 0,1 M asetik asit ile ayarlandı ve son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

TCA (Trikloroasetik asit): (%10'luk) 10 g Trikloroasetik asit tartılıp 100 mL saf suda çözüldü.

Mannnanaz Substratı: 0,05 g Locust Bean Gum tartılıp üzerine son hacmi 100 mL olacak şekilde Sodyum Sitrat tamponu ilave edilerek çözüldü.

Fitaz Substratı: 0,05 g Sodyum Fitat tartılıp üzerine son hacim 100 mL olacak şekilde Sodyum Asetat tamponu ilave edilerek çözüldü.

Renklendirme Çözeltisi:

A. 93,7 mL saf su üzerine 5,73 mL sülfürik asit (% 96' lık) eklendi.
B. 2,5 g amonyum molibdat A çözeltisi içerisinde çözündürüldü. Son hacim a çözeltisiyle 100 mL' ye tamamlanmıştır.
C. 2,5 g demir sülfat uygun oranda saf su içerisinde çözündürüldü. Son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı ve içerisine 1-2 damla sülfürik asit eklendi.

4 hacim b çözeltisinden, 1 hacim c çözeltisinden karıştırılarak 500 mL renklendirme çözeltisi hazırlandı.

Metod

Bakteri strainleri

Çalışmada kullanılan 15 bakteri straini (*Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus pentosus, Lactobacillus coryniformis, Lactobacillus brevis, Lactobacillus paracasei, Lactobacillus kefiri, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus mixtipabuli, Lactococcus garvieae, Lactococcus lactis, Enterococcus feacalis, Bacillus pumilus, Bacillus thuringensis, Bacillus invictae*), Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Neslihan Dikbaş'a ait olan kültür koleksiyonundan alınmıştır. Kullanılan bakteri strainleri uygun koşullarda Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümün'de muhafaza edilmektedir.

Bakterilerin geliştirilmesi

Bakteri strainleri, MRS Agar (*Lactobacillus*'lar için) ve Nutrient Agar (*Bacillus*'lar için)'da 28-35°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve oluşan kolonilerden bir öze dolusu alınarak MRS/Nutrient Broth'a aktarılmış ve daha sonraki işlemlere inkübasyona bırakılan bakterilerden devam edilmiştir.

Şekil 14. Ekim yapılan bakteri görüntüleri

Bakterilerin enzim (Mannanaz, fitaz) aktivitelerinin belirlenmesi

Uygun koşullar altında sıvı besiyerinde geliştirilen bakterilerden 1 mL alınarak tüplere konulmuştur. 9000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilerek çökelti kısmı atılmış ve süpernatant kısım enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Mannanaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Aktivite ölçmek için DNSA metodu modifiye edilerek kullanılmıştır (Bahri et al. 2019). Mannanaz aktivite tayini için gerekli olan substratın hazırlanması amacıyla; 0,05 g locust bean gum tartılmış ve son hacmi 100 mL olacak şekilde sodyum sitrat tamponu içerisinde çözülmüştür. Enzim çözeltisinden 50 µL alınıp 800 µL locust bean gum bulunan substrat ortamına ilave edilmiş ve 10 dakika 50ºC'ye ayarlı su banyosunda bekletilmiştir. Ardından 750 µL DNSA eklenip 5 dakika süre ile 90ºC' deki su banyosunda bekletildikten sonra absorbans değişimi 540 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Enzim ölçümleri yapıldıktan sonra yüksek enzim aktivitesi gösteren bakterilerden enzimler bir sonraki aşamada kısmi olarak saflaştırılmıştır. Deneyde kör olarak saf su kullanılmıştır.

Fitaz enziminin aktivitesinin belirlenmesi

Fitaz aktivite tayini için gerekli olan substratın hazılanması amacıyla; 0,05 g sodyum fitat tartılmış, 80 mL sodyum asetat tamponu içerisinde çözüldükten sonra son hacmi 100 mL tamamlanmıştır. Aktivite tayini hesaplanırken 100 µL enzim çözeltisi üzerine 250 µL substrat eklendikten sonra vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra 10 dakika 50°C'ye ayarlanmış su banyosunda reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyonu durdurmak için 500 µL %10'luk TCA eklenmiş ve 15 dk oda sıcaklığında bekletme işlemi yapıldıktan sonra tüplere 500 µL

renklendirme çözeltisi ilave edilmiştir. 15 dakika inkübasyondan sonra 3200 rpm 'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra örnekler köre karşı 700 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Enzim ölçümleri yapıldıktan sonra yüksek enzim aktivitesi gösteren bakterilerden enzimler bir sonraki aşamada kısmi olarak saflaştırılmıştır. Deneyde kör olarak saf su kullanılmıştır (Demir vd 2018).

Mannanaz ve fitaz enzimlerinin kısmi saflaştırılması

En yüksek aktivite gösteren iki bakteri MRS Broth ve Nutrient Broth besiyerlerinde inokülasyonu sağlandıktan sonra optimizasyon sonucu belirlenmiş olan süre ve sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Ardından +4°C'de 48 saat bekletilmiş ve 9000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj işlemine tabii tutulmuştur. Santrifüjleme sonrasında süpernatant ve çökelti kısımları birbirinden ayrılarak süpernatant kısmı ile işleme devam edilmiştir (Demir vd 2017). Enzimin çöktüğü amonyum sülfat doygunluk aralığını (0-20, 20-40, 40-60, 60-80) belirlemek için gerekli olan amonyum sülfat miktarı aşağıda verilen formül ile hesaplanarak bulunmuştur.

$G\ (NH_4)2SO_4 = 1.77 \times V \times (S2 - S1) / (3.54 - S2)$

G $(NH_4)2SO_4$: Eklenmesi gereken katı amonyum sülfat tuzunun gram miktarı
V: Enzim çözeltisinin (süpernatant) hacmi
S1: Başlangıçtaki amonyum sülfat doygunluğu (1'in kesri olarak)
S2: İstenen amonyum sülfat doygunluğu (1'in kesri olarak)

%0-20 aralığı için, gerekli olan amonyum sülfat tartılmış ve +4°C'de manyetik karıştırıcı üzerinde yavaş yavaş enzim çözeltisine ilave edilerek karışması sağlanmıştır. Ardından karışım 9000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Çökelekler sırasıyla mannanaz ve fitaz enzimleri için pH'sı 6,0 olan 0,1 M sodyum sitrat ve 0,1 M sodyum asetat tamponlarında çözülerek aktivite analizlerinde kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır (Bu işlem; 20-40, 40-60, 60-80 aralıkları için tek tek yapılmıştır).

Enzimlerin ZnO nanapartiküllerine immobilizasyonu

Çinko oksit nanopartiküllerine (Sigma) ayrı ayrı fitaz ve mannanaz enzimlerinin adsorpsiyon yoluyla immobilizasyonu kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Bunun için 100 mg/L olacak şekilde hazırlanan ZnO nanopartiküllerinden 3 mL, her bir enzimden 1 mL alınarak farklı kaplarda 2 saat boyunca 100 rpm hızda manyetik karıştırıcıda karıştırılarak enzimin nanopartiküle immobilizasyonu sağlanmıştır (Chen and Chang 1994; Hooda 2014).

İmmobilize ve serbest enzimlerin optimum sicaklik değerlerinin belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzimlerin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini belirlemek için 10-90 °C aralığında sıcaklık 10 °C arttırılarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sıcaklıkları su banyosunda ayarlanmıştır. Absorbanslar (mannanaz 540 nm de ve fitaz 700 nm de) ölçülerek enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri sıcaklık değerleri belirlenmiştir (Sarıbuğa et al. 2014)

İmmobilize ve serbest enzimlerin optimum pH değerlerinin belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzimlerin optimum aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek için farklı pH değerlerine (pH 2.0-11.0) sahip tamponlar (Sodyum asetat (pH 2.0-3.0), Sodyum sitrat (pH 4.0-5.0-6.0), Tris-HCl (pH 7.0-8.0-9.0), Sodyum karbonat (pH 10.0-11.0)) kullanılarak her bir enzim için substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Spektrofotometrede (mannanaz 540 nm'de ve fitaz 700 nm'de) absorbans değerleri ölçülmüş ve enzimlerin optimum pH aralıkları belirlenmiştir (Sarıbuğa et al. 2014).

İmmobilize enzimlerin karakterizasyonu

İmmobilize fitaz ve mannanaz enzimlerinin karakterizasyonu için FTIR, XRD ve SEM kullanılmıştır. Analizler Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Merkezi'nde (DAYTAM) yapılmıştır.

FTIR (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi) analizi

Saf maddeleri, karışımları, safsızlıkları ve çeşitli materyallerin bileşimlerini tanımlamak için FTIR analizi kullanılmaktadır (Kowalczuk and Pitucha, 2019). Bu analizin temeli, molekül içi bağlar üzerine düşürülen kızılötesi ışınların, bağların dönme ve titreşim hareketleri ile soğurulmasına dayanır. ZnO Nanopartikülü ve ZnO Nanopartikülüne bağlı fitaz ve mannanaz enzimlerinin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (Varian FTS 7000, ADB) kullanılarak elde edilmiştir. Örnekler (0,1 g), KBr (0,1g) ile homojen olarak karıştırılarak pelet haline getirilmiş ve FTIR spektrumu çekilmiştir.

XRD analizi

X-ışını kırınım analizi (XRD), polimerlerin kristalliğinin belirlenmesi, kristal fazların tanınması (polimorfizm) için kullanılan mikroyapısal analiz yöntemlerinden biridir (Inan, 2017). ZnO Nanopartikülü ve ZnO Nanopartikülüne immobilize fitaz ve mannanaz enzimlerinin XRD paterni dalga boyu 1,5405 Å olan CuKα ışın kaynaklı Rigaku D-max 2200

X-ışını difraktometresi kullanılarak 4 derece/dakika tarama hızı ve 0,01 derece tarama adımı ile 2θ =10-80° açısı aralığında alınmıştır.

SEM analizi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) genellikle polimerik malzemelerin yüzey morfolojisini araştırmak için kullanılmaktadır (Sinha Ray 2013). SEM, partikül boyutunu, şeklini ve dokusunu belirlemek için yalnızca miligram miktarlarda malzemenin kullanılabileceği bir tekniktir. SEM'de, ince bir elektron demeti, bir dizi paralel izde hazırlanan numuneyi tarar. Elektronlar numune ile etkileşime girer ve bir katot ışın tüpünün ekranında algılanabilen ve görüntülenebilen farklı sinyaller üretir (Amidon 2017). Kullanılan ZnO Nanopartikülünün ve ZnO Nanopartikülüne immobilize fitaz ve mannanaz enzimlerinin yüzey morfolojisini ve yapısını değerlendirmek amacıyla Phillips XL-305 FEG cihazı ile SEM görüntüleri elde edilmiştir (Kasthuri et al. 2007; Micheva and Smith 2007).

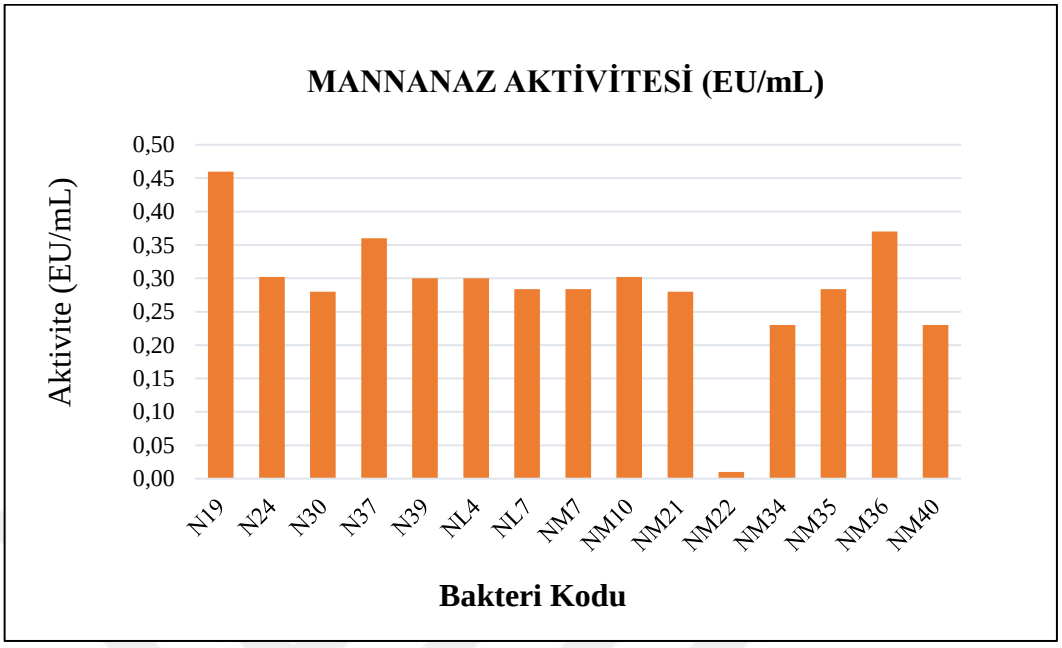
ARAŞTIRMA BULGULARI

Bakterilerin Enzim (Mannanaz, Fitaz) Aktivitelerinin Belirlenmesi

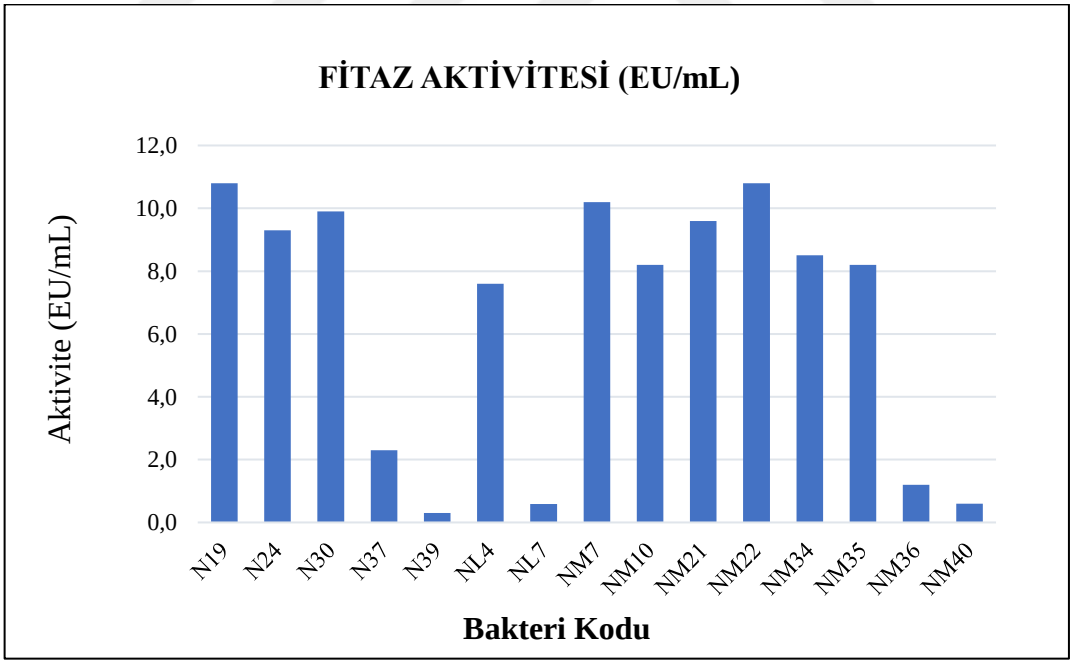
Fitaz ve mannanaz enzim aktiviteleri belirlenen bakteriler arasında en yüksek mannanaz aktivitesini *Bacillus invictae* (0,461 EU/mL) gösterirken, en yüksek fitaz aktivitesini *Lactobacillus kefiri* (10.217 EU/mL) göstermiş ve elde edilen aktivite sonuçları Tablo 2 ve Şekil 15, 16' de verilmiştir.

Tablo 2. Test Edilen 15 Farklı Bakterinin Mannanaz ve Fitaz Aktivite Sonuçları

BAKTERİ KODU	MANNANAZ AKTİVİTESİ (EU/mL)	FİTAZ AKTİVİTESİ (EU/mL)
N19	0,461	10,801
N24	0,302	9,341
N30	0,284	9.925
N37	0,355	2,335
N39	0,302	0,291
NL4	0,302	7,590
NL7	0,284	0,583
NM7	0,284	10.217
NM10	0,302	8,174
NM21	0,284	9,633
NM22	0,012	10,801
NM34	0,230	8,465
NM35	0,284	8,174
NM36	0,373	1,167
NM40	0,230	0,583



Şekil 15. Test edilen 15 farklı bakterinin mannanaz aktivite sonuçları



Şekil 16. Test edilen 15 farklı bakterinin fitaz aktivite sonuçları

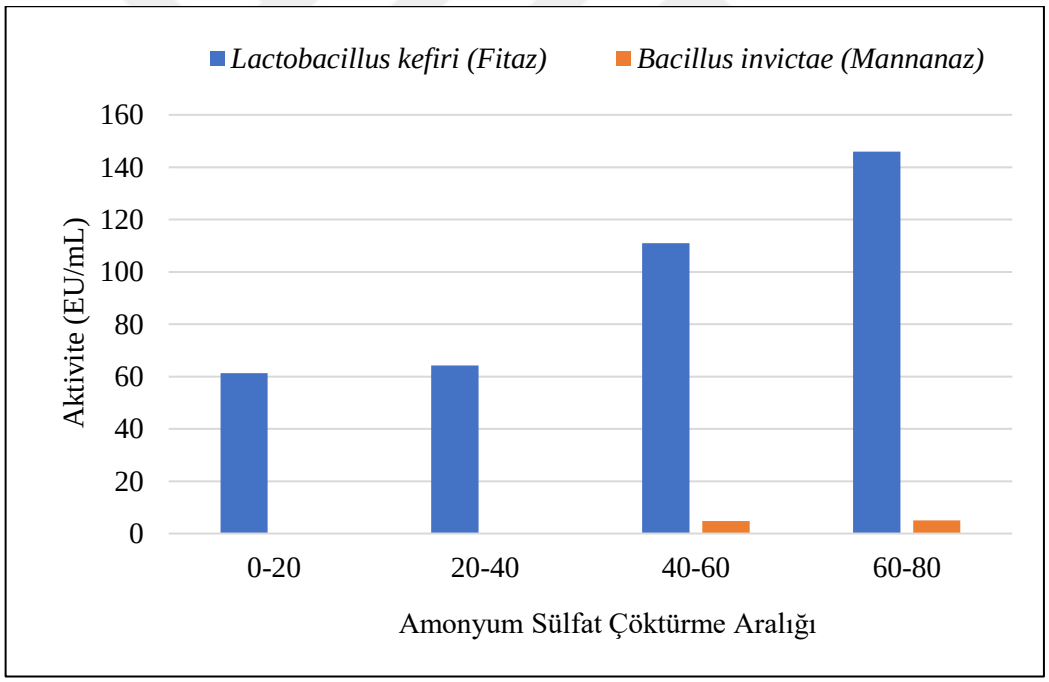
Mannanaz ve Fitaz Enzimlerinin Kısmi Saflaştırılması

Çalışmanın bu aşamasında en yüksek aktivite gösteren *Bacillus invictae* ve *Lactobacilus kefiri'*den fitaz ve mannanaz enzimleri amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi saflaştırılarak enzim aktivitesinin en yüksek olduğu aralık amonyum sülfat doygunluk aralığı olarak kabul

edilmiştir. Kısmi saflaştırma sonucu enzimlerin en iyi aktivite gösterdikleri amonyum sülfat doygunluk aralığı 60-80 olarak belirlenmiş ve elde edilen aktivite sonuçları Şekil 17' de verilmiştir. Belirlenen doygunluk aralıkları hem aktivite ölçümünde hemde enzimlerin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Tablo 3. Amonyum Sülfat Doygunluk Aralıkları

Amonyum Sülfat Doygunluk Aralığı	*Lactobacillus kefiri* (FİTAZ)	*Bacillus invictae* (MANNANAZ)
0-20	61,305	0
20-40	64,224	0
40-60	110,93	4,79
60-80	145,96	4,97



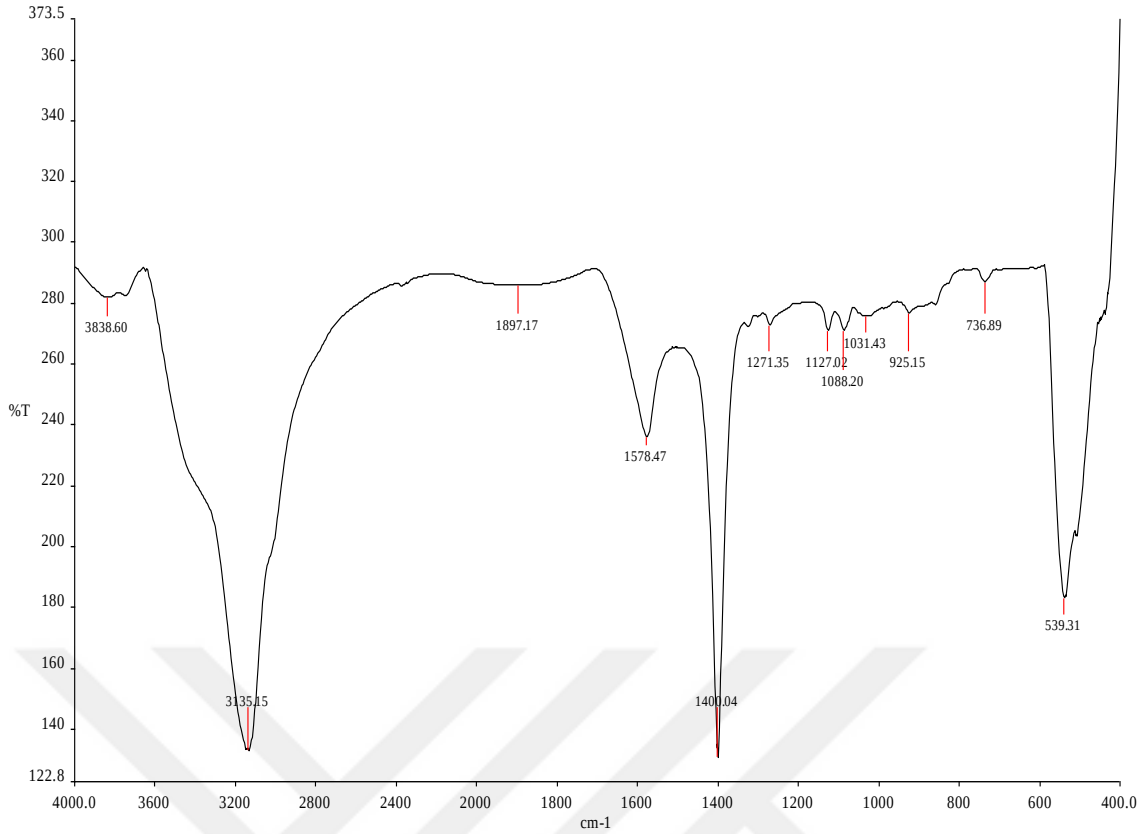
Şekil 17. Mannanaz ve Fitaz Enzimlerinin amonyum sülfat çöktürme aralıklarındaki enzim aktiviteleri

FTIR Analizi

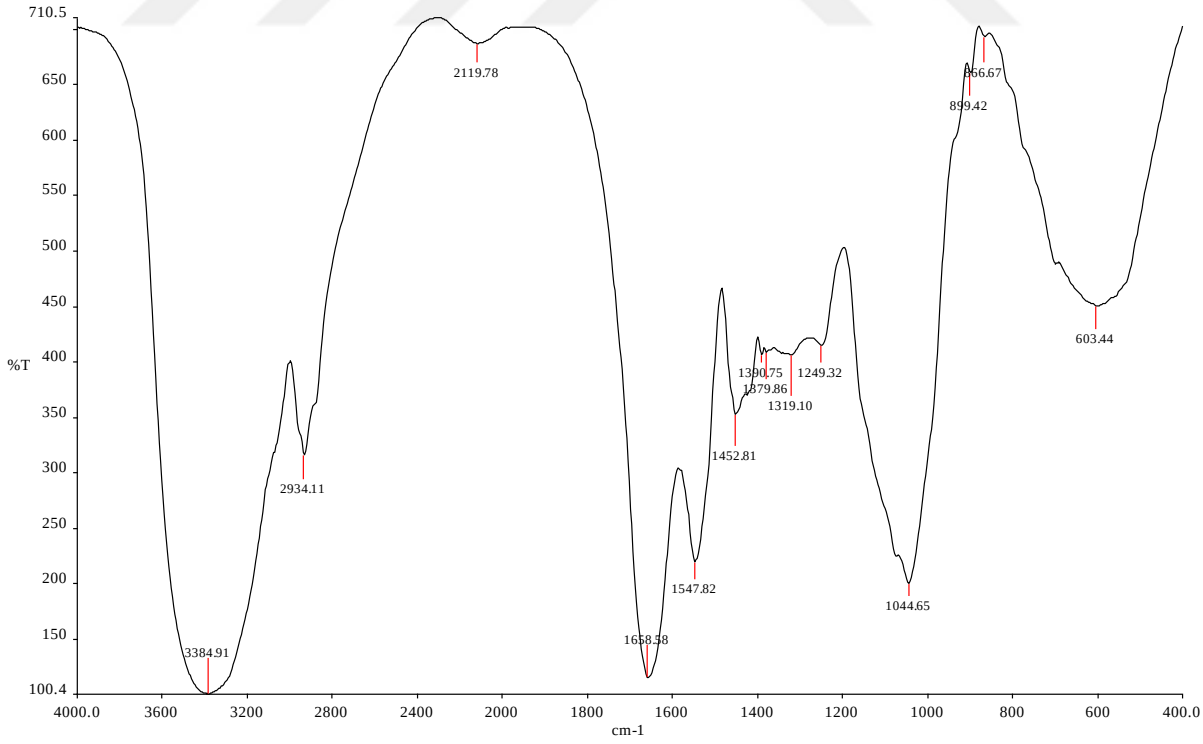
Fitaz ve mannanaz enzimi ile ayrı ayrı immobilize edilen ZnO nanoparçacıklarının kimyasal bileşimi FTIR spektroskopisi ile Şekil 20,22' te verilen spektrumdan yararlanılarak aydınlatılmıştır. Karşılaştırma yapmak amacıyla sadece ZnO nanopartikülleri ve yine sadece fitaz ve mannanaz enzimlerine ait FTIR spektrumları da sırasıyla Şekil 18, Şekil 19 ve Şekil 21'de verilmiştir. Fitaz ve mannanaz enzimleri ile ZnO nanopartiküllerinin başarılı bir şekilde

immobilize edilmesi FTIR spektrumundan faydalanılarak gösterilmiştir. Şekil 19'da fitaz enziminin FTIR spektrumunda 3384 cm^{-1}'de OH gerilme bantları ile 2934 cm^{-1}'de CH gerilme bantları görülmektedir. Fitaz enziminin reaksiyonundaki su molekülünün OH grubu gerilmesinden kaynaklanan bantlar 1658 cm^{-1}'e karşılık gelmektedir. Ayrıca 1044 ve 603 cm^{-1}'deki bantların fosfat gruplarına ait olduğu düşünülmektedir. Fitaz enzimi ile immobilize edilen ZnO nanoparçacıklarının kimyasal bileşimini gösteren Şekil 20'de 3299 cm^{-1}'de görülen pikler OH gruplarına, 2933 cm^{-1}'deki pikler fitaz enziminin yapısındaki alifatik CH gruplarına aittir. 1659 cm^{-1}'de görülen pik su molekülündeki OH bantlarına ait gerilmelerden kaynaklanmıştır. 1044 cm^{-1}'de görülen pikin fosfat grubuna ait olduğu, 535 cm^{-1}'de görülen pikin ise ZnO immobilizetesinden kaynaklandığı düşünülmketedir. Fitaz enzimi ile immobilize edilen ZnO nanpartikülleri için elde edilen FTIR spektrumları sadece ZnO ve fitaz enzimine ait spektrumlarla karşılaştırıldığı zaman, ZnO ve enzim arasındaki adsorpsiyondan dolayı pik değerlerinin daha düşük dalga boylu bölgeye kayması ve piklerin şiddetlerinin azalması dışında herbir bileşenin kendi karakteristik yapısını koruduğu açık bir şekilde görülmektedir.

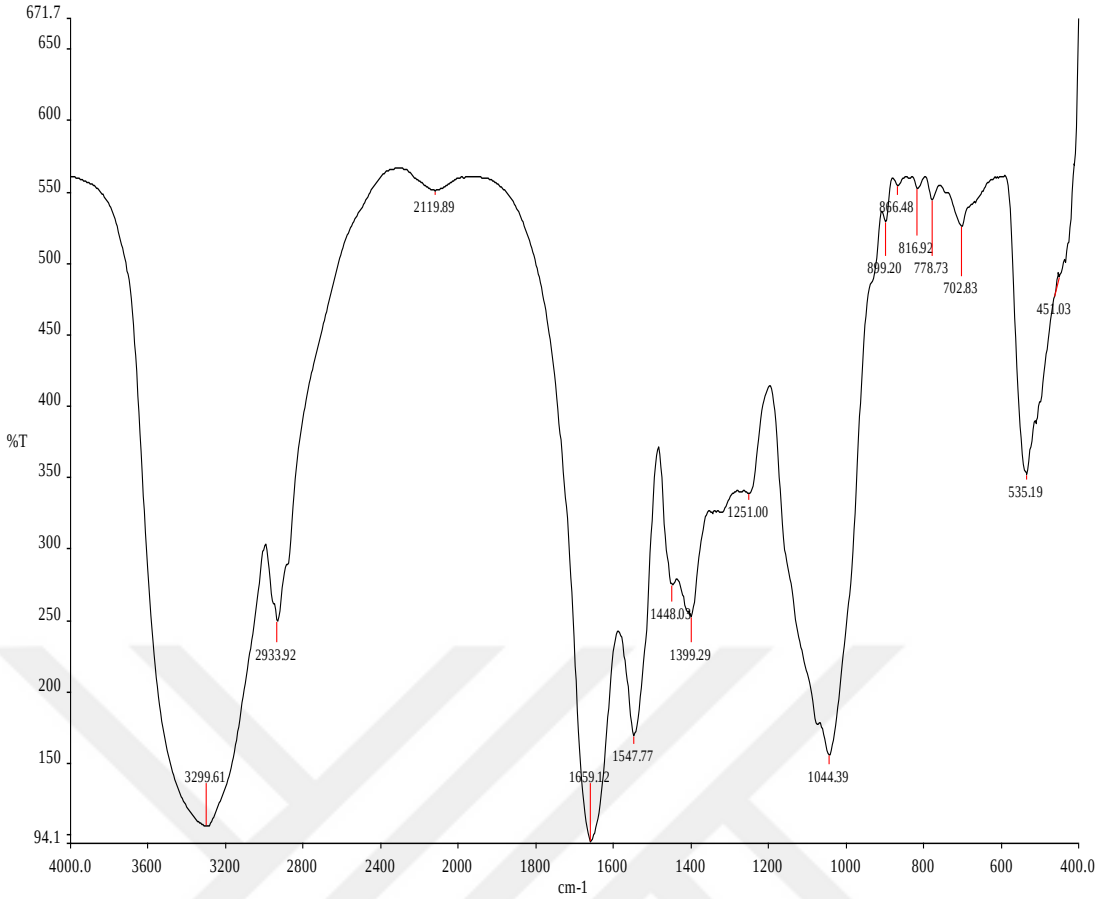
Şekil 22'te ise mannanaz enzimi ile immobilize edilen ZnO'e ait absorbans FTIR spektrumları verilmiştir. İlgili spektrumlar incelendiğinde yine dalga sayısı yaklaşık 500 cm^{-1}'in üstündeki bölgede yer alan bant Zn-O bağ titreşiminin sonucunda oluşmuştur. Spektrumlardaki 2826 ve 3013 cm-1'deki bantlar mannanaz enzim yapısında bulunan CH_2 gruplarının C-H gerilme titreşimlerine atfedilmiştir. 1399 cm^{-1}'deki pik C-C, 1057 cm^{-1}'deki pik ise literatür ışığında C-O-C bağlarının titreşim enerjisine karşılık gelmektedir. Saf mannanaz enzimi ile immobilize edilen ZnO nanpartikülleri için elde edilen FTIR spektrumu yine sadece ZnO ve saf mannanaz enzimine ait spektrumlarla kıyaslandığında, piklerin kısmen daha düşük dalga boylu bölgelere kayması ve şiddetlerinin azalması dışında herbir bileşenin kendi karakteristik yapısını koruduğu anlaşılmaktadır. Bu durum yine ZnO ve mannanaz enzimi arasında oluşan adsorpsiyondan kaynaklanmaktadır.



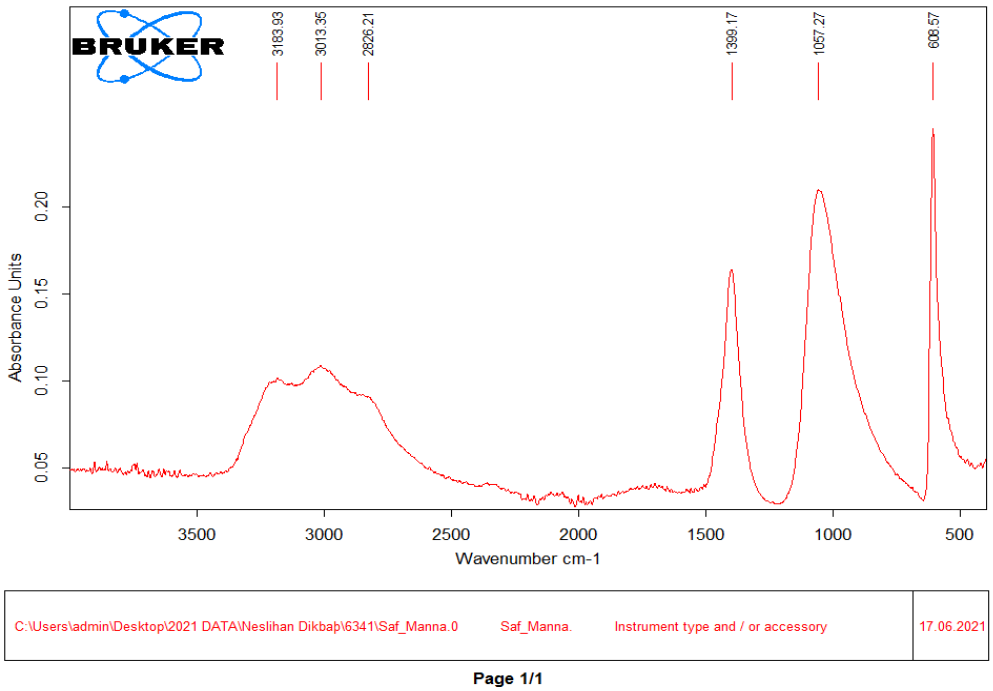
Şekil 18. ZnO nanopartikülünün FTIR görüntüsü



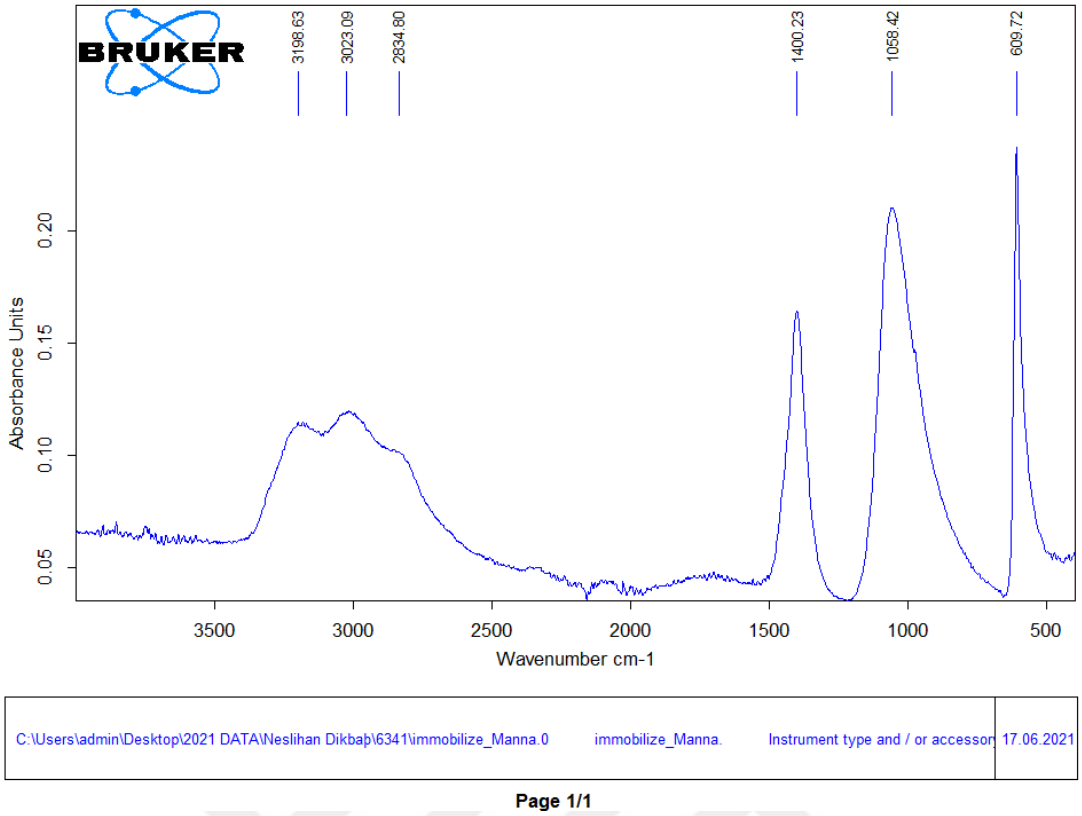
Şekil 19. Fitaz enziminin FTIR görüntüsü



Şekil 20. Fitaz immobilize ZnO nanopartikülünün FTIR görüntüsü



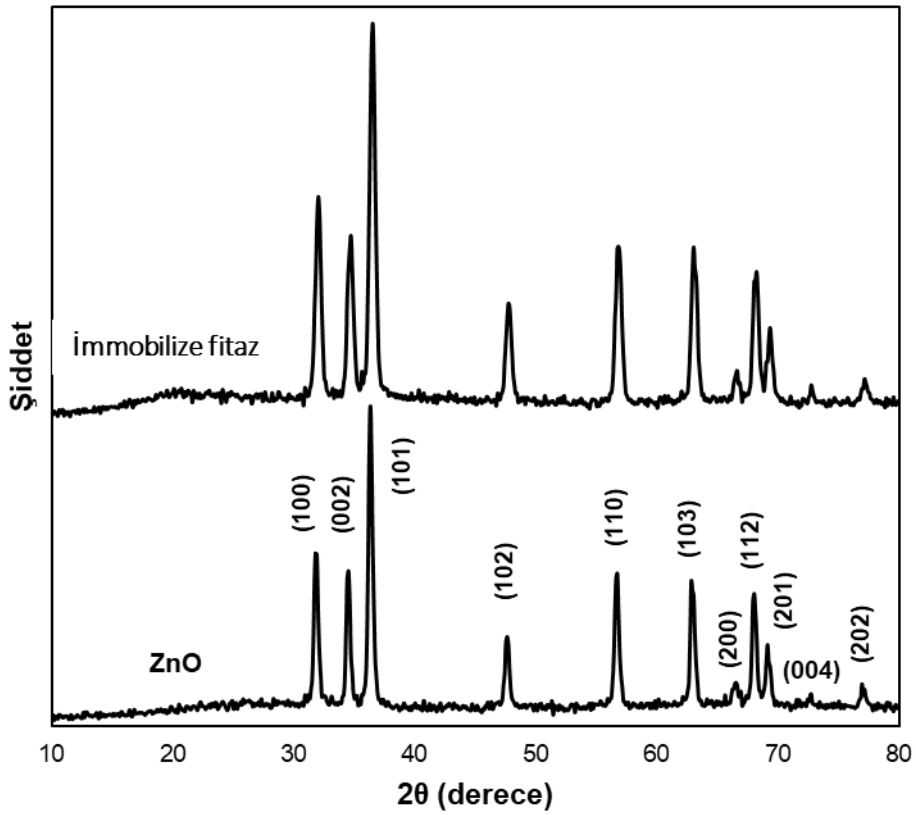
Şekil 21. Mannanaz enziminin FTIR görüntüsü



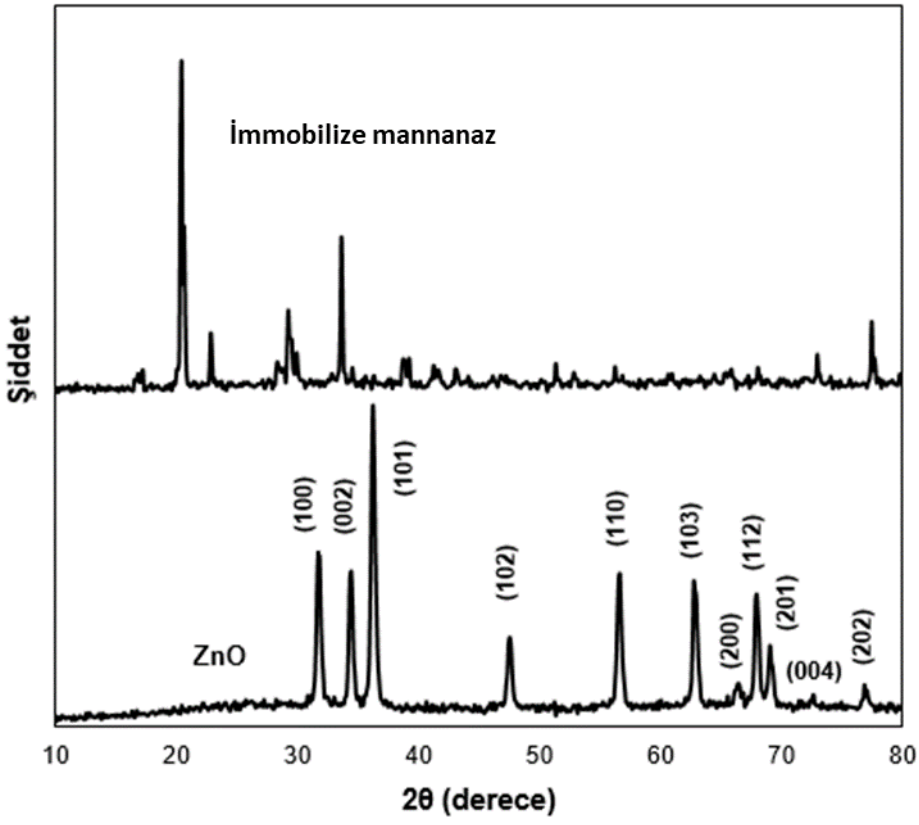
Şekil 22. Mannanaz immobilize ZnO nanopartikülünün FTIR görüntüsü

XRD Analizi

Fitaz ve mannanaz immobilize ZnO parçacıklarının kristal yapısını incelemek için X-ışınları kırınım (XRD) ölçümleri alınmış ve Şekil 23,24'te gösterildiği gibi yüksek saflıktaki ZnO parçacıkları ile karşılaştırılmıştır. Her iki spektrumunda yüksek kırınım şiddetine sahip olması hem ZnO nanoparçacıklarının ve hemde fitaz ve mannanaz enzimleri ile immobilize edilen ZnO'in yüksek oranda kristalize olduğunun bir göstergesidir. Her iki spektrum üzerinde de bulunan kırınım piklerinin tamamı hekzagonal wurtzite çinko oksit nano yapısına aittir. Şekil 23 ve 24'deki bu XRD difraktogramlarında 2θ ölçeğinde 31,9º, 34,5º, 36,4º, 47,5º, 56,7º, 62,8º, 66,5º, 67,9º, 69,2º ve 77,1º''lerde yüksek şiddetlerde gözlenen difraksiyon pikleri sırasıyla çinko oksitin (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201), (004) ve (202) düzlemlerdeki yansımalarına karşılık gelmektedir. Aynı zamanda, fitaz ve mannanaz enzimleri ile immobilize edilen ZnO'e ait kırınım piklerinin çok sayıda ve şiddetli olması da sentezlenen ürünlerin yüksek kristal özellikte olduğunun ve herhangi bir safsızlık pikine rastlanmaması da ZnO'in kristal yapısının bozulmadığını ifade etmektedir.



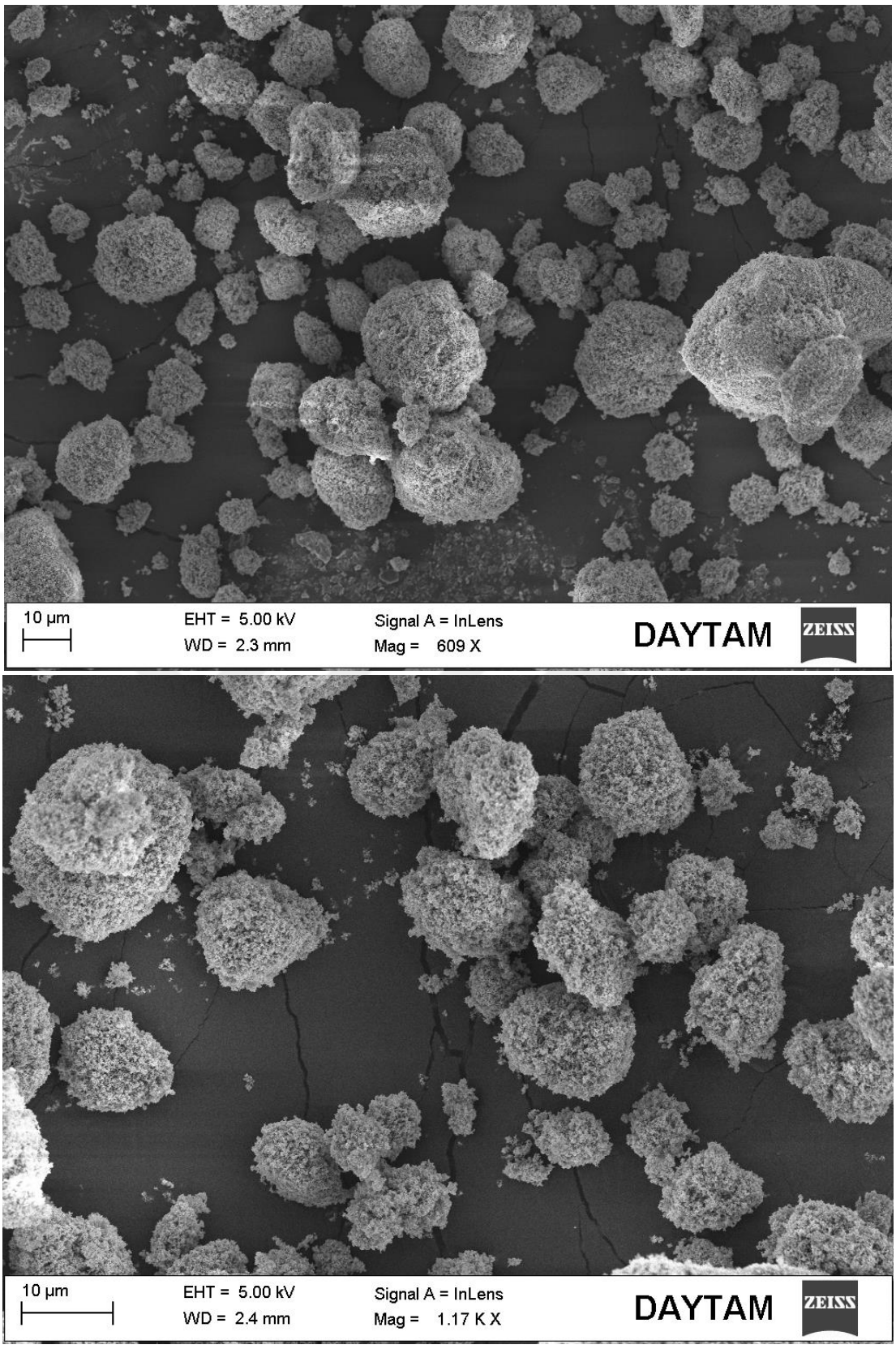
Şekil 23. Saf ZnO parçaıklarının ve immobilize fitaz enziminin XRD spektrumları.



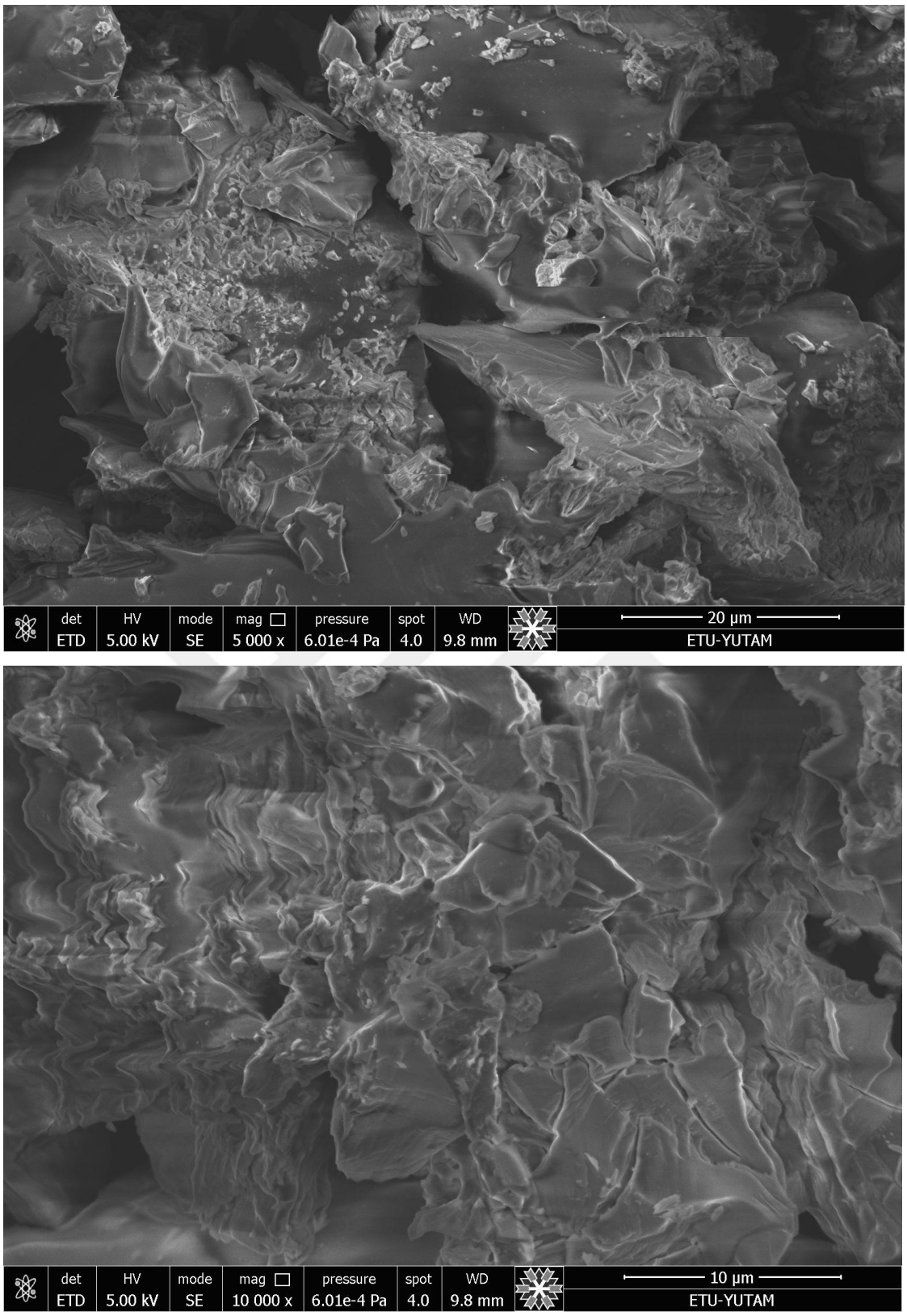
Şekil 24. Saf ZnO parçaıklarının ve immobilize mannanaz enziminin XRD spektrumları.

SEM Analizi

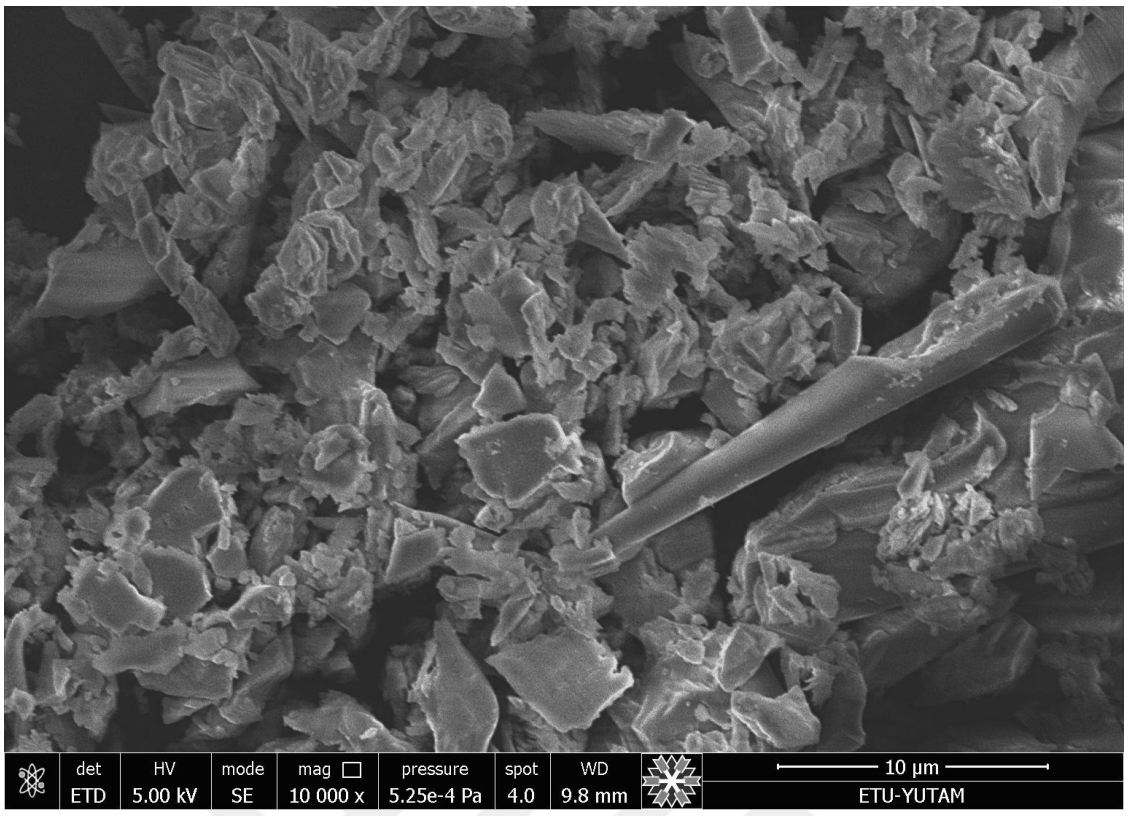
Saf ZnO (Şekil 25) ve fitaz ve mannanaz immobilize ZnO (Şekil 26,27) nanopartiküllerinin morfolojik yapısı farklı büyütmelerde SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir. Biyokompozitlerin her iki bileşeninde kendilerine has morfolojik özelliklerini koruduğu bir yapı göze çarpmaktadır. Özellikle enzim ile immobilizasyondan sonrada küresel ZnO parçacıklarının yapısının korunduğu ve bu parçacığa adsorplanan enzimi içeren bir kombinasyonun oluştuğu belirgin bir şekilde fark edilmektedir. Yüksek büyütmeli olarak (43000x), hazırlanan biyokompozitlere daha yakından bakıldığında ise ilginç bir şekilde her bir mikro ZnO küresinin genişlikleri 10 ile 80 nm aralığında değişen nanoparçacıklardan oluştuğu gözlenmektedir. Aynı zamanda yüksek çözünürlüklü SEM görüntüleri, bu nanoparçacıkların, gözenekli bir yapıdaki enzimin düz yüzeyini de kapladığını çok net bir şekilde göstermektedir. Enzim ve çinko oksit nanopartikülünün immobilizasyonunun aşağıda verilen görüntülerle yüksek adsorpsiyon sağladığı doğrulanmıştır.

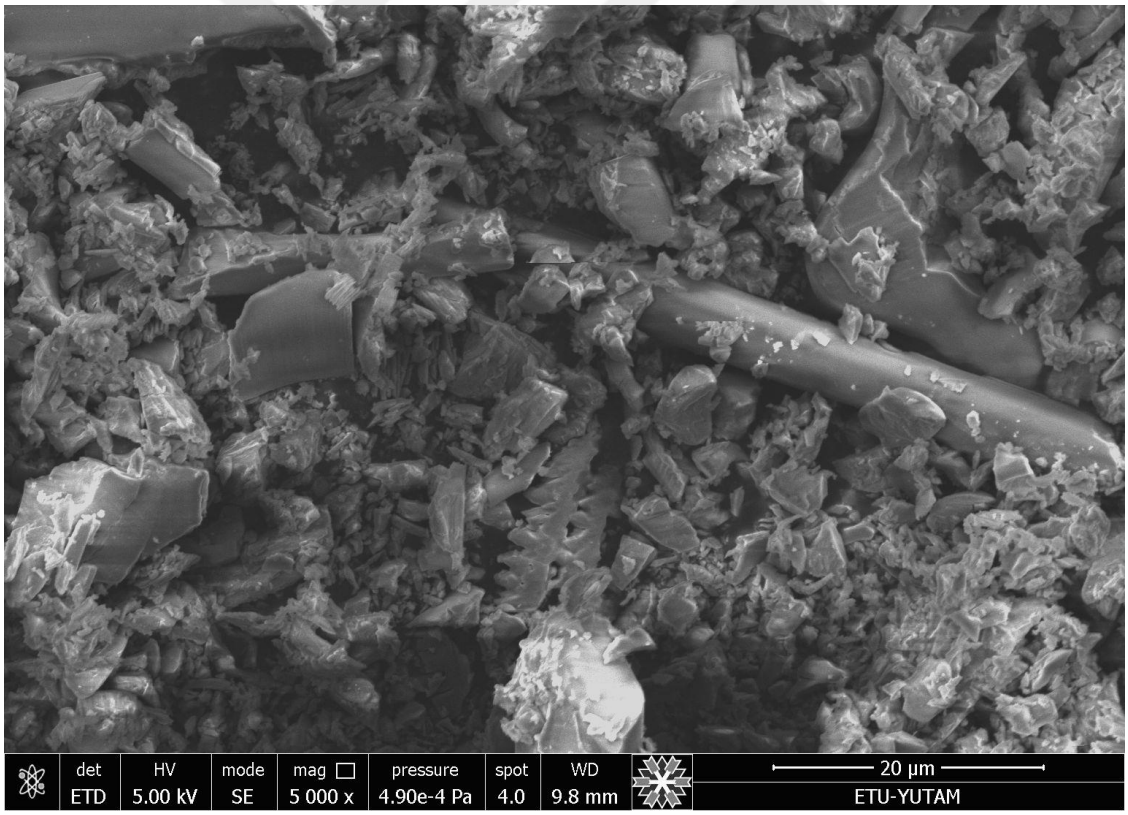


Şekil 25. ZnO nanopartikülünün SEM görüntüsü



Şekil 26. Fitaz immobilize ZnO nanopartikülünün SEM görüntüsü

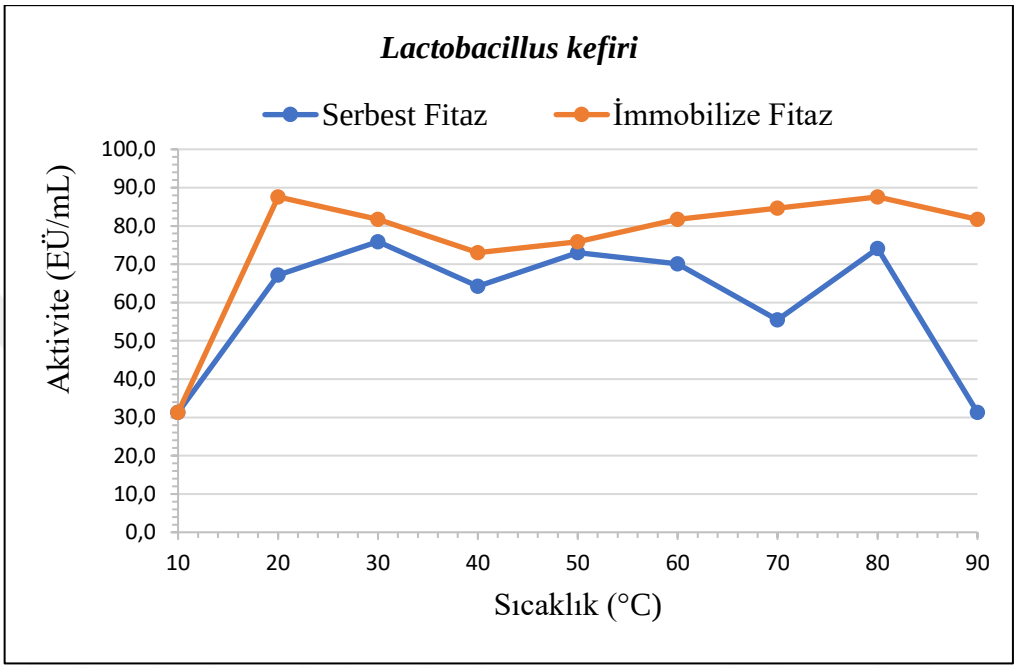




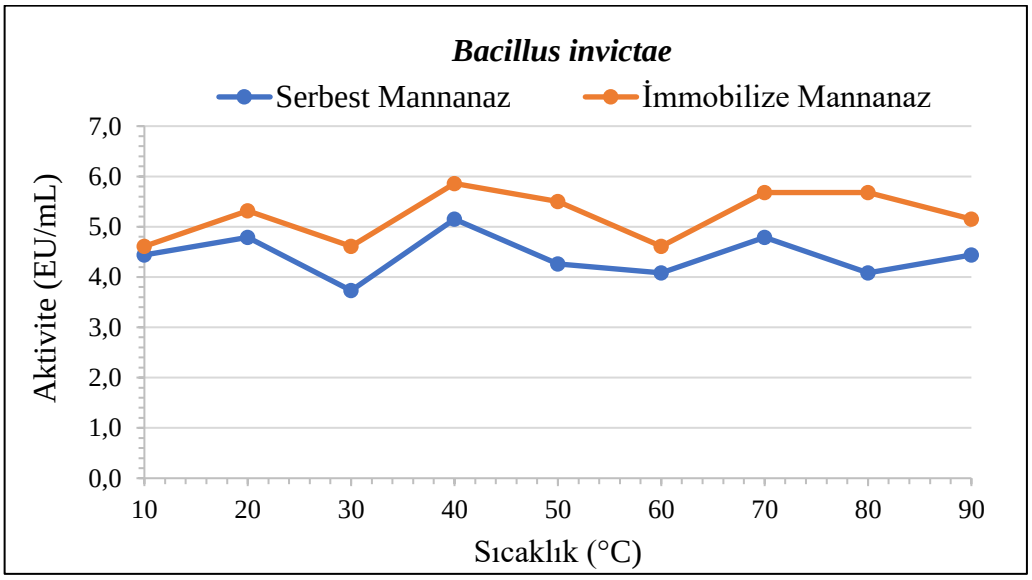
Şekil 27. Mannanaz immobilize ZnO nanopartikülünün SEM görüntüsü

İmmobilize ve Serbest Enzimlerin Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

İmmobilize ve serbest mannanaz ve fitaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesi için farklı sıcaklıklarda (10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 ºC) enzim aktiviteleri ölçülmüştür. İmmobilize ve serbest enzimlerin her ikisinde de optimum sıcaklık değerlerinin aynı olduğu belirlenmiştir. En yüksek aktivitenin gözlendiği sıcaklık değerleri fitaz için 70-80 ºC, mannanaz için ise 40-50 ºC olarak belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 28 ve 29 'da verilmiştir.



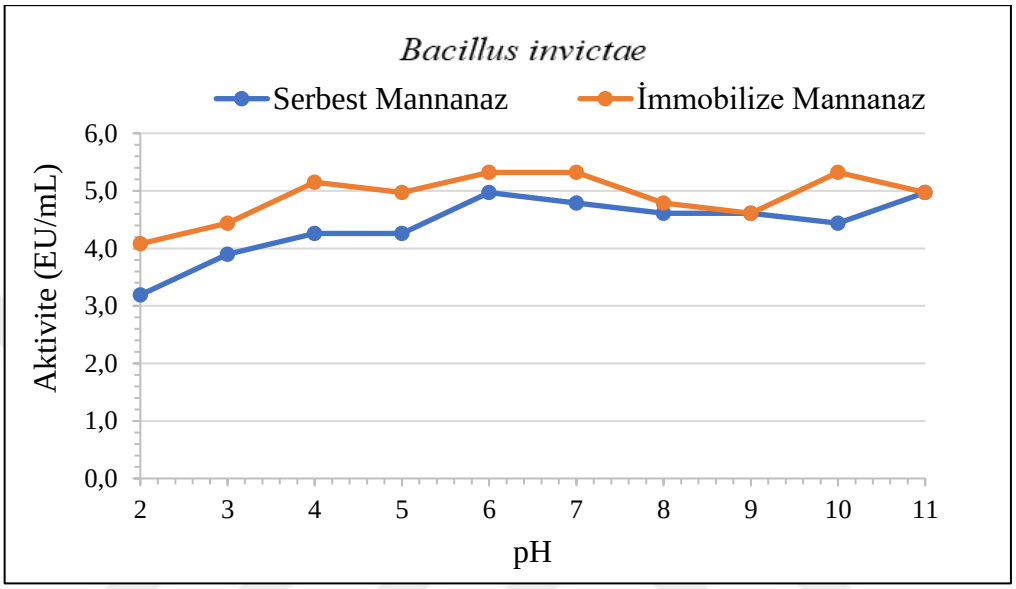
Şekil 28. İmmobilize ve serbest fitaz enzimine sıcaklığın etkisi



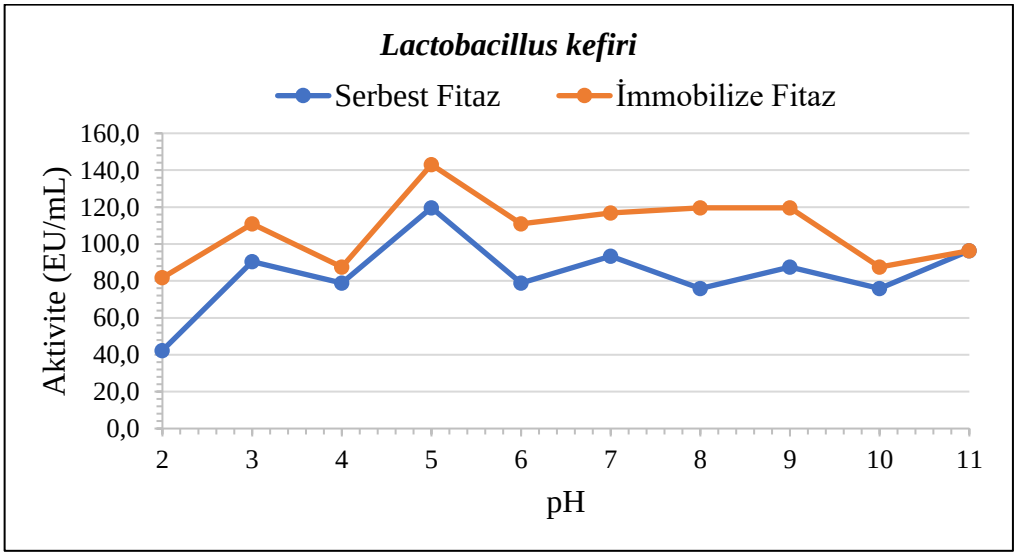
Şekil 29. İmmobilize ve serbest mannanaz enzimine sıcaklığın etkisi

İmmobilize ve Serbest Enzimlerin Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi

Farklı pH değerlerinde enzim aktivitesi ölçülerek immobilize ve serbest mannanaz ve fitaz enzimlerinin optimum aktivite gösterdiği pH değerleri belirlenmiştir. İmmobilize ve serbest enzimlerin her ikisinde de optimum pH değerlerinin aynı olduğu belirlenmiştir. En yüksek aktivitenin gözlendiği pH değerleri fitaz için 5, mannanaz için ise 6-7 olarak belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 30 ve 31'de verilmiştir.



Şekil 30. İmmobilize ve serbest mannanaz enzimine pH'nın etkisi.



Şekil 31. İmmobilize ve serbest fitaz enzimine pH'nın etkisi

TARTIŞMA VE SONUÇ

Biyoteknolojinin en faydalı uygulamalarından biri, endüstriyel işlemlerde mikroorganizmaların kullanılmasıdır. Biyoteknoloji canlı organizmaları kullanarak endüstriyel ticari ürün yapmak için yeni bir yaklaşım olmasının yanı sıra kaliteli ve çeşitli ürünler sunmak için gelişmeye devam etmektedir. Endüstriyel mikrobiyolojide çok sayıda mikroorganizma kullanılmaktadır; bunlara doğal olarak oluşan organizmalar, laboratuvarda seçilmiş mutantlar ve hatta genetiği değiştirilmiş organizmalar dahildir (Singh et al. 2019). Endüstriyel mikrobiyolojinin yenilenebilir kaynakları kullanabilir olması, hızlı ve etkili üretim prosesine sahip olması, sürdürülebilir çözümler sağlayabilmesi ve yüksek oranda kirletici kimyasal süreçleri biyo-uyumlu alternatiflerle değiştirme potansiyeline sahip olması en önemli özellikleri arasındadır (Sanchez and Demain 2017).

Mikroorganizmaların kullanımıyla birden fazla endüstriyel metabolit üretilebilmektedir. Üretilen metabolitler temelde primer ve sekonder olmak üzere iki tiptir. Ekonomik açıdan en değerli sekonder metabolitlerden biri protein yapısında olan enzimlerdir. Mikroorganizmalar, yüksek konsantrasyonlarda hücre dışı enzimler ürettikleri için ana enzim kaynağını oluştururlar.

Yapılan bu çalışmada; 15 farklı bakteri strainin (*Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus pentosus, Lactobacillus coryniformis, Lactobacillus brevis, Lactobacillus paracasei, Lactobacillus kefiri, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus mixtipabuli, Lactococcus garvieae, Lactococcus lactis, Enterococcus feacalis, Bacillus pumilus, Bacillus thuringensis, Bacillus invictae*) fitaz ve mannanaz enzimlerini üretebilme yeteneklerinin belirlenmesi, bu bakterilerden yüksek enzim aktivitesine sahip olanlar seçilerek fitaz ve mannanaz enzimlerinin kısmi saflaştırılması, ZnO nanopartiküllerine immobilize edilerek serbest haldeki enzimlerle (fitaz, mannanaz) karşılaştırılması ve endüstriye kazandırılabilirliği araştırılmıştır.

Yaptığımız çalışma sonucunda 15 farklı bakteri strainin süpernatatından fitaz ve mannanaz enzim aktivitesi bakılmış ve 48. saatin sonunda *L. kefiri* 10.217 EU/mL'lik değer ile en iyi fitaz aktivitesi göstermiştir. *Bacillus invictae* ise 0,461 EU/mL'lik değeri ile en iyi mannanaz enzim aktivitesi göstermiştir. Literatürde elde edilen değerler her iki bakterininde enzim üretme kabiliyetini destekler niteliktedir. Bunun sebebinin bakteri suşlarının değişken

azot kaynakları varlığında aynı enzimi farklı miktarda üretme kapasitelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Phothichitto et al. 2005; Sümengen 2011; Patki et al. 2015; Zhao et al. 2020).

L.kefiri bakterisinin fitaz enziminin optimum sıcaklığını bulmak için 10-90 ºC aralığında aktivite tayini yapılmıştır. pH ise 2-11 aralığında teste tabii tutulmuş ve sonuçta 70-80 ºC' de pH 5' te en iyi aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Sıcaklık değeri arttıkça enzim aktivitesini büyük ölçüde korumuştur. Yapılan çalışmalarda; Zamudio et al. (2001) *L. plantarum*'dan saflaştırdığı fitaz enzimi için optimum sıcaklık ve pH değerlerini sırasıyla 65°C, pH 5.5 olarak belirlemişlerdir. Bhagat et al. (2019), Laktik asit bakterileri (LAB) fitaz üretme potansiyelleri açısından taramış, maksimum fitaz aktivitesi gösteren suş *L. paracasei* olarak tanımlamıştır. Enzimin optimum sıcaklık derecesini 37°C, pH' yı ise 5.5 olarak bildirilmiştir. Sümengen (2011) ise, *Lactobacillus* sp. 12.1 ve *Lactobacillus* sp. 13.1'den elde ettikleri fitaz enziminin optimum sıcaklık ve ph değerlerini sırasıyla; 120 °C ve pH 3,4 olarak saptamışlardır. Patki et al. (2015) mangrov toprağından izole ettiği bakterilerden saflaştırdığı fitaz enziminin optimum sıcaklık aralığını 45-55°C, optimum pH aralığını ise 2-5 olarak belirtmişlerdir. Demir vd (2018), lor peynirinden izole ettikleri *Lactobacillus coryniformis'* ten fitaz enzimini saflaştırmış ve enzimin optimum pH ve sıcaklık değerlerini sırasıyla pH 5.0 ve 60°C olarak belirtmişlerdir. Bu sonuçlar elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir (Zamudio et al. 2001; Bhagat et al. 2019; Sümengen 2011; Patki et al. 2015; Demir vd 2018).

B. invictae bakterisinden kısmi olarak saflaştırılan mannanaz enziminin optimum pH ve sıcak değerini belirlemek için pH 2-11 ve 10-90 ºC sıcaklık aralığında aktivite tayini yapılmış ve sonuçta enzimin pH 6-7' de ve 40-50 ºC' de en iyi aktivite gösterdiği bulunmuştur. Phothichitto et al. (2005) *Bacillus circulans*'tan izole ettikleri mannanaz enziminin optimum pH ve sıcaklık değerlerini sırasıyla pH 7-9 ve 50 °C olarak bildirmişlerdir. Yin et al. (2012) *Paenibacillus cookii*'den saflaştırdıkları mannanaz enziminin sırasıyla pH 5.0 ve 50 °C'de optimum pH ve sıcaklığa sahip olduğunu belirtmişlerdir. Adiguzel vd (2014), *Bacillus pumilus* (M27)'den termo alkalin mannanaz enzimini saflaştırmış ve enzimin optimum pH ve sıcaklık değerlerini pH 8 ve 60°C olarak saptamışlardır. Dhawan et al. (2015), toprak örneklerinden ekstraselüler β-mannanaz üretebilen *Paenibacillus thiaminolyticus'u* izole etmiş ve bu bakteriden saflaştırılan mannanaz enziminin aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık değerlerini pH 6.0 ve 60°C olarak belirlemişlerdir. Nadaroglu vd (2015), *Lactobacillus plantarum (M24)* bakterisinden β-mannanaz enzimini saflaştırmış ve saflaştırılan mannanaz enziminin 50°C ve pH 8'de maksimum aktivite göstersiğini bildirmişlerdir. Zhao et al. (2020), *Lactobacillus casei* HDS-01'den mannanaz enzimini saflaştırmışlardır. Saflaştırılan mannanazın optimal sıcaklık ve pH değerleri 40 ° C ve pH 5.0 olarak belirlemişlerdir. Yapılan literatür çalışması sonucu

mannanaz enzimi için bildirilen optimum pH ve sıcaklık değerleri çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir (Phothichitto et al. 2005; Yin et al. 2012; Adiguzel vd 2014; Dhawan et al. 2015; Nadaroglu vd 2015; Zhao et al. 2020).

İmmobilize enzimler genellikle ısı, pH ve diğer etkilere karşı artan stabilite ve yeniden kullanılabilirlik açısından çok önemlidir. Çünkü enzim ve modifiye edilmiş nanopartiküller arasındaki kimyasal bağlar enzimlerin konfigürasyonunu stabilize ederek kayıpları azaltmaktadır (Sureshkumar and Lee 2011; Wang et al. 2011). Bu nedenle çalışmada; fitaz ve mannanaz enzimlerinin ZnO nanopartiküllerine immobilizasyonu sağlanmış ve FTIR, XRD ve SEM teknikleri kullanılarak karakterizasyonu yapılmıştır. İmmobilize fitaz ve mannanaz enzimlerinin optimum pH ve sıcaklık değerleri incelenmiş ve optimum aktivitenin görüldüğü pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla fitaz enzimi için pH 5.0 ve 70-80 ^{o}C; mannanaz enzimi için pH 6-7 ve 40-50 ^{o}C'dir. İmmobilize ve serbest enzimler karşılaştırıldığında immobilize enzimlerin farklı pH ve sıcaklık değerlerinde serbest enzimlere kıyasla daha yüksek bir aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar immobilize enzimlerin serbest enzimlere göre daha kararlı bir yapıda olduğunu göstermektedir. Naghshbandi et al. (2018) yaptıkları çalışmada farklı sıcaklık ve Ph değerlerinde immobilize fitazın serbest muadilinden daha yüksek stabilite gösterdiğini ve daha kararlı bir yapıda olduğunu belirtmişlerdir. Aynı şekilde Coutinho et al. (2020) immobilizasyondan sonra fitaz enziminin oldukça yüksek termodirenç (80 ve 90 °C) ile birlikte pH ve sıcaklık açısından daha geniş bir aktivite profili gösterdiğini bildirmişlerdir. Sıcaklığın serbest ve immobilize β-mannanaz üzerindeki etkisi, sırasıyla 50°C ve 55°C'de optimum olduğunu belirten Mohapatra, B. R. (2021) hem serbest hem de immobilize enzimin pH'sının ise 5-8 aralığında stabil kaldığını vurgulamıştır. Dhiman et al. (2020) yaptıkları çalışmada kısmı saflaştırdıkları β-mannanaz enzimini sodyum aljinat-P-siklodekstrin matrisi üzerine immobilize etmiş ve immobilize mannanazın pH ve optimum sıcaklık değerlerinin sırasıyla pH 6.0-7.0 ve 50-55 °C olduğunu, serbest mananaza kıyasla immobilize enzimin termostabilitesini arttırdığını bildirmişlerdir (Naghshbandi et al. 2018; Coutinho et al. 2020; Mohapatra, B. R. 2021; Dhiman et al. 2020).

Fitaz enziminin FTIR spektrumunda 3384 cm-1'de OH gerilme bantları ile 2934 cm-1'de CH gerilme bantları görülmektedir. Fitaz enziminin reaksiyonundaki su molekülünün OH grubu gerilmesinden kaynaklanan bantlar 1658 cm-1'e karşılık gelmektedir. Ayrıca 1044 ve 603 cm-1'deki bantların fosfat gruplarına ait olduğu düşünülmektedir. Fitaz enzimi ile immobilize edilen ZnO nanoparçacıklarının kimyasal bileşimini gösteren spektrumunda 3299 cm-1'de görülen pikler OH gruplarına, 2933 cm-1'deki pikler fitaz enziminin yapısındaki alifatik CH gruplarına aittir. 1659 cm-1'de görülen pik su molekülündeki OH bantlarına ait

gerilmelerden kaynaklanmıştır. 1044 cm-1'de görülen pikin fosfat grubuna ait olduğu, 535 cm-1'de görülen pikin ise ZnO immobilizetesinden kaynaklandığı düşünülmketedir. Fitaz enzimi ile immobilize edilen ZnO nanpartikülleri için elde edilen FTIR spektrumları sadece ZnO ve fitaz enzimine ait spektrumlarla karşılaştırıldığı zaman, ZnO ve enzim arasındaki adsorpsiyondan dolayı pik değerlerinin daha düşük dalga boylu bölgeye kayması ve piklerin şiddetlerinin azalması dışında herbir bileşenin kendi karakteristik yapısını koruduğu açık bir şekilde görülmektedir. İlgili spektrumlar incelendiğinde yine dalga sayısı yaklaşık 500 cm^{-1}'in üstündeki bölgede yer alan bant Zn-O bağ titreşiminin sonucunda oluşmuştur. Spektrumlardaki 2826 ve 3013 cm^{-1}'deki bantlar mannanaz enzim yapısında bulunan CH_2 gruplarının C-H gerilme titreşimlerine atfedilmiştir. 1399 cm^{-1}'deki pik C-C, 1057 cm-1'deki pik ise literatür ışığında C-O-C bağlarının titreşim enerjisine karşılık gelmektedir. Saf mannanaz enzimi ile immobilize edilen ZnO nanpartikülleri için elde edilen FTIR spektrumu yine sadece ZnO ve saf mannanaz enzimine ait spektrumlarla kıyaslandığında, piklerin kısmen daha düşük dalga boylu bölgelere kayması ve şiddetlerinin azalması dışında herbir bileşenin kendi karakteristik yapısını koruduğu anlaşılmaktadır. Bu durum yine ZnO ve mannanaz enzimi arasında oluşan adsorpsiyondan kaynaklanmaktadır. Fitaz ve mannanaz enzimi ile immobilize edilen ZnO'e ait XRD difraktogramlarında 2θ ölçeğinde 31,9º, 34,5º, 36,4º, 47,5º, 56,7º, 62,8º, 66,5º, 67,9º, 69,2º ve 77,1º'lerde yüksek şiddetlerde gözlenen difraksiyon pikleri sırasıyla çinko oksitin (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201), (004) ve (202) düzlemlerdeki yansımalarına karşılık gelmektedir. JCPDS No.74-0576 numaralı karttaki değerlere çok yakın olan bu değerler aynı zamanda ZnO'in enzim ile immobilize edilmeden önce ve hemde edildikten sonra kristal yöneliminin 2 boyutlu hekzagonal P63mc uzay grubuna sahip wurtzite fazında büyüdüğünü de açık bir şekilde göstererek fitaz ve mannanaz enzimi ile immobilize edilen ZnO'e ait kırınım piklerinin çok sayıda ve şiddetli olması da sentezlenen ürünlerin yüksek kristal özellikte olduğunun ve herhangi bir safsızlık pikine rastlanmaması da ZnO'in kristal yapısının bozulmadığını ifade etmektedir (Lin and Li, 2009; Hooda, 2018a).

Saf ZnO ve fitaz ve mannanaz enzimlerine immobilize edilen ZnO nanopartiküllerinin morfolojik yapısı farklı büyütmelerde SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir. Bu görüntülerde biyokompozitin, küresel ZnO parçacıklarının yüzeyine fitaz ve mannanaz enziminin tutunduğu açık bir şekilde görülmektedir. Yüksek büyütmeli olarak (43000x), hazırlanan biyokompozitlere daha yakından bakıldığında ise ilginç bir şekilde her bir mikro ZnO küresinin genişlikleri 10 ile 80 nm aralığında değişen nanoparçacıklardan oluştuğu gözlenmektedir. Aynı zamanda yüksek çözünürlüklü SEM görüntüleri, bu nanoparçacıkların, gözenekli bir yapıdaki enzimin düz yüzeyini de kapladığını çok net bir şekilde göstermektedir (Zhang and Tan 2001; Ramanaviciene et al. 2006; Ahmad and Sardar 2014; Preety and Hooda 2017). Bunun sebebi

olarak fitaz ve mannanaz enzimi ile modifikasyondan sonra ZnO nanoparçacıklarının topaklanma derecesinin azalması gösterilebilir. Sonuç olarak, tarafımızdan hazırlanan enzim temelli bu biyokompozitler için elde edilen FTIR, XRD ve SEM gibi yapısal ve morfolojik analizler fitaz ve mannanaz enzimin başarılı bir şekilde ZnO yüzeyine tutturulduğunu güçlü bir şekilde ispatlamaktadır. Literatür çalışmaları sonucu elde edilen veriler çalışmamızı destekler niteliktedir (Khooshe-Bast et al. 2016; Hooda, 2018a, 2018b; Sosnowska et al. 2018; Berini et al. 2019; Ismail et al. 2019, Jameel et al. 2020).

Mikrobiyal enzimlerin endüstriyel kullanım beklentileri 21. yüzyılda büyük ölçüde artmıştır ve enzimler birçok endüstrinin hızla büyüyen nüfusun talebini karşılaması ve doğal kaynakların tükenmesiyle başa çıkması için önemli bir potansiyele sahip olduğundan sürekli olarak artmaktadır. Mikrobiyal kökenli enzimler, atık yönetiminde ve dolayısıyla yeşil çevrenin geliştirilmesinde önemli bir potansiyele sahiptir. Mikrobiyal enzimlerin üretimi, çok çeşitli fiziksel ve kimyasal koşullar altında iyi çalışan farklı mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin yüksek ve üstün performansları nedeniyle endüstriyel sektörlerde gerekli bir durumdur (Anbu et al. 2015). Yeni ve daha aktif enzimlerin keşfi, endüstriyel enzim pazarında genişleyen bir büyümeye yol açmıştır. Enzimlerin çeşitli endüstrilerde (örneğin gıda, tekstil, kâğıt, deri, tarım, kimyasallar ve farmasötikler) kullanımı, azaltılmış işleme süresi, düşük enerji girdisi, maliyet etkinliği, toksik olmayan ve çevre dostu özellikleri nedeniyle hızla artmaktadır. Mikrobiyal enzimler, endüstriyel ve evsel atıkların toksik kimyasal bileşenlerini (fenolik bileşikler, nitriller, aminler vb.) ya bozunma ya da dönüştürme yoluyla parçalayabilirler. Yüksek verim ve daha kaliteli ürünler sunmaları nedeniyle diğer enzim kaynaklarına göre daha çok tercih edilmektedirler (Gurung et al. 2013).

Yeni geliştirilen enzimlerin çoğu, daha önce mevcut olan enzimlere kıyasla gelişmiş termostabiliteye sahiptir. Termostabil enzimlere olan ilgi, esas olarak mevcut endüstriyel enzim proseslerinin çoğunun yüksek sıcaklıklarda çalıştırılması gerçeğinden dolayı artmıştır. Endüstriyel işlemlerde termostabil enzimlerin kullanılması, reaksiyonların daha yüksek sıcaklıklarda ve daha kısa sürelerde gerçekleştirilmesine olanak sağlayarak mikrobiyal kontaminasyon olasılığını azaltmaktadır. Yüksek proses sıcaklıklarının kullanılması, aynı zamanda, daha düşük sıcaklıklarda çözünmeyen reaktanların, yani yağların kullanımına da izin vermektedir.

Sonuç olarak; *L. kefiri*'den saflaştırılan 10.217 EU/mL'lik aktiviteye sahip fitaz enziminin optimum pH'sı 5 ve optimum sıcaklık değeri 70-80 ºC'dir. Bu özellikleri nedeniyle saflaştırılan ve ZnO nanopartikülüne immobilize edilen fitaz enzimi termostabil ve asidik karakter gösterdiği için çeşitli endüstrilerde tercih nedeni olabilecektir.

B. invictae'den saflaştırılan 0,461 EU/mL' lik aktiviteye sahip, optimum pH'sı 6-7 ve optimum sıcaklığı 40-50ºC olan mannanaz enziminin ZnO nanopartikülüne immobilizasyonu yapılmış ve her iki enziminde termostabil bir özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir.

Çalışma sonunda karakteristik özellikleri belirlenen her iki mikrobiyal kökenli enzim; endüstriyel alanlarda muadillerine göre alternatif olarak kullanılabilme potansiyellerine sahiptir. Elde edilen enzimlerin karakterizasyonlarının belirlenmesi ve ZnO nanopartikülü ile immobilize edilmesinin sonucunda yüksek oranda katalitik aktivitelerini korumaları, ZnO nanopartikülüne karşı dirençli olmaları, yüksek sıcaklıkta ve farklı pH'larda enzim stabilitelerini korumalarından dolayı; besin değeri yüksek yem elde etmek için yem sanayisinde, bitki çimlendirilmesinde, miyo inositol elde edilmesinde, gübre ilaç, gıda, ziraat, deterjan endüstrileri gibi birçok alanda kullanılabilecekleri sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

Adibmoradi, M., Mehri, M., Qods Branch, I., 2007. Effects of β-mannanase on broiler performance and gut morphology. In 16th European symposium on poultry nutrition, Stasburg, France (pp. 471-47).

Adiguzel, A., Nadaroglu, H., & Adiguzel, G., 2014. Purification and characterization of β -mannanase from *Bacillus pumilus* (M27) and its applications in some fruit juices. Association of Food Scientists & Technologists (India), 52(8), 5292–5298.

Adiguzel, A., Nadaroglu, H., Adiguzel, G., 2015. Purification and characterisation of β-mannanase from Bacillus pumilus (M27) and its aplications in some fruit juices, Journal of Food Science and Technology 52(8):5292–5298.

Adiguzel, G., Sonmez, Z., Adiguzel, A., Nadaroglu, H., 2016. Purification and characterization of a thermostable endo-beta-1, 4 mannanase from Weissellaviridescens LB37 and its application in fruit juice clarification. *European Food Research and Technology*, *242*(5), 769-776.

Aehle, W., 2004. Enzymes in industry: production and applications. Weinheim, 484s, Germany.

Ahmad, R. and Sardar, M., 2014. Immobilization of cellulase on TiO 2 nanoparticles by physical and covalent methods: a comparative study.

Ajith, S., Ghosh, J., Shet, D., ShreeVidhya, S., Punith, B. D., Elangovan, A. V., 2019. Partial purification and characterization of phytase from Aspergillus foetidus MTCC 11682. *AMB Express*, *9*(1), 1-11.

Amidon, G. E., Meyer, P. J., Mudie, D. M., 2017. Particle, Powder, and Compact Characterization. Developing Solid Oral Dosage Forms, 271–293.

Anbu, P., Gopinath, S. C., Chaulagain, B. P., Tang, T. H., Citartan, M., 2015. Microbial enzymes and their applications in industries and medicine 2014.

Anonim, 2021. Enzim Aktivitesini Etkileyen Etmenler - Biyokimya (biyologlar.com) (27.06.20221).

Anonim, 2021a. https://www.slideshare.net/KamleshYadav35/enzymes-bpharm éE”b n(22.06.2021).

Anonim, 2021b. https://alevelbiology.co.uk/notes/biological-catalysts-enzymes/ (21.06.2021).

Anonim, 2021c. https://www.msxlabs.org/forum/biyoloji/21021-enzim-nedir-enzimler-hakkinda-2.html (15.05.2021).

Anonim, 2021d. https://slideplayer.com/slide/4943969/ (10.06.2021).

Anonim, 2021e. https://www.molinstincts.com/structure/Phytic-acid-cstr-CT1078640801.html (11.06.2021).

Aşan Özüsağlam, M., 2007b. Yem değerini artırıcı enzim genlerinin probiyotik etkili laktik asit bakterilerinde klonlanarak üretimi. Doktrora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zooteknik Ana Bilim Dalı, Adana.

Aşan, M., 2007a. Mikrobiyal Fitazlar, Uygulama Alanları ve Biyoteknoloji, Journal of Agricultural Sciences, 13(02), 147-155.

Aziz, S. A., Ong, L. G. A., Hassan, M. A., Karim, M. I. A., 2008. Production parameters optimization of mannanse production from Aspergillus niger FTCC 5003 using palm kernel cake as carbon source. Asi J Biochem, 3(5), 297-307.

Bahri, S., Sundu, B., Aprianto, M. R., 2019. Mannanase activity produced through fermentation of coconut flour at various pH by Aspergilus niger. In Journal of Physics: Conference Series (Vol. 1242, No. 1, p. 012009). IOP Publishing.

Barak, S. and Mudgil, D., 2014. Locust bean gum: processing, properties and food applications—a review. International journal of biological macromolecules, 66, 74-80.

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(2), 238-249.

Batur, A., 2012. Biyoteknoloji, Kırklareli Üniversitesi, http://www.kirklareli.edu.tr/download//byfiles/50353588.html (15.05.2021).

Baygın, E., 2015. Topraktan Fitaz Enzimi Üreten *Bacillus Sp.* Suşlarının Taranması ve Besinsel Faktörlerin Fitaz Üretimi Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

Berini, F., Casartelli, M., Montali, A., Reguzzoni, M., Tettamanti, G., Marinelli, F., 2019. Metagenome-sourced microbial chitinases as potential insecticide proteins. Frontiers in microbiology, 10, 1358.

Bhagat, D., Slathia, P. S., Raina, N., Sharma, P., 2019. Production of phytase from Lactobacillus paracasei strain and its probiotic profile.

Blibech, M., Mouelhi, S., Farhat-Khemakhem, A., Boukhris, I., Ayeb, A. E., Chouayekh, H., 2019. Selection of Bacillus subtilis US191 as a mannanase-producing probiotic candidate. *Biotechnology and applied biochemistry*, *66*(5), 858-869.

Bohn, L., Meyer, A. S., Rasmussen, S. K., 2008. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. Journal of Zhejiang University Science B, 9(3), 165-191.

Buxbaum, E., 2007. Fundamentals of Protein Structure and Function. Springer, West Indies, 59-63.

Cao, L., 2011. Immobilized enzymes: Comprehensive Biotechnology. 461–476. V. 2.

Cao, L., van Langen, L., Sheldon, R. A., 2003. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?. Current opinion in Biotechnology, 14(4), 387-394.

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*(4), 497-507.

Casey, A. and Walsh, G., 2004. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. Journal of biotechnology, 110(3), 313-322.

Chauhan, P. S., Puri, N., Sharma, P., Gupta, N., 2012. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. Applied microbiology and biotechnology, 93(5), 1817-1830.

Chen, J., Chang, K., 1994. "Immobilization of chitinase on a reversibly soluble–insoluble polymer for chitin hydrolysis", Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 60, 133–140.

Chen, Y., Ding, H., Sun, S., 2017. Preparation and characterization of ZnO nanoparticles supported on amorphous SiO2. Nanomaterials, 7(8), 217.

Chirumamilla, R. R., Muralidhar, R., Marchant, R., Nigam, P., 2001. Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution. Molecular and Cellular Biochemistry, 224(1), 159-168.

Choi, Y. M., Suh, H. J., Kim, J. M., 2001. Purification and properties of extracellular phytase from Bacillus sp. KHU-10. Journal of Protein Chemistry, 20(4), 287-292.

Coutinho, T. C., Tardioli, P. W., Farinas, C. S., 2020. Phytase immobilization on hydroxyapatite nanoparticles improves its properties for use in animal feed. Applied biochemistry and biotechnology, 190(1), 270-292.

Çelenkli, C., 2015. *Lactobacillus plantarum* Bakterisinden Fitaz ve Mannanaz Enzimlerinin Kısmi Saflaştırılması, Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Nanohidroksiapatit'e İmmobilize Edilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Dawood, A., and Ma, K., 2020. Applications of Microbial β-Mannanases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*.

De Marco, J. D. C. I., Neto, G. P. D. S., Castro, C. F. D. S., Michelin, M., Polizeli, M. D. L., 2015. Partial Purification and Characterization of a Thermostable β-Mannanase from Aspergillus foetidus. *Applied Sciences*, *5*(4), 881-893.

Demir, Y., Dikbaş, N., Beydemir, Ş., 2018. Purification and biochemical characterization of phytase enzyme from Lactobacillus coryniformis (MH121153). *Molecular biotechnology*, *60*(11), 783-790.

Demir, Y., Şenol Kotan, M., Dikbas, N., Beydemir, S., 2017. Phytase from Weissella halotolerans: Purification, partial characterisation and the effect of some metals. International Journal of Food Properties, 20(2), 2127–2137.

Dhawan, S. and Kaur, J., 2007. Microbial mannanases: an overview of production and applications. Critical reviews in biotechnology, 27(4), 197-216.

Dhawan, S., Singh, R., Kaur, R., Kaur, J., 2016. A β-mannanase from Paenibacillus sp.: Optimization of production and its possible prebiotic potential. *Biotechnology and applied biochemistry*, *63*(5), 669-678.

Dhiman, S., Srivastava, B., Singh, G., Khatri, M., Arya, S. K., 2020. Immobilization of mannanase on sodium alginate-grafted-β-cyclodextrin: an easy and cost effective approach for the improvement of enzyme properties. *International journal of biological macromolecules*, *156*, 1347-1358.

Dhingani, R. M., Joshi, B. H., Prasad, R. V., 2017. Screening, characterization and identification of probiotic potential LAB with phytase activity. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *6*(9), 3539-3545.

Dinçyürek, H.B., 2019. Doğal *Bacillus sp*. Suşlarından β-Mannanaz Enzim İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulanabilirliği. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Doğan, G., 2008. Yeni nesil polimerik nanoyapıların hazırlanması ve enzim immobilizasyonunda kullanılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adnan Menderes Üniversitesi.

Dokuzparmak, E., 2015. Termofilik *Geobacillus Sp.* Tf16 Suşundan Fitaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Doğal Bir Besin Kaynağındaki Fitatı Parçalama Etkinliğinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

Dvořáková, J., 1998. Phytase: sources, preparation and exploitation. Folia microbiologica, 43(4), 323-338.

Ellestad, L. E., Angel, R. J. R. J. S., Soares, J. H., 2002. Intestinal phytase II: a comparison of activity and in vivo phytate hydrolysis in three teleost species with differing digestive strategies. Fish Physiology and Biochemistry, 26(3), 259-273.

Elliott, J. C., Holcomb, D. W., Young R. A. 1985. "Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel", Calcified Tissue International, 37, 372–375.

El-Sharouny, E. E., El-Toukhy, N. M., El-Sersy, N. A., El-Gayar, A. A. E. A., 2015. Optimization and purification of mannanase produced by an alkaliphilic-thermotolerant Bacillus cereus N1 isolated from Bani Salama Lake in Wadi El-Natron. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 29(2), 315-323.

Erkan, K., 2014. Mikrobiyal Fitaz Üretimine ve Aktivitesine Etkili Parametrelerin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Erkan, S. B., Basmak, S., Özcan, A., Yılmazer, C., Gürler, H. N., Yavuz G., Germec, M., Yatmaz, E., Turhan, İ., 2020. Mannooligosaccharide production by β-mannanase enzyme application from coffee extract. Journal of Food Processing and Preservation, e14668.

Fang, H. H., Chan, K. Y., Xu, L. C., 2000. Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM). *Journal of microbiological methods*, *40*(1), 89-97.

Feil, B., 2001. Phytic acid. Journal of New Seeds, 3(3), 1-35.

Fredlund, K., Isaksson, M., Rossander-Hulthén, L., Almgren, A., Sandberg, A. S., 2006. Absorption of zinc and retention of calcium: dose-dependent inhibition by phytate. Journal of Trace elements in Medicine and Biology, 20(1), 49-57.

Fredrikson, M., Biot, P., Alminger, M. L., Carlsson, N. G., Sandberg, A. S., 2001. Production process for high-quality pea-protein isolate with low content of oligosaccharides and phytate. Journal of agricultural and food chemistry, 49(3), 1208-1212.

Fu, Y., Jeong, S. H., Kim, J., Callihan, J. A., Park, K., Pai, C. M., Seomoon, G., 2006. Mannosebased fast dissolving tablets. *Patent US20060134195A1*.

Furlan, S. A., and Pant, H. K., 2006. General properties. In *Enzyme technology* (pp. 11-35). Springer, New York, NY.

Ge, J. P., Du, R. P., Zhao, D., Song, G., Jin, M., Ping, W. X., 2016. Bio-chemical characterization of a β-mannanase from Bacillus licheniformis HDYM-04 isolated from flax water-retting liquid and its decolorization ability of dyes. *RSC advances*, *6*(28), 23612-23621.

Gessesse, A., 1998. Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases from an Alkaliphilic Bacillussp. Applied and Environmental Microbiology, 64(9), 3533-3535.

Greiner, R. and Konietzny, U., 2006. Phytase for food application. Food Technology & Biotechnology, 44(2).

Gröger, H., Capan, E., Barthuber, A., Vorlop, K. D., 2001. Asymmetric synthesis of an (R)-cyanohydrin using enzymes entrapped in lens-shaped gels. Organic Letters, 3(13), 1969-1972.

Gurung, N., Ray, S., Bose, S., Rai, V., 2013. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. BioMed research international, 2013.

Haefner, S., Knietsch, A., Scholten, E., Braun, J., Lohscheidt, M., Zelder, O., 2005. Biotechnological production and applications of phytases. Applied microbiology and biotechnology, 68(5), 588-597.

Harland, B. F. and Morris, E. R., 1995. Phytate: A good or a bad food component. Nutr. Res. 15(5): 733–754.

Haros, M., Bielecka, M., Sanz, Y., 2005. Phytase activity as a novel metabolic feature in Bifidobacterium. *FEMS microbiology letters*, *247*(2), 231-239.

Hartmann, M. and Jung, D., 2010. Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends. Journal of Materials Chemistry, 20(5), 844-857.

He, X., Liu, N., Li, W., Zhang, Z., Zhang, B., Ma, Y., 2008. Inducible and constitutive expression of a novel thermostable alkaline β-mannanase from alkaliphilic Bacillus sp. N16-5 in Pichia pastoris and characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, *43*(1), 13-18.

Holm, P. B., Kristiansen, K. N., Pedersen, H. B., 2002. Transgenic approaches in commonly consumed cereals to improve iron and zinc content and bioavailability. The Journal of nutrition, 132(3), 514-516.

Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., Stevanato, R., 2013. Enzyme immobilization: an update. Journal of chemical biology, 6(4), 185-205.

Hooda Preety, V., 2014 "Immobilization and kinetics of catalase on calcium carbonate nanoparticles attached epoxy support", Biotechnology and Applied Biochemistry, 172, 115–130.

Hooda, V., 2018a. A novel polyurethane/nano ZnO matrix for immobilization of chitinolytic enzymes and optical sensing of chitin. *International journal of biological macromolecules*, *106*, 1173-1183.

Hooda, V., 2018b. Enzymes loaded chitosan/coconut fibre/zinc oxide nanoparticles strip for polyamine determination. Food Chemistry, 239, 1100-1109.

Hurrell, R. F., 2003. Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. The Journal of nutrition, 133(9), 2973S-2977S.

Imran, M., Pasha, N., Akram, S. M., Mehmood, K., Sabir, A. J., 2014. Effect of ß-Mannanase on Broilers Performance at different dietary energy levels. Glob. Vet, 12(5), 622-626.

Ishwarya, R., Vaseeharan, B., Kalyani, S., Banumathi, B., Govindarajan, M., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S, Al-Anbr, M. N., Khaled, J. M., Benelli, G., 2018. Facile green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Ulva lactuca seaweed extract and evaluation of their photocatalytic, antibiofilm and insecticidal activity. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 178, 249-258.

Ismail, S. A., Hassan, M. E., Hashem, A. M., 2019. Single step hydrolysis of chitin using thermophilic immobilized exochitinase on carrageenan-guar gum gel beads. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 21, 101281.

İşleyen, K., 2018. Biotechnological Approaches to The Phosphorus Cycle: Recombinant Phytase Production in *Bacillus Subtilis*. MS Thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Yeditepe University.

Jameel, M., Shoeb, M., Khan, M. T., Ullah, R., Mobin, M., Farooqi, M. K., Adnan, S. M., 2020. Enhanced insecticidal activity of thiamethoxam by zinc oxide nanoparticles: A novel nanotechnology approach for pest control. ACS omega, 5(3), 1607-1615.

Jana, U. K., Suryawanshi, R. K., Prajapati, B. P., Soni, H., Kango, N., 2018. Production optimization and characterization of mannooligosaccharide generating β-mannanase from Aspergillus oryzae. Bioresour. Technol. 268, 308– 314. doi: 10.1016/j.biortech.2018.07.143

John, F. K., 1987. Enzyme Technology. *Biotechnology 7A, Edited by HJ Rehm, G. Reed, Lincoln, UK*. s 37-62.

Kalkan, Ş.O., 2016. Denizel Türevli Filamentöz Fungus Suşlarından Fitaz Üretimi, Fitaz Enziminin Moleküler ve Biyokimyasal Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova-İzmir.

Karademir, A., Akgül, M., Tutuş, A., 2002. Kâğıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kâğıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı (Bölüm 1). KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 5(1), 3.

Karahalil, E., Germec, M., Karaoğlan, M., Yatmaz, E., Coban, HB, İnan, M. Turhan, I., 2019. Keçiboynuzu özü üzerinde yetiştirilen Aspergillus sojae'de ifade edilen Aspergillus fumigatus'tan rekombinant bir β-mannanazın kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. *Biyokütle Dönüşümü ve Biorefinery*, 1-17.

Kasthuri, N., Hayworth, K., Lichtman, J., Erdman, N., Ackerley, C. A., 2007. "New technique for ultra-thin serial brain section imaging using scanning electron microscopy" Microscopy and Microanalysis, 13(2), 26–27.

Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2004. Biyokimya. Aktif Yayın Dağıtım.

Khodaii, Z., Mehrabani Natanzi, M., Naseri, M. H., Goudarzvand, M., Dodson, H., Snelling, A. M., 2013. Phytase activity of lactic acid bacteria isolated from dairy and pharmaceutical probiotic products. *Int J Enteric Pathog, 1*(1), 12-16.

Khooshe-Bast, Z., Sahebzadeh, N., Ghaffarı-Moghaddam, M., Mırshekar, A., 2016. Insecticidal effects of zinc oxide nanoparticles and Beauveria bassiana TS11 on Trialeurodes vaporariorum (Westwood, 1856)(Hemiptera: Aleyrodidae). Acta agriculturae Slovenica, 107(2), 299-309.

Kıran, E. Ö., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1), 12-19.

Kızılkaya, M., 2018. Doğal Kaynaklardan İzole Edilen ve Probiyotik Özelliği Bilinen *Lactococcus lactis, Lactobacillus brevis*'in Fitaz Enzim Aktivitelerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Kim, M.-K., An, Y. J., Jeong, C.-S., Song, J. M., Kang, M. H., Lee, Y.-H., Cha, S.-S., 2013. Expression at 279 K, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a novel cold-active β-1, 4-d-mannanase from the Antarctic springtail Cryptopygus antarcticus. Acta Crystallogr. Sec F Struct. Biol. Cryst. Commun. 69, 1007–1010. doi: 10.1107/s1744309113020538

Kirk, O., Borchert, T. V., Fuglsang, C. C., 2002. Industrial enzyme applications. Current opinion in biotechnology, 13(4), 345-351.

Kołodziejczak-Radzimska, A., Jesionowski, T., 2014. Zinc oxide—from synthesis to application: a review. Materials, 7(4), 2833-2881.

Konietzny, U. and Greiner, R., 2002. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). International journal of food science & technology, 37(7), 791-812.

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

Konietzny, U. and Greiner, R., 2004. Bacterial phytase: potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. Brazilian Journal of Microbiology, 35(1-2), 12-18.

Kornegay, E. T., 2001. Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity. Enzymes in farm animal nutrition, 237, 272.

Kress, J., Zanaletti, R., Amour, A., Ladlow, M., Frey, J. G., Bradley, M., 2002. Enzyme accessibility and solid supports: which molecular weight enzymes can be used on solid supports? An investigation using confocal Raman microscopy. Chemistry–A European Journal, 8(16), 3769-3772.

Kumar, D. J. M., Balakumaran, M. D., Kalaichelvan, P. T., Pandey, A., Singh, A., Raja, R. B., 2011. Isolation, production & application of extracellular phytase by Serratia marcescen. Asian Journal of Experimental Biological Sciences, 2(4), 663-666.

Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P., Becker, K., 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. Food chemistry, 120(4), 945-959.

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, *227*(5259), 680-685.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M., 2004. Overhead Transparency Set for Lehninger Principles of Biochemistry, 4th Ed., WH Freeman.

Lei, X. G. and Porres, J. M., 2003. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. Biotechnology letters, 25(21), 1787-1794.

Lei, X. G., Porres, J. M., Mullaney, E. J., Brinch-Pedersen, H., 2007. Phytase: source, structure and application. In Industrial enzymes, Ed: Polaina J., MacCabe AP. Springer, Dordrecht, 505-529.

Lei, X. G., Weaver, J. D., Mullaney, E., Ullah, A. H., Azain, M. J., 2013. Phytase, a new life for an "old" enzyme. Annu. Rev. Anim. Biosci., 1(1), 283-309.

Lin, C. C. and Li, Y. Y., 2009. Synthesis of ZnO nanowires by thermal decomposition of zinc acetate dihydrate. Materials Chemistry and Physics, 113(1), 334-337.

Liu, Y. L., Yang, Y. H., Yang, H. F., Liu, Z. M., Shen, G. L., Yu, R. Q., 2005. Nanosized flower-like ZnO synthesized by a simple hydrothermal method and applied as matrix for horseradish peroxidase immobilization for electro-biosensing. Journal of Inorganic Biochemistry, 99(10), 2046-2053.

Lopez, H. W., Leenhardt, F., Coudray, C., Remesy, C., 2002. Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition?. International journal of food science & technology, 37(7), 727-739.

Lönnerdal, B., 2002. Phytic acid–trace element (Zn, Cu, Mn) interactions. International Journal of Food Science & Technology, 37(7), 749-758.

Lv, J. N., Chen, Y. Q., Guo, X. J., Piao, X. S., Cao, Y. H., Dong, B., 2013. Effects of supplementation of β-mannanase in corn-soybean meal diets on performance and nutrient digestibility in growing pigs. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, *26*(4), 579.

Malgas, S., van Dyk, J. S., Pletschke, B. I., 2015. A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between β-mannanase, β-mannosidase and α-galactosidase. World J. Microbiol. Biotechnol. 31, 1167– 1175. doi: 10.1007/s11274-015-1878-2

Malini, M., Thirumavalavan, M., Yang, W. Y., Lee, J. F., Annadurai, G., 2015. A versatile chitosan/ZnO nanocomposite with enhanced antimicrobial properties. International journal of biological macromolecules, 80, 121-129.

Malkoç, O., 2017. Doğal Kaynaklardan İzole Edilen *Lactobacillus brevis*'in 16s Rrna İle Moleküler Tanılanması, Fitaz Enzimi Aktivitesi, Endüstriye Kazandırılabilirliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Marlida, Y., Delfita, R., Adnadi, P., Ciptaan, G., 2010. Isolation, characterization and production of phytase from endophytic fungus its application for feed. Pak J Nutr, 9(5), 471-4.

Maruta, T., Tanouchi, A., Tamoi, M., Yabuta, Y., Yoshimura, K., Ishikawa, T., Shigeoka, S., 2010. Arabidopsis chloroplastic ascorbate peroxidase isoenzymes play a dual role in photoprotection and gene regulation under photooxidative stress. Plant and Cell Physiology, 51(2), 190-200.

Micheva, K. D. and Smith, S. J., 2007. "Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits", Neuron 55, 25–36.

Midilli, M., Muğlalı, Ö. H., Alp, M., Kocabağlı, N., Tanör, M. A., Toklu, G. S., 2003. The effect of dietary phytase supplementation on the fattening performance and mineral balance of broilers. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, *27*(3), 751-759.

Mohapatra, B. R., 2021. Characterization of β-mannanase extracted from a novel Streptomyces species Alg-S25 immobilized on chitosan nanoparticles. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 35(1), 150-161.

Moreira, L. R. S., 2008. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied microbiology and biotechnology*, *79*(2), 165-178.

Mudgil, D., Barak, S., Khatkar, B. S., 2014. Guar gum: processing, properties and food applications—a review. Journal of food science and technology, 51(3), 409-418.

Muhammad, S., Fawwad, A., Mansoor, J., Shahbaz, A., 2015. Effect of β-mannanase on broiler's performance. Scholarly Journal of Agricultural Sciences, 5(7), 237-246.

Mullaney, E. J., Daly, C. B., Kim, T., Porres, J. M., Lei, X. G., Sethumadhavan, K., Ullah, A. H., 2002. Site-directed mutagenesis of Aspergillus niger NRRL 3135 phytase at residue 300 to enhance catalysis at pH 4.0. Biochemical and Biophysical Research Communications, 297(4), 1016-1020.

Mussini, F. J., Coto, C. A., Goodgame, S. D., Lu, C., Karimi, A. J., Lee, J. H., Waldroup, P. W., 2011. Effect of ß-mannanase on broiler performance and dry matter output using corn-soybean meal based diets. International journal of Poultry science, 10(10), 778-781.

Nadaroglu, H., Adiguzel, G., Adiguzel, A., Sonmez, Z., 2017. A thermostable-endo-β-(1, 4)-mannanase from Pediococcus acidilactici (M17): purification, characterization and its application in fruit juice clarification. *European Food Research and Technology*, *243*(2), 193-201.

Nadaroğlu, H. and Dikbaş, N., 2018. Lactobacillus plantarum'dan (ATCC® 14917TM) bir β-Mannanazın Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. *International Journal of Innovative Research and Reviews*, *2* (1), 1-6.

Nadaroğlu, H., Adiguzel, A., Adiguzel, G., 2015. L actobacillus plantarum'dan (M 24) β -mannanazın saflaştırılması ve karakterizasyonu ve bazı meyve sularında uygulamaları. *Uluslararası Gıda Bilimi ve Teknolojisi Dergisi*, *50* (5), 1158-1165.

Naghshbandi, M. P., Moghimi, H., Latif, B., 2018. Covalent immobilization of phytase on the multi-walled carbon nanotubes via diimide-activated amidation: structural and stability study. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 46(sup1), 763-772.

Najafi, S., Pazhouhnia, Z., Ahmadi, O., Berenjian, A., Jafarizadeh-Malmiri, H., 2014. Chitosan nanoparticles and their applications in drug delivery: a review. Curr. Res. Drug Discov, 1, 17-25.

Nigam, P. S., 2013. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. Biomolecules, 3(3), 597-611.

Nunes, F. M., Reis, A., Domingues, M. R. M., Coimbra, M. A., 2006. Characterization of galactomannan derivatives in roasted coffee beverages. Journal of agricultural and food chemistry, 54(9), 3428-3439.

Oh, B. C., Choi, W. C., Park, S., Kim, Y. O., Oh, T. K., 2004. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. Applied Microbiology and Biotechnology, 63(4), 362-372.

Oosterveld, A., Harmsen, J. S., Voragen, A. G. J., Schols, H. A., 2003. Extraction and characterization of polysaccharides from green and roasted Coffea arabica beans. Carbohydrate Polymers, 52(3), 285-296.

Ozturk, B., Cekmecelioglu, D., Ogel, Z. B., 2010. Optimal conditions for enhanced β-mannanase production by recombinant Aspergillus sojae. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 64(3-4), 135-139.

Özdemir, S.Ç., 2018. Çeşitli Kaynaklardan Fitaz Üreticisi Fungusların İzolasyonu ve Termostabil Fitaz Üretimi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova-İzmir.

Pan, X., Zhou, J., Tian, A., Le, K., Yuan, H., Xue, Y., Lu, H., 2011. High level expression of a truncated β-mannanase from alkaliphilic Bacillus sp. N16-5 in Kluyveromyces cicerisporus. Biotechnology letters, 33(3), 565-570.

Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C. R., Rodriguez-Leon, J. A., Soccol, V. T., 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. Bioresource technology, 77(3), 203-214.

Patki, J. M., Singh, S., Mehta, S., 2015. Partial purification and characterization of phytase from bacteria inhabiting the mangroves of the western coast of India. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, *4*(9), 156-169.

Pettey, L. A., Carter, S. D., Senne, B. W., Shriver, J. A., 2002. Effects of beta-mannanase addition to corn-soybean meal diets on growth performance, carcass traits, and nutrient digestibility of weanling and growing-finishing pigs. Journal of animal science, 80(4), 1012-1019.

Phothichitto, K., Nitisinprasert, S., Keawsompong, S., 2006. Isolation, screening and identification of mannanase producing microorganisms. *Agriculture and Natural Resources*, *40*(6 (Suppl.)), 26-38.

Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., Amorim, D. S., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, *67*(5), 577-591.

Prajapati, V. D., Jani, G. K., Moradiya, N. G., Randeria, N. P., Nagar, B. J., 2013. Locust bean gum: A versatile biopolymer. Carbohydrate polymers, 94(2), 814-821.

Preety, Hooda, V., 2017. Increasing the efficiency of immobilization and chitin determination using copper oxide nanoparticles. Talanta, 168, 246–256.

Quan, C. S., Fan, S. D., Zhang, L. H., Wang, Y. J., Ohta, Y., 2002. Purification and properties of a phytase from Candida krusei WZ-001. Journal of Bioscience and Bioengineering, 94(5), 419-425.

Quan, C., Zhang, L., Wang, Y., Ohta, Y., 2001. Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast Candida krusei. Journal of bioscience and bioengineering, 92(2), 154-160.

Raghavendra, P., Rao, T., Halami, P., 2010. Evaluation of beneficial attributes for phytate-degrading Pediococcus pentosaceus CFR R123. Beneficial microbes, 1(3), 259-264.

Ramanaviciene, A., Schuhmann, W., Ramanavicius, A., 2006. AFM study of conducting polymer polypyrrole nanoparticles formed by redox enzyme–glucose oxidase–initiated polymerisation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 48(2), 159-166.

Rasmussen, J. W., Martinez, E., Louka, P., Wingett, D. G., 2010. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. Expert opinion on drug delivery, 7(9), 1063-1077.

Ruszkiewicz, J. A., Pinkas, A., Ferrer, B., Peres, T. V., Tsatsakis, A., Aschner, M., 2017. Neurotoxic effect of active ingredients in sunscreen products, a contemporary review. Toxicology Reports, 4, 245-259.

Sadıgh, S., 2014. *Brevibacillus brevis (*P14) ve *Brevibacillus borstelensis* (P35) Bakterileri Tarafından Aynı Ortamda Mannanaz ve Fitaz Enzimlerinin Üretilebilirliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Saldamlı, İ., 2005. Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara.

Sanchez, S. and Demain, A. L., 2017. Useful microbial enzymes—an introduction. In Biotechnology of microbial enzymes (pp. 1-11). Academic Press.

Sandez Penidez, S. H., Velasco Manini, M. A., Gerez, C. L., Rollán, G. C., 2020. Partial characterization and purification of phytase from Lactobacillus plantarum CRL1964 isolated from pseudocereals. *Journal of Basic Microbiology*, *60*(9), 787-798.

Sandıkçıoğlu, G., 2016. Fitaz Enzimi Üretimi ve Etkinliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

Sarıbuğa, E., 2013. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus* Bakterilerinden Fitaz Enziminin Kısmen Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Sarıbuğa, E., Dikbas, N., Nadaroglu, H., Şenol, M., 2014. "Partial Purification, Characterization of Phytase Enzyme from Lactobacillus acidophilus Bacteria and Determination of It's Some Kinetic Properties", Journal of Pure and Applied Microbiology, 8:91-96.

Sariyska, M. V., Gargova, S. A., Koleva, L. A., Angelov, A. I., 2005. Aspergillus niger phytase: purification and characterization. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 19(3), 98-105.

Schäfer, T., Kirk, O., Borchert, T. V., Fuglsang, C. C., Pedersen, S., Salmon, S., Olsen, H. S., Deinhammer, R., Lund, H., 2005. Enzymes for technical applications. Polysaccharides and polyamides in the food industry: properties, production, and patents, 557-617.

Schallmey, M., Singh, A., Ward, O. P., 2004. Developments in the use of Bacillus species for industrial production. Canadian journal of microbiology, 50(1), 1-17.

Seesom, W., Thongket, P., Yamamoto, T., Takenaka, S., Sakamoto, T., Sukhumsirichart, W., 2017. Purification, characterization, and overexpression of an endo-1, 4-β-mannanase from thermotolerant Bacillus sp. SWU60. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *33*(3), 53.

Selle, P. H. and Ravindran, V., 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. Animal feed science and technology, 135(1-2), 1-41.

Selle, P. H., and Ravindran, V., 2008. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. Livest. Sci. 113, 99–122. doi: 10.1016/j.livsci.2007.05.014

Selle, P. H., Ravindran, V., Caldwell, A., Bryden, W. L., 2000. Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. Nutrition Research Reviews, 13(2), 255-278.

Sheldon, R. A. and van Pelt, S., 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. Chemical Sharma, N., Angural, S., Rana, M., Puri, N., Kondepudi, K. K., Gupta, N., 2020. Phytase producing lactic acid bacteria: Cell factories for enhancing micronutrient bioavailability of phytate rich foods. *Trends in Food Science & Technology*, *96*, 1-12.

Sheldon, R.A., 2007. Enzyme immobilisation: the quest for optimum performance. Adv Synth Catal., Vol.349; pp.1289–1307.

Simell, M., Turunen, M., Piironen, J., Vaara, T., 1989. Feed and food applications of phytase. Lecture at 3rd Meet. Industrial Applications of Enzymes, Barcelona, Spain, 33-38.

Singh, B. and Satyanarayana, T., 2015. Fungal phytases: characteristics and amelioration of nutritional quality and growth of non-ruminants. Journal of animal physiology and animal nutrition, 99(4), 646-660.

Singh, R. S., Singh, T., Pandey, A., 2019. Microbial enzymes—an overview. Advances in Enzyme Technology, 1-40.

Sinha Ray, S., 2013. Techniques for characterizing the structure and properties of polymer nanocomposites. Environmentally Friendly Polymer Nanocomposites, 74–88.

Smijs, T. G., Pavel, S., 2011. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. Nanotechnology, science and applications, 4, 95.

Smith, S. J., 2007. "Circuit reconstruction tools today", Current Opinion in Neurobiology, 17, 601–608.

Songré-Ouattara, L. T., Mouquet-Rivier, C., Icard-Vernière, C., Humblot, C., Diawara, B., Guyot, J. P., 2008. Enzyme activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel (ben-saalga) of functional interest in nutrition. *International journal of food microbiology*, *128*(2), 395-400.

Sosnowska, M. E., Jankiewicz, U., Kutwin, M., Chwalibog, A., Gałązka, A., 2018. Influence of salts and metal nanoparticles on the activity and thermal stability of a recombinant chitinase from Stenotrophomonas maltophilia N4. Enzyme and microbial technology, 116, 6-15.

Sönmez, Z., 2016. Ebişke (Clitocybe geotropa) Mantarından Saflaştırılıp Karakterize Edilen Endo-Beta 1,4-Mannanaz Enziminin, Magnetik Kitosan Nanopartiküller Üzerine İmmobilize Edilmesi Ve Meyve Sularının Durultma İşleminde Kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Sureshkumar, M. and Lee, C. K., 2011. Polydopamine coated magnetic-chitin (MCT) particles as a new matrix for enzyme immobilization. Carbohydrate Polymers, 84, 775e780.

Suryawanshi, R. K., Jana, U. K., Prajapati, B. P., Kango, N., 2019. Immobilization of *Aspergillus quadrilineatus* RSNK-1 multi-enzymatic system for fruit juice treatment and mannooligosaccharide generation. *Food chemistry*, *289*, 95-102.

Sümengen, M., 2011. Laktik Asit Bakterilerinden Fitaz Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanakları. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Şabahat, S., 2019. Termofilik *Bacillus licheniformis* Bakterisinden Fitaz Enzim Üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.

Şenol, M., 2014. P. Fluorescens ve B. Subtilis Bakterilerinin F. Culmorum'a Karşı Antifungal Etkinliği, Bakterilerden Elde Edilen Kitinaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması Ve Bazı

Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Takeda, N., Hirasawa, K., Uchimura, K., Nogi, Y., Hatada, Y., Usami, R., Yoshida, Y., Grant, W. D., Ito, S., Horikoshi, K., 2004. Purification and enzymatic properties of a highly alkaline mannanase from alkaliphilic Bacillus sp. strain JAMB-750. J Biol Macromol, 4, 67-74.

Telefoncu, A., 1997, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

Tolay, İ., Aytaç, Z., Gülmezoğlu, N., Budak, Z., Kınacı, G., Kınacı, E., 2005. Tahıllarda fitik asit içeriği ve beslenme açısından önemi. Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, 5-9.

Vaghari, H., Jafarizadeh-Malmiri, H., Mohammadlou, M., Berenjian, A., Anarjan, N., Jafari, N., Nasiri, S., 2016. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. Biotechnology letters, 38(2), 223-233.

Van Beilen, J. B. and Li, Z., 2002. Enzyme technology: an overview. Current Opinion in biotechnology, 13(4), 338-344.

Van de Velde, F., Lourenço, N. D., Pinheiro, H. M., Bakker, M., 2002. Carrageenan: A food-grade and biocompatible support for immobilisation techniques. Advanced Synthesis & Catalysis, 344(8), 815-835.

Van Den Burg, B., 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. Current opinion in microbiology, 6(3), 213-218.

Van Zyl, W. H., Rose, S. H., Trollope, K., Görgens, J. F., 2010. Fungal β-mannanases: mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. Process Biochemistry, 45(8), 1203-1213.

Vats, P. and Banerjee, U. C., 2004. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. Enzyme and Microbial Technology, 35(1), 3-14.

Viveros, A., Centeno, C., Brenes, A., Canales, R., Lozano, A., 2000. Phytase and acid phosphatase activities in plant feedstuffs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(9), 4009-4013.

Vohra, A. and Satyanarayana, T., 2003. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. Critical reviews in biotechnology, 23(1), 29-60.

Wang, H., Huang, J., Wang, C., Li, D., Ding, L., Han, Y., 2011. Immobilization of glucose oxidase using CoFe2O4/SiO2 nanoparticles as carrier. Applied Surface Science, 257, 5739e5745.

Wang, Y., 2015. Discovery and investigation of glycoside hydrolase family 5 enzymes with potential use in biomass conversion. Doctoral thesis, KTH Royal Institute of Technology.

Wang, Y., Azhar, S., Gandini, R., Divne, C., Ezcurra, I., Aspeborg, H., 2015. Biochemical characterization of the novel endo-β-mannanase AtMan5-2 from Arabidopsis thaliana. Plant Sci. 241, 151–163. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.10. 002

Woyengo, T. A. and Nyachoti, C. M., 2011. Supplementation of phytase and carbohydrases to diets for poultry. Canadian Journal of Animal Science, 91(2), 177-192.

Yanke, L. J., Bae, H. D., Selinger, L. B., Cheng, K. J., 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. Microbiology, 144(6), 1565-1573.

Yao, M. Z., Zhang, Y. H., Lu, W. L., Hu, M. Q., Wang, W., Liang, A. H., 2011. Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. J. Appl. Microbiol. 112, 1–14. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05 181.x

Yatmaz, E., 2016. Mannanaz Üretimi ve Saflaştırılmasında Yeni Teknik ve Stratejilerin Denenmesi Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Akdeniz Üniversitesi.

Yetim, N. K., Özkan, E. H., Sarı, N., 2019. Polimerik Nanoküreler Üzerine Enzim İmmobilizasyonu ve Optimizasyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, *14*(1), 97-104.

Yin, L. J., Tai, H. M., Jiang, S. T., 2012. Characterization of mannanase from a novel mannanase-producing bacterium. *Journal of agricultural and food chemistry*, *60*(25), 6425-6431.

Zamudio, M., Gonzalez, A., Medina, J. A., 2001. Lactobacillus plantarum phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. *Letters in Applied Microbiology*, *32*(3), 181-184.

Zhang, G. Q., Wu, Y. Y., Ng, T. B., Chen, Q. J., Wang, H. X., 2013. A phytase characterized by relatively high pH tolerance and thermostability from the shiitake mushroom Lentinus edodes. BioMed research international.

Zhang, P. and Tan, W., 2001. Atomic force microscopy for the characterization of immobilized enzyme molecules on biosensor surfaces. Fresenius' journal of analytical chemistry, 369(3), 302-307.

Zhao, D., Zhang, X., Wang, Y., Na, J., Ping, W., Ge, J., 2020. Purification, biochemical and secondary structural characterisation of β-mannanase from Lactobacillus casei HDS-01 and juice clarification potential. *International journal of biological macromolecules*, *154*, 826-834.

Zhao, J., Shi, P., Luo, H., Yang, P., Zhao, H., Bai, Y., Yao, B., 2010. An acidophilic and acid-stable β-mannanase from Phialophora sp. P13 with high mannan hydrolysis activity under simulated gastric conditions. Journal of agricultural and food chemistry, 58(5), 3184-3190.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Şeyma ALIM
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Erzurum Anadolu Lisesi
Lisans:	Atatütk Üniversitesi /Ziraat fakültesi/ Gıda Mühendisliği Bölümü
Yüksek lisans:	Atatütk Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstütüsü/ Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı/Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilimdalı
Doktora:	-
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
-	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	
-	