

***LACTOBACILLUS PLANTARUM* BAKTERİSİNDEN
FİTAZ VE MANNANAZ ENZİMLERİNİN
KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI, BAZI KİNETİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE
NANOİDROKSİAPATİT'E İMMOBİLİZE EDİLMESİ**

Cem ÇELENKLİ

**Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı
Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ**

2015

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***LACTOBACILLUS PLANTARUM* BAKTERİSİNDEN FİTAZ VE
MANNANAZ ENZİMLERİNİN KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI, BAZI
KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE
NANOİDROKSİAPATİT'E İMMOBİLİZE EDİLMESİ**

Cem ÇELENKLİ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2015

Her hakkı saklıdır



TEZ ONAY FORMU

**LACTOBACILLUS PLANTARUM BAKTERİSİNDEN FİTAZ VE MANNANAZ
ENZİMLERİNİN KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI, BAZI KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ VE NANOİDROKSİAPATİT'E İMMOBİLİZE EDİLMESİ**

Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ danışmanlığında, Cem ÇELENKLİ tarafından hazırlanan bu çalışma, 17/06/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu** (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. M.Sinan TAŞPINAR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ

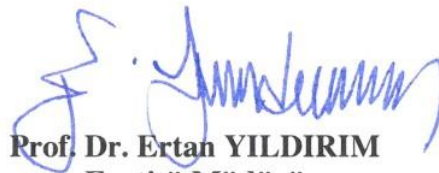
İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 25.06/2015 tarih ve 25. / 830... nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

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.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***LACTOBACILLUS PLANTARUM* BAKTERİSİNDEN FİTAZ VE MANNANAZ ENZİMLERİNİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI, BAZI KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE NANOHİDROKSİAPATİT'E İMMOBİLİZE EDİLMESİ**

Cem ÇELENKLİ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ

Bu çalışmada; *Lactobacillus plantarum* bakterisi kullanılarak, mısır (MSR) ve buğday (BGDY) bulunan doğal besiyeri ortamında serbest ve immobilize fitaz ve mannanaz enzimlerinin üretimi yapılmıştır. Bu amaçla farklı oranlarda MSR (10, 20, 30 ve 40 gr) ve BGDY (10, 15 ve 20 gr) ihtiva eden ortama, test bakterisi inoküle edildikten sonra büyüme koşulları olan pH 6-6,5 ve sıcaklık 35°C'de inkübasyona bırakıldı. Florisil destek materyaline öncelikle APTES ile -NH₂ grubu takıldı. Ardından glutaraldehit ile ara kolu oluşturuldu ve oluşan schiff bazı kararlı hale getirmek için sodium borhidrür ile indirgendi. Aktifleştirilmiş florisil destek materyali nano Fe₃O₄ bileşiği ile magnetik hale getirildi ve bakterilerin immobilizasyonu için kullanıldı. Hazırlanan bakteri magnetit florisilin nanopartiküllerine yaklaşık %50 oranında immobilize edildiği belirlendi. Fitaz ve mannanaz enzimlerinin üretimi ise hem serbest hem de matrikse bağlı mikroorganizmalar ile gerçekleştirildi. MSR ve BGDY doğal karbon kaynakları kullanılarak yapılan *L. plantarum* bakterisinin fitaz ve mannanaz enzimleri üretiminin, serbest haldeki izolatlara göre bağlı olanlarda yaklaşık %10-15 civarında bir artış gözlemlendi. Elde edilen bu bulgular ışığında manyetit florisil nanopartiküller bağlı test sonuçlarının gıda, ziraat, ilaç başta olmak üzere birçok endüstriyel alanda güvenle kullanılabileceği sonucuna varıldı.

2015, 53 sayfa

Anahtar Kelimeler: fitaz, mannanaz, *Lactobacillus plantarum*, immobilizasyon

ABSTRACT

MS Thesis

IMMOBILIZED OF LACTOBACILLUS PLANTARIUM ON TO MAGNETITE FLOROSIL NAOPARTICLES AND ITS' APPLICATION IN CO-PRODUCTION OF MANNANASE AND PHYTASE ENZYMES

Cem ÇELENKLİ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Enzyme And Microbial Biotechnology
Enzyme and Microbial Biotechnology Science

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Neslihan DİKBAŞ

In this study, production of the phytase and mannanase enzymes was carried out in a natural medium which includes corn (C) and wheat (W) using free and immobilized *Lactobacillus plantarum* bacterial strains. or this purpose the MS at different rates (10, 20, 30 and 40 g) and BGDY (10, 15 and 20 g) of medium containing the test after bacterium inoculation growth conditions with pH 6,0 to 6,5 and temperature of 35 C in incubation He was released. Florisil support material was attached to the first NH₂ group with APTES. Then he created the arm by glutaraldehyde and the resulting Schiff was reduced with sodium borohydride to make some decisive. Activated support materials nano florisil was made with Fe₃O₄ magnetic compound which was used for the immobilization of bacteria. About 50% of the prepared bacteria were determined immobilized magnetite nanoparticles florisil. The production of phytase and mannanase enzyme was performed with both free matrix dependent microorganisms. Of C and W natural carbon sources made using *L. plantarum* bacteria and mannanase enzymes of phytase production, an increase of approximately 10-15% of isolates are connected by loose observed. In light of these findings obtained food magnetite nanoparticles attached test results florisil, agriculture, confidence in many industrial fields, especially concluded that the drug was used.

2015, 53 pages

Keywords: phytase, mannanases, *Lactobacillus plantarum*, immobilization

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Bitirme tezi olarak sunduğum bu çalışmanın yürütülmesi esnasında her konuda yardımlarını ve desteğini gördüğüm, engin tecrübesinden yararlandığım saygıdeğer hocam Sayın Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ'a ve Sayın Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na minnetlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olup desteğini asla esirgemeyen aileme ve okul hayatım boyunca bana destek olan arkadaşlarıma şükranlarımı sunarım.

Cem ÇELENKLİ

Haziran, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimlerin Yapısal Özellikleri.....	2
1.2. Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler	4
1.2.1. Enzim konsantrasyonu	5
1.2.2. Substrat konsantrasyonu.....	5
1.2.3. Ortam pH'sı.....	6
1.2.4. Sıcaklık.....	6
1.2.5. Enzim inhibitörleri	7
1.2.5.a. Tersinir inhibitörler.....	8
1.2.5.b. Tersinmez inhibitörler	9
1.2.5.c. Allosterik inhibitörler	9
1.2.6. Aktivatörler	9
1.3. Enzimlerin Sınıflandırılmaları.....	10
1.4. İmmobilize Enzimler	11
1.4.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri	12
1.4.1.a. Kovalent bağlama	12
1.4.1.b. Çapraz bağlama	12
1.4.1.c. Adsorbsiyon.....	12
1.4.1.d. Tutuklama.....	12
1.4.1.e. Kapsülleme	13
1.5. Taşıyıcı	13
1.5.1. Taşıyıcıya bağlama yöntemleri	14
1.5.1.a. Kovalent bağlama	14
1.5.1.b. Adsorbsiyon.....	15

1.5.1.c. İyonik bağlama	16
1.5.1.d. Şelat bağlama	17
1.5.1.e. Çapraz bağlama yöntemi	17
1.5.1.f. Kopolimerizasyon yöntemi	18
1.5.1.g. Tutuklama yöntemleri	18
1.5.1.h. Mikrokapsülleme	19
1.6. Laktik Asit Bakterileri (LAB)	20
1.6.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	21
1.7. Besiyeri ve Tarihçesi	21
1.8. Fitaz ve Mannanaz	22
1.8.1. Fitaz ve fitik asit	22
1.8.1.a. Mikrobiyal fitazlar	22
1.8.2. Mannanaz	23
2. KAYNAK ÖZETLERİ	25
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER	30
3.1. Kullanılan Materyal ve Kimyasal Maddeler	30
3.1.1. Materyal	30
3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	30
3.1.3. Mannanaz ve fitaz enzimlerinin besiyerileri hazırlanması	32
3.2. Yöntemler	33
3.2.1. Mannnanaz enziminin aktivite ölçümü	33
3.2.2. Fitaz Enziminin Aktivite Ölçümü	33
3.2.3. Serbest ve immobilize bakteri sayısının tespiti	33
3.2.3. Florisilin akrilamin türevinin glutaraldehit ile aktifleştirilmesi ve schiff bazinin indirgenmesi	35
3.2.4. Nanomagnetit florosil nanopartiküllerin hazırlanması	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	38
4.1. Fitaz Bulguları	38
4.2. Mannanaz Bulguları	42
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	45
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	Adenozin Trifosfat
EC	Enzim Komisyonu
EI	Enzim-İnhibitör kompleksi
ES	Enzim-Substrat kompleksi
FDP	Fruktoz Di Fosfat yolu
HCl	Hidroklorik asit
HMF	Hegzos Mono Fosfat yolu
kDa	Kilo dalton
Km	Michaelis sabiti
MSR	Mısır
BGDY	Buğday
LAB	Laktik asit bakterileri
<i>Lact</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Leuc</i>	<i>Leuconostoc</i>
MRS	Man, Ragosa and Sharpe
Nm	Nanometre
rpm	Dakikada devir sayısı
sp.	Species (tür, tekil)
spp.	Species (tür, çoğul)
TCA	Trikloroasetik asit
UV	Ultraviyole
α	Alfa
β	Beta
m.o	Mikroorganizma
PACE	Polysaccharide analysis using carbohydrate gel electrophoresis
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enzimin yapısı	3
Şekil 1.2. Anahtar kilit modeli	3
Şekil 1.3. İndüklenmiş uyum modeli	4
Şekil 1.4. Enzim konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi	5
Şekil 1.5. Enzimatik tepkimelerde hız-substrat konsantrasyonu ilişkisi.....	5
Şekil 1.6. pH'nın enzim hızına etkisi	6
Şekil 1.7. Sıcaklığın enzim hızına etkisi	7
Şekil 1.8. İnhibitörlerin gruplandırılması.....	7
Şekil 1.9. İmmobilize enzimlerde tutuklama	13
Şekil 1.10. İmmobilize enzimlerde kapsülleme	13
Şekil 3.1. İnkübasyona bırakılan reaksiyon ortamları	32
Şekil 3.2. Florisil destek materyalinin 3-APTES ile aktive edilmesi	35
Şekil 3.3. Aktifleştirilmiş florisil desteğinin glutaraldehit ile reaksiyonu	36
Şekil 3.4. Aktifleştirilmiş florisil desteğinin glutaraldehit ile reaksiyonu sonucu oluşan Schiff bazının indirgenmesi	36
Şekil 3.5. Aktifleştirilmiş florisil desteğinin nano Fe ₃ O ₄ ile kaplanması.....	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. İmmobilize enzimin doğal (serbest) enzime üstünlükleri.....	11
Çizelge 1.2. Kullanılacak taşıyıcıda aranan nitelikler	14
Çizelge 1.3. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar.....	14
Çizelge 1.4. Kovalent bağlanma reaksiyonları	15
Çizelge 1.5. Çapraz bağlama ile enzim immobilizasyonu yöntemleri.....	18
Çizelge 1.6. Mannanaz sınıflandırılması	24
Çizelge 3.1. Serbest ve immobilize <i>L. plantarum</i> 'a ait dilüsyon oranları ve bakteri sayıları.....	34
Çizelge 4.1. Fitaz enziminin <i>L. plantarum</i> tarafından üretiminin zamana bağlı değişimi.....	38
Çizelge 4.2. Mannanaz enziminin <i>L. plantarum</i> tarafından üretiminin zamana bağlı değişimi.....	42

1. GİRİŞ

Enzimler, canlı hücrelerde oluşan ve organizmadaki bütün reaksiyonların hızlı ve kolay bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizatörler olarak tanımlanmaktadır. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonlar diğer reaksiyonlara göre 10^{5-10} kat daha hızlı gerçekleşmektedir. Enzimler canlı organizmalar tarafından üretilen özel katalitik fonksiyonlara sahip olan protein yapılı moleküllerdir. Enzimler canlı organizmaların hayatsal faaliyetlerini gerçekleştirmeleri için gerekli birçok biyokimyasal reaksiyonda görev almaktadırlar. Bütün proteinlerde olduğu gibi enzimlerin de yapıtaşını aminoasitler oluşturmaktadır. Enzimleri diğer protein moleküllerinden ayıran en önemli özelliği, biyokimyasal reaksiyonları katalizleme özelliğidir ve bu fonksiyon sayesinde birçok çalışma alanında kullanılmaktadır (Wolfson *et al.* 2008).

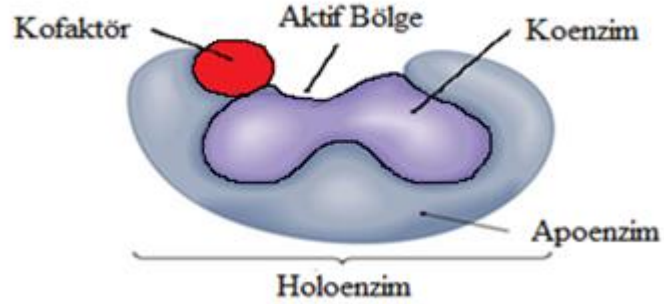
Günümüzde endüstri sektöründe kullanılan birçok enzim mikrobiyal kaynaklıdır. Bu sebeple endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımı yaygınlaşmıştır (Demain and Solomon 1981). Bunun başlıca sebebi mikroorganizma kökenli enzimlerin bitkisel ve hayvansal kökenli enzimlere göre katalitik aktivitelerinin daha yüksek olmaları, çok daha fazla miktarda üretilibilmeleri, istenilmeyen yan ürün veya ürünler oluşturmamaları ve maliyetinin ucuz olmasıdır (Wiseman 1987). Mikroorganizmalar sadece enzim üretme fonksiyonuna göre değil aynı zamanda toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmektedirler (Demain and Solomon 1981).

Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen enzimler ekstraselüler ve intraselüler enzimler olmak üzere 2 farklı gruba ayrılmıştır. Ekstraselüler enzimler; besiyeri ve hücre yapılarının dış kısmı ile bağlantılı enzimler olup ortamda bulunan polimer molekül ağırlıklı besin maddelerini parçalayarak monomer forma dönüştürmektedirler. Bu enzimler genel olarak hidrolazlar olarak tanımlanmaktadır (Madsen *et al.* 1973). Gram negatif bakterilerde proteinler iç ve dış membran arasındaki periplazmik boşluk arasında kalmaktadırlar. Bunun nedeni gram-negatif bakteri duvarları bir dış membrana sahiptir. Gram-pozitif bakteriler ise bu membrana sahip değildir.

Gram-pozitif bakterilerde ise enzimler direkt olarak besiyerine salgılanmaktadır. İntraselüler enzimler sitoplazmaya dağılmış halde bulunan ribozomlarda sentezlenmektedirler. Genelde bu enzimlerin substratları şekerler, aminoasitler, karboksilik asit gibi küçük molekül ağırlığına sahip hücre zarından geçebilen monomer moleküllerdir. İntraselüler enzimlerin aksine ekstraselüler enzimlerin stabilitesi yüksek olduğundan çevre koşullarında aktivitelerini uzun süre sürdürebilmektedirler (John 1987; Furlan and Pant 2006). Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım oranları incelendiğinde; %25 alkalın proteaz, %21 diğér proteazlar, %18 amilaz, %10 renin, %3 lipaz, %3 tripsin, %10 diğér karbonhidrat parçalayan enzimler ve %10 analitik ve farmasötik enzimler olarak belirlenmiştir (Rao *et al.* 1998). Dünya genelindeki endüstriyel enzimlerin ticari pazar payına bakıldığında bu miktar yaklaşık 1,6 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir (Schallmeyer *et al.* 2004). Bu enzimlerin kullanım alanlarına göre dağılım oranına bakıldığında, %29'unun gıda endüstrisinde, %15'inin hayvan yemi sektöründe ve %56'sının ise genel amaçlı teknik alanlarda yer aldığı görölmektedir (Outtrup and Jorgensen 2002).

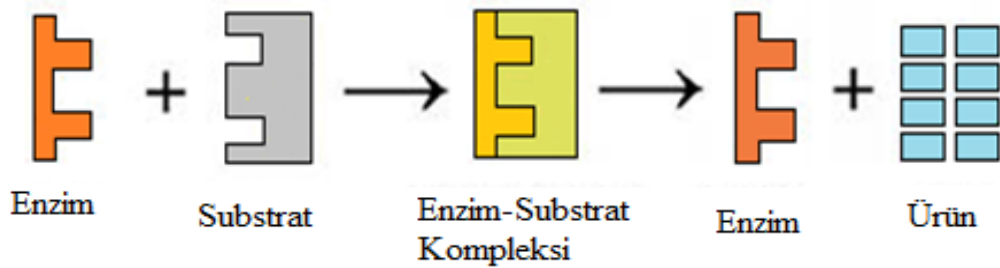
1.1. Enzimlerin Yapısal Özellikleri

Bazı enzimler yalnızca aminoasitlerin uç uca eklenmesiyle meydana gelen proteinlerden oluşmuştur. Bunlarda başka hiçbir yapıtaş bulunmaz. Bazı diğér enzimler ise aminoasitlerden başka gruplar bulundurabilir. Enzimlerin aktivite göstermeleri için gerekli olan ve genellikle metal iyonlarından oluşan yan gruplara “kofaktör” denilmektedir. Kofaktör bir metal iyonu olabildiğı gibi, “koenzim” denilen karmaşık bir organik bileşik olabilir. Bazen aktivite için ikisine birden gerek duyulabilir. Katalitik olarak aktif olan enzim-kofaktör yapısına “holoenzim”, kofaktörsüz enzime ise “apoenzim” adı verilmektedir. Kofaktörlü enzimlerin, organik bileşiklere veya metal iyonlarına karşı farklı derecelerde afiniteleri bulunmaktadır (Pandey and Ramachandran 2006).



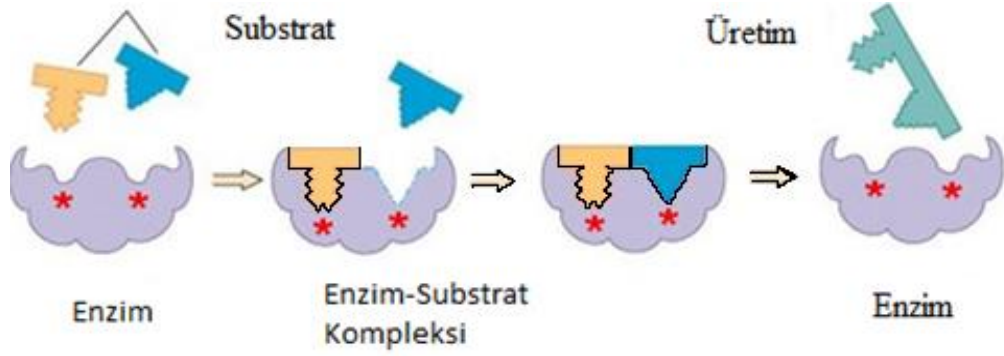
Şekil 1.1. Enzimin yapısı

Enzimlerin etki ettiği maddelere “substrat” denilmektedir. Reaksiyon sonunda oluşan maddeye “ürün” adı verilmektedir. Enzim ile substratın birbirine bağlanması ile ilgili 2 model ileri sürülmüştür. Bunlar; a) 1894’te Emil Fischer tarafından öne sürülen anahtar kilit modelinde, substratın enzimin aktif bölgesine bağlanırken yapısal olarak uygun şekilde anahtar kilit gibi birbirine bağlandığı kabul edilmektedir (MEGEP 2007).



Şekil 1.2. Anahtar kilit modeli

b) 1958’de Daniel Koshland tarafından öne sürülen indüklenmiş-uyum modelidir. Bu modelde enzim substratı bulunmadığında enzim serbest halde bulunmaktadır. Substrat varlığında, enzimin aktif merkezi biçimsel değişikliğe uğrayarak substrata uygun şekil almaktadır. Enzim substratına geçici olarak aktif bölgeden bağlanır ve substrat-enzim bileşiği (SE) oluşmaktadır. Daha sonra substrat ürüne veya ürünlere dönüşmektedir. Enzimler ise reaksiyondan değişmeden çıkar ve tekrar tekrar kullanılabilir (MEGEP 2007).



Şekil 1.3. İndüklenmiş uyum modeli

Enzimler, katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı yüksek derecede seçicidirler. Genel olarak tek bir kimyasal reaksiyonu veya aynı tip benzer reaksiyonları katalize etmektedir. Bu tip enzimlere “izoenzim” denilmektedir.

1.2. Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler

Enzimlerin aktivitesine yani kimyasal tepkimelerin hızını artıran veya azaltan pek çok fiziksel veya kimyasal faktörler bulunmaktadır. Bu faktörler; substrat konsantrasyonu, pH, sıcaklık, enzim konsantrasyonu, su aktivitesi, reaksiyon süresi, reaksiyon ürünleri, enzim inhibitörleri ve aktiviteleri, radyasyon, basınç, kaynama noktası ve ışık gibi çeşitli fiziksel etkiler şeklinde sıralanmaktadır.

Bir enzimatik reaksiyonda, reaksiyonun hızı belirtilen bu etkilerden değişik kademelerde etkilenmektedir. Ancak enzimatik reaksiyonlarda faktörler arası etkileşim de önemli olmaktadır. Örneğin bir enzimin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık değeri farklı ortam pH'larından etkilenecek değişiklik göstermektedir. Bu sebepten dolayı enzimatik reaksiyonlarda, ortam koşulları teker teker değil bir bütün halinde incelenmelidir. Enzim aktivitesini etkileyen önemli bazı faktörler aşağıda sıralanmıştır (MEGEP 2007).

1.2.1. Enzim konsantrasyonu

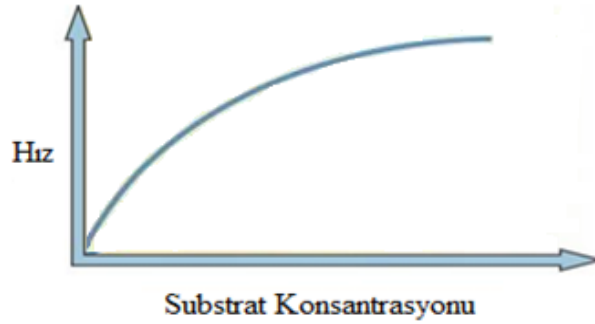
Enzim konsantrasyonunun enzim hızına etkisi, diğer koşullar sabitlendiğinde, doğrusal bir ilişki göstermektedir. Ortamda ne kadar çok enzim molekülü varsa ve çalışıyorsa, yeterli substrat olduğu sürece reaksiyon da devam edecektir (Fidancı 2009).



Şekil 1.4. Enzim konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi

1.2.2. Substrat konsantrasyonu

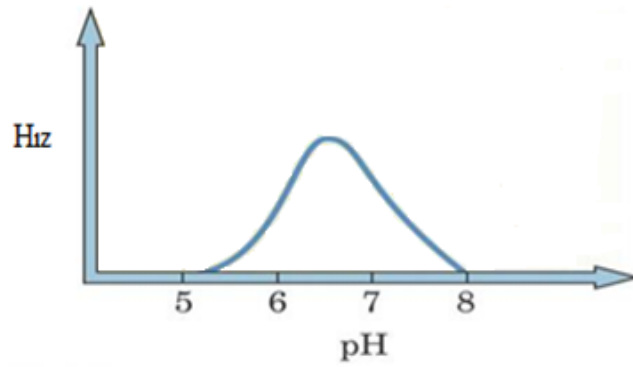
Enzim konsantrasyonu ve diğer faktörlerin sabit tutulduğu şartlarda, enzim hızı artan substrat miktarına bağlı olarak belli bir miktar artış göstermekte ve maksimum bir düzeye ulaştıktan sonra da sabit kalarak devam etmektedir (Gözükara 1990).



Şekil 1.5. Enzimatik tepkimelerde hız-substrat konsantrasyonu ilişkisi

1.2.3. Ortam pH'sı

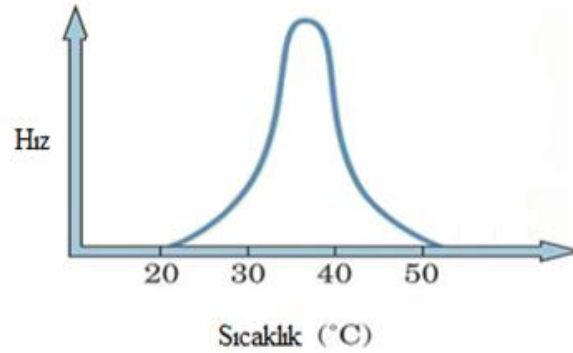
Ortam pH'sı enzimatik reaksiyonların büyük çoğunluğunda hızı etkileyen önemli bir faktördür. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH'ya o enzimin optimum pH'sı yani en uygun değeri denilmektedir. Yapılan akademik çalışmalara göre enzimlerin optimum pH'ları 2.0-10.0 değer aralığında değişmektedir (Fidancı 2009).



Şekil 1.6. pH'nın enzim hızına etkisi

1.2.4. Sıcaklık

Enzimlerin hızını ve stabilitesini etkileyen bir diğer önemli faktör ise sıcaklıktır. Aktiviteyi etkileyen bütün diğer koşulların sabit olduğu durumlarda bile reaksiyon ortamının sıcaklığı arttıkça reaksiyon hızı belirli bir noktaya kadar yükselmektedir. Bu ulaşılan değerden sonraki sıcaklık artışlarında enzim olumsuz etkilenmekte ve hızında ani düşüşler meydana gelmektedir. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri bu noktaya optimum yani en uygun sıcaklık değeri denilmektedir (MEGEP 2007).

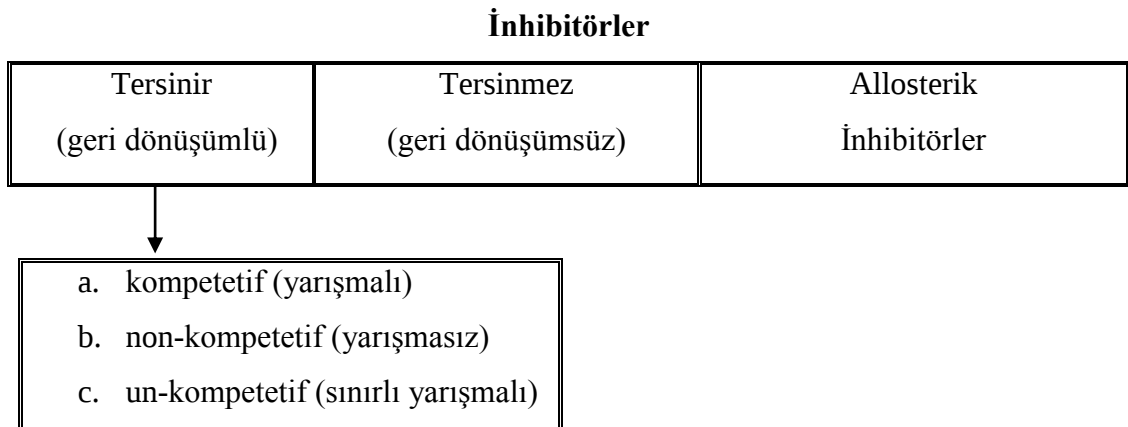


Şekil 1.7. Sıcaklığın enzim hızına etkisi

1.2.5. Enzim inhibitörleri

Reaksiyon ortamına eklendiğinde enzimin hızını düşüren doğal veya yapay kimyasal maddelere “enzim inhibitörleri” denir. Bu olaya ise “enzim inhibisyonu” adıyla tanımlanmaktadır. İnhibitörler; istenmeyen enzim aktivitesinin önlenmesinde veya kontrol altında tutulmasında aracı olarak kullanılmaktadır. Siyanür, kurşun, civa gibi ağır metal iyonları inhibitör maddelere örnek gösterilmektedir.

Enzim inhibitörleri 3 grupta incelenmektedir. Bunlar; tersinir-geri dönüşümlü, tersinmez-geri dönüşümsüz ve allosterik inhibitörler olarak gruplandırılmaktadır (Fidancı 2006).



Şekil 1.8. İnhibitörlerin gruplandırılması

1.2.5.a. Tersinir inhibitörler

Tersinir inhibitörler enzimle kısa bir süre zarfında kovalent olmayan, difüzyon kontrollü denge kompleksleri yaparlar ve oluşan bu kompleksler diyaliz veya jel filtrasyonu gibi işlemlerle kolayca ayrılabilir. Bu ayrılma sonucunda enzim tekrar aktif şekline dönüşebilmekte ve tekrar kullanılabilir.

a. Kompetitif (yarışmalı) İnhibitörler

Kompetitif inhibisyonda inhibitörün yapısı substrata benzemektedir ve enzimin aktif merkezi için inhibitör ve substrat birbiriyle yarışmaktadır. Aşırı substrat inhibisyonu ve ürün inhibisyonu da bir tür kompetitif inhibisyonudur. Kompetitif inhibisyon Michaelis-Menten teorisi ile kantitatif olarak belirlenebilmektedir. Kompetitif inhibisyonda enzimin inhibitör ile bağlanması tersinirdir, substrat konsantrasyonunun artması ile bu ilişki zayıflayıp kopabilmektedir. Bu tür inhibisyonda maksimum hız değişmemektedir fakat K_m değeri artmaktadır (Lehninger 1988)

b. Non-kompetitif (yarışmasız) inhibitörler

Nonkompetitif inhibisyonda, inhibitörün yapısı substrata benzememektedir. İnhibitör enzimin aktif yerinin dışında bir noktaya bağlanarak enzimi inhibe etmektedir. Dolayısıyla substratın enzime bağlanmasını etkilemezken substratın enzime bağlanmasıyla oluşan enzim-substrat kompleksinin ürün ve enzime ayrılmasını önlemektedir. Bu tür inhibisyonda enzim-substrat reaksiyonunun hızında azalma meydana gelmektedir. Dolayısıyla V_{max} değerini belirgin olarak azalma olurken, K_m değeri üzerine hiçbir etkisi olmamaktadır ve K_m değeri ise değişmemektedir (Fidancı 2006)

c. Un-kompetitif (sınırlı yarışmalı) inhibitörler

İnhibitör serbest enzime değil enzim-substrat kompleksine bağlanmaktadır. Un-kompetitif inhibüsyonda V_{max} ve K_m değeri değişmektedir. Un-kompetitif inhibisyon sonucunda V_{max} değeri azalırken K_m değeri ise küçülmektedir (Aras ve Erşen 1988)

1.2.5.b. Tersinmez inhibitörler

Geri dönüşümsüz inhibitörler enzime kovalent bağlarla bağlandığı için EI kompleksinden tekrar serbest enzime dönüş veya ürün oluşumu söz konusu değildir. Bu sebepten ürün sadece ortamda serbest enzimle birleşebilen substrat üzerinden olmaktadır. İnhibitörün enzime bağlanması aktif merkez ya da başka bir bölgeden gerçekleşmektedir. Geri dönüşümsüz inhibitörlere örnek olarak; ağır metal iyonlar, oksidan maddeler, hidroksil amin gösterilmektedir (Gözükara 1990)

1.2.5.c. Allosterik inhibitörler

Allosterik inhibitörler yapısında aktif bölge dışında modifikatör adı verilen başka bir bölge daha bulundurmaktadır. Allosterik inhibitörler enzimlerin modifikatör adı verilen bölgesine bağlanmaktadır. Bu bağlanma sonucunda, enzimin aktif merkezinde substratın bağlanmasına olanak tanımayan şekilsel bir değişiklik meydana gelir ve bunun sonucunda ES kompleksi oluşmamaktadır.

1.2.6. Aktivatörler

Bir enzimin etkisini artıran maddelere bu enzimin aktivatörleri veya akselatörleri denilmektedir. Bu aktivatör veya akselatörler çoğunlukla inorganik iyonlardan bazen de organik gruplardan oluşmaktadır. Bu aktivatörler genellikle metal iyonlarını kapsamaktadır. Bunlar kofaktörler gibi kataliz olaylarına her zaman katılmamaktadırlar.

Aktivatörlerin bir kısmı sadece substratla, diğer bir kısmı ise enzimle birleşerek aktivatör rolü oynamaktadır.

Yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir ki; enzimle birleşen aktivatörler küçük metal iyonlarıdır. Bunlara örnek olarak; klor, mangan, magnezyum gibi iyonlar gösterilmektedir.

1.3. Enzimlerin Sınıflandırılmaları

Çoğu enzim kendisini niteleyen substratının sonuna “-az” eki eklenmesiyle adlandırılmaktadır. Örneğin üreaz, ürenin hidrolizini katalizleyen enzimdir. Bununla beraber bazı diğer enzimler (tripsin ve kimotripsin) kendi substratlarını belirtmeyen özel isimlere sahiptir.

Enzim isimlerini mantıklı ve evrensel hale getirmek üzere 1995 yılında Brüksel’de “Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu” tarafından enzim adlandırma sistemi kabul edilmiştir. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliğinin 2006 yılında yayınladığı bildirime göre dünyada tespit edilen 3196 farklı enzim türünün olduğu belirlenmiştir (Anonim 2006).

Bu sisteme göre bütün enzimler katalizledikleri tepkimenin tipine ve şekline göre 6 farklı gruba ayrılmıştır. Bunlar:

- I. Oksidoredüktazlar:** Oksidasyon-redüksiyon tepkimelerini sağlayan enzimlerdir.
- II. Transferazlar:** Radikallerin veya fonksiyonel grupların transfer tepkimelerini sağlayan enzimlerdir.
- III. Hidrolazlar:** Substratın yapısına göre; ester, eter, peptid vb. bağlarda hidrolitik parçalanmayı katalize ederler.
- IV. Liyazlar:** Substrattan bazı grupları hidrolitik olmayan mekanizmalarla ayıran enzimlerdir.
- V. İzomerazlar:** Bu enzimler substratların izomerizasyonunu katalize etmektedirler.

VI. Ligazlar: İki metabolitin bağlanmasını katalize ederek daha büyük bir molekülün oluşmasını sağlayan enzimlerdir.

Sistemik adlandırma sisteminde her enzime enzim komisyonu (EC) tarafından dört rakamlı kod numarası ve katalizlediği reaksiyonu tanıtan sistemik ad verilmektedir (MEGEP 2007).

1.4. İmmobilize Enzimler

Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıyla kimyasal veya fiziksel olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün verebilen bir kopolimerizasyonla enzim molekülüne monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerle tutuklanarak immobilize edilmektedirler (Telefoncu 1997).

Çizelge 1.1. İmmobilize enzimin doğal (serbest) enzime üstünlükleri

- Reaksiyon sonunda ortamdan hızlı ve kolayca uzaklaştırılabilir,
- Çevre koşullarına karşı çok daha dayanıklıdır,
- Birçok kez ve uzunca bir süre zarfında kullanılabilir,
- Sürekli işlemlerde uygulanabilir yapıya sahiptir,
- Doğal enzime kıyasla daha kararlı yapıdadır,
- Ürün veya ürünlerin oluşumu kontrol altında tutulabilir,
- Birbirini takip eden sürekli reaksiyonlar için uygundur,
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir,
- Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı düşüktür,
- Mekanistik çalışmalar için uygundur.

1.4.1. Enzim immobilizasyon yöntemleri

1.4.1.a. Kovalent bağlama

İmmobilize enzimler kimyasal olarak kovalent bağlarla bağlanmaktadır. Bağlandıkları taşıyıcılar genellikle; selüloz, sefadeks, poliakrilamid, agaroz, porlu seramik gibi maddelerdir. Bu maddelerin en belirgin özelliği suda çözünmeyen yapıya sahip taşıyıcılar olmalarıdır.

1.4.1.b. Çapraz bağlama

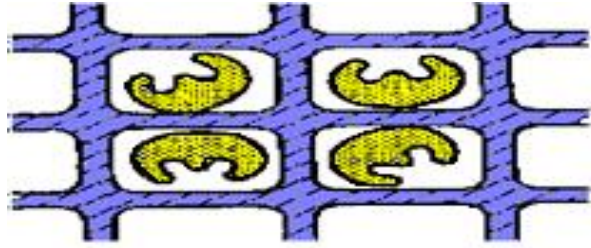
Enzimler alifatik diaminler, glutaraldehit gibi bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanmaktadır. Bu reaktifler enzim molekülleri arasında bağ oluşturmaktadır. Glutaraldehit; enzim moleküllerinin amino gruplarına çapraz bağlanırken, diaminler ise karboksil gruplarına çapraz bağlanmaktadır.

1.4.1.c. Adsorbsiyon

Enzim moleküllerinin taşıyıcıların yüzeyine adsorblanmaları metoduna dayanmaktadır. Bu metod çok kolay bir yöntemdir. Metoda kullanılan taşıyıcılar; agaroz, sefadeks türevleri, selüloz türevleri, metal tuzları ve mineraller adsorban olarak kullanılmaktadır.

1.4.1.d. Tutuklama

Enzimler yapay veya doğal polimer kafesleri içinde tutuklanırlar gösterilmiştir (Şekil 1.9). Polimer kafesler içine substrat girerken ürün dışarı çıkmaktadır. Bu metotta kullanılan taşıyıcılar; çapraz bağlı poliakrilamid jeller, Ca alginat, kappa karragenan örnek olarak verilebilmektedir.



Tutuklama

Şekil 1.9. İmmobilize enzimlerde tutuklama

1.4.1.e. Kapsülleme

Enzimler çeşitli tiplerde bulunan membranlar içine alınmaktadır (Şekil 1.10). Bu membranlar yarı geçirgen özelliğe sahiptir. Yalnızca düşük molekül ağırlığına sahip substratı ve molekülleri geçirmektedirler. Mikrokapsüllemeye en fazla hegzametilen diamin kullanılmaktadır. Ayrıca bu yöntemlerin kombinasyonları da bulunmaktadır, bunlar; tutuklama-çapraz bağlama, kapsülleme-çapraz bağlama gibi yöntemlerdir.



Kapsülleme

Şekil 1.10. İmmobilize enzimlerde kapsülleme

1.5. Taşıyıcı

Enzim immobilizasyonunda doğal ve sentetik yapıda birçok inorganik ve organik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen formda katı veya polimer yapıda olabilir.

Çizelge 1.2. Kullanılacak taşıyıcıda aranan nitelikler

- Hidrofilik karakter, - Suda çözünmeme, - Gözenekli yapı, - Mekanik stabilite ve uygun parçacık formu, - Reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşınmalı,	- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik, - Ucuzluk, - Zehirsizlik, - Rejenere olabilme,
--	---

Çizelge 1.3. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar

- Anorganik - Kıl, cam - Silikajel - Bentonit - Hidroksiapatik - Zirkonyum dioksit - Nikel oksit - Pomza taşı - Aktif karbon - Albümin	- Doğal Polimerler - Selüloz - Nişasta - Dekstra - Agar ve agaroz - Karragenan - Kollogen - Kitin ve kitozan - Jelatin - İpek	- Sentetik Polimerler - Polistiren türevleri - Poliakrilamid - Naylon - Vinil ve alil polimerler - Oxsironlar - Metakrilat - İyon değiştirici reçineler - Metaller - Metal oksitler
---	--	--

1.5.1. Taşıyıcıya bağlama yöntemleri

Taşıyıcıya bağlama yönteminde protein yapısına sahip olan enzim molekülünden yararlanılmaktadır. Molekül yüzeyindeki iyonik gruplar, fonksiyonel gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlama yönteminde rol almaktadır.

1.5.1.a. Kovalent bağlama

Enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent bağlanması genellikle sulu ortamda gerçekleşmektedir. Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilmesi gereken

önemli etken, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu olan gruplar üzerinden yapılmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeniyle bu grupların rahatsız edilmemesidir. Taşıyıcıya kovalent bağlanma yöntemi, enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı özel gruplar üzerinden gerçekleşmektedir. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değil ise öncelikli olarak yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri gerekmektedir. İmmobilizasyon çok yumuşak koşullar altında gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı suda çözünmemeli fakat büyük ölçüde hibrofobik karakterli de olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik kararlılığa sahip olmalıdır.

Bu tür taşıyıcıların seçilmesinde enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmamasının yanında, taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizmanın çoğalmaması, pH ve çözgenlere karşı dayanıklı yapıda olması gibi özellikler bulundurulmalıdır.

Çizelge 1.4. Kovalent bağlanma reaksiyonları

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> a. Açilleme Reaksiyonları b. Alkilleme ve Arilleme Reaksiyonları c. Diazolaman Reaksiyonları d. Karbamilasyon ve Tiyokarbamilasyon Reaksiyonları e. CN-Br Yardımı ile Bağlama f. İmidoesterler ile Reaksiyonlar g. Polimerik Aldehidler ile Reaksiyonlar h. SH-Disülfid Değişimi Reaksiyonları i. Ugi Reaksiyonları j. Diğer Bağlanma Reaksiyonları |
|--|

1.5.1.b. Adsorbsiyon

Enzim immobilizasyonunda kullanılan en basit ve en eski yöntemdir. Enzim immobilizasyonunda çok fazla kullanıldığı bilinmektedir. Yöntem; yüzey aktif, suda

çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisiyle karıştırılması ve enzim fazlasının iyice yıkanarak uzaklaştırılması metoduna dayanmaktadır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Van der Waals kuvvetleridir. Adsorbanlar değişik yapılarda olmakla beraber iyi bir adsorpsiyon sağlayabilmek için çoğunlukla adsorbanın ön işleminden geçirilmesi gerekmektedir. Bu metotta en çok kullanılan adsorbanlar; aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, CaCO_3 , kül, kollodyum, bentonit, hidroksiapatit, silikajel, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfat olarak belirtilmiştir.

Enzimin suda çözünmeyen taşıyıcıda adsorpsiyonu bazı faktörlere bağlıdır. Bunlar; pH, çözgen, iyon şiddeti, enzim-adsorban oranı ve sıcaklık gibi faktörlerdir. Bu elementlerin araştırılması, adsorpsiyon ve aktivitenin önemli ölçüde geri kazanılması için en uygun koşulların belirlenmesi çok önemlidir. Adsorpsiyon işleminin mekanizması genellikle karmaşık olduğundan olasılıklardan hangisinin gerçekleşeceğini önceden belirlenmesi çok zordur. Metod olarak bir proteinin aktif yüzeylerde adsorpsiyonu tersinir bir işlem olması gerekmektedir. Fakat bazı durumlarda tersinir olmayan bir adsorpsiyon işlemi söz konusu olabilmektedir. Eğer aktivite değişmeden sabit kalabiliyor ve immobilize enzim sürekli işlemlerde kullanılabiliyorsa bu tür adsorpsiyon enzim immobilizasyonu için oldukça ideal bir durumdur.

1.5.1.c. İyonik bağlama

Bu yöntem, iyon değiştirme yeteneğine sahip olan ve suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlarla bağlanması metoduna dayanmaktadır. Bazı durumlarda iyonik bağlamaya ek olarak fiziksel adsorpsiyonda etkili olabilmektedir. İyonik bağlama yumuşak koşullarda gerçekleştiği için enzimin konformasyonunda ve aktif merkezinde herhangi bir değişikliğe neden olmamaktadır. Fakat enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından dolayı enzim kaçıışı olmaktadır.

1.5.1.d. Şelat bağlama

Bazı transizyon metallerinin şelat yapma özellikleri bulunmaktadır. Bu özellikleri sayesinde enzimlerin organik ve inorganik taşıyıcılara bağlanmasını mümkün kılmaktadır. Bu yöntem ilk kez 1971 yılında uygulanmış olup halen daha günümüzde kullanılmaya devam edilmektedir.

1. Biyospesifik bağlama

Enzimler, antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanılarak enzim immobilize edilmektedir. Lektinler çok özel karbonhidrat artıklarını içeren enzimlere kuvvetlice bağlanmaktadır. Örneğin bu yöntemle immobilize edilen invertaz, sakkarozun kesiksiz inversiyonunda kullanılmıştır. Spesifik monoklonal antikorları suda çözünmeyen materyale bağlayarak hazırlanan taşıyıcılar enzim immobilizasyonunda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

1.5.1.e. Çapraz bağlama yöntemi

Küçük molekül yapısına sahip tek veya çoklu fonksiyonel reaktifler, enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen karmaşık yapıların oluşmasını sağlamaktadır. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif yoğunluğuna, pH'sına ve immobilize edilecek enzimin karakterine bağlıdır. İntermoleküler bağlanmalar yanında intramoleküler bağlanmalarda görülmektedir.

Çizelge 1.5. Çapraz bağlama ile enzim immobilizasyonu yöntemleri

- a) Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,
- b) Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,
- c) Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaktif ile reaksiyonu,
- d) Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcıyla reaksiyonu,

Çapraz bağlama reaksiyonu yumuşak koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı görülmektedir. Çapraz bağlı enzimler mekanik bakımdan çok kararsız yapıya sahiptir ve şimdiye kadar yalnız immünolojik testlerde kullanılmışlardır.

1.5.1.f. Kopolimerizasyon yöntemi

Enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranır ve böylece polimer matrikse bağlanabilirler. Bu yöntem polimer matrikste tutuklama yöntemine benzemektedir. En önemli üstünlüğü ise enzim kaçışının önlenmiş olmasıdır.

1.5.1.g. Tutuklama yöntemleri

Prensip olarak tutuklama yöntemi enzim molekülünü belirli bir alanda hapsetme mantığına dayanmaktadır. Enzim bulunduğu çevrede hapsedilerek dışarıya çıkamamaktadır. Bu işlem polimer matriksteki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde miseller ve mikrokapsülleme ile de gerçekleşmektedir. Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamasıdır.

1. Polimer matrikste tutuklama

Polimerizasyon ve çapraz bağlanmanın olduğu ortamda enziminde bulunması halinde enzim çapraz bağlanma sonucu odacıklarda tutuklanmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamid'dir. Yöntem; yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması prosedürüne dayanmaktadır. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağlar arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiye geçmeleri önlenmektedir. Bu metodda en önemli husus çapraz bağ yüzdesidir. Bu oran öyle ayarlanmalıdır ki, enzim molekülleri tutuklanırken substrat moleküllerinin enzim moleküllerine ulaşması engellenmemelidir.

Bu yöntemle molekül ağırlığı 15.000'den büyük olan enzimlerin immobilizasyonları daha kolaydır. Bu tür immobilizasyon işlemi için en fazla kullanılan taşıyıcılar hidrofilik temele dayalı olan poliakrilamid jeli ve jel oluşturan polisakkaritlerdir. Ayrıca silikon lastiği ve silikajel de bu tür metodlarda kullanılmaktadır. Çapraz bağlı taşıyıcıların hazırlanmasında, çapraz ve monomer bağlayıcı reaktiflerin mol oranı çok önemlidir. Bu mol oranı bir yandan enzim moleküllerinin tutuklanacağı hücrelerin çapını etkilerken diğer yandan taşıyıcının fiziksel özelliklerinde önemli değişikliklere neden olmaktadır.

1.5.1.h. Mikrokapsülleme

Bu yöntemin temeli enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasına dayanmaktadır. Mikrokapsüllerin boyutu 1-1000 µL değer aralığında değişmektedir. Enzimler genellikle kimyasal mikrokapsüllemeyle immobilize edilmektedirler. Bu yöntem ikiye ayrılmaktadır. Bunlar; sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen membrana mikrokapsüllemedir. Sürekli mikrokapsüllerde çerçeve membran katı, süreksiz mikrokapsüllerde lipozomlar ise sıvı tabakadır. İmmobilizasyonda kullanılan çerçeve maddesi mutlaka yarı geçirgen yapıya sahip olmak zorunludur.

Ayrıca bu yarı geçirgen membranın gözenek çapları; substrat moleküllerinin kapsül içine girişine izin verirken ürün moleküllerinin dışarı çıkışına imkân verecek büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntem ile immobilize edilmiş enzim verimliliği o kadar yüksek seviyede olacaktır.

1.6. Laktik Asit Bakterileri (LAB)

Laktik asit bakterileri (LAB), gram-pozitif, fakültatif anaerob, *Sporolactobacillus inulinus* haricinde spor oluşturmeyan bakterileridir. Karbonhidrat fermantasyonu sırasında son ürün olarak laktik asit üretmektedirler. Bu bakteriler su ve toprakta hemen hemen hiç bulunmazken, cins ve türe göre süt ve süt ürünleri üretim yerlerinde, bitki ve bitki atıklarında, insan, hayvan ve diğer canlıların bağırsak sistemlerinde bulunmaktadır (Hofvendahl and Hahn-Hägerdal 2000).

LAB içerisinde sadece glikoz ve amonyum bulunan bir mineral besi ortamında gelişmemektedir. Bu bakteriler yalnızca şeker ve fermente edilebilir bileşiklerden enerji sağladıkları için bol miktarda şeker bulunan ortamlarda optimum gelişebilmektedirler. LAB biyosentetik yetenekleri kısıtlı olduğu için vitaminler, aminoasitler, pürinler, pirimidinlerin bulunduğu karmaşık besinlere gereksinim duymaktadırlar (Hayaloğlu ve Erginkaya 2001).

LAB, iki ayrı familyadan oluşmaktadır. Bunlar; *Streptococcaceae* familyasına ait *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* türlerini kapsarken, *Lactobacillaceae* familyasına ait *Lactobacillus* türlerini kapsamaktadır (Tunail ve Köşker 1989; Tekinşen ve Atasever 1994). LAB genellikle mezofilik bakteriler sınıfına girmektedir ancak 5°C gibi düşük ve 45°C gibi yüksek sıcaklıklarda gelişebilmektedirler. Bulgulara göre *Lactobacillus plantarum* bakterisinin en uygun aktivite gösterdikleri sıcaklık 30-35°C ve 4.0-4.5 pH aralığında gelişmektedirler (Caplice and Fitzgerald 1999).

1.6.1. *Lactobacillus plantarum*

L. plantarum çeşitli suşları bulunan gram pozitif bir bakteridir. Bu suşlar süt, et, sebze ve insan mide-bağırsak yolunda bulunmaktadır. Bu bakteri karbon kaynaklarını geniş bir yelpazade kullanabilen heterofermentatif grubunda tanımlanan bir bakteridir. Bulgulara göre bu bakteri 15-45°C sıcaklık aralığında ve 3.2 ve daha büyük pH değerlerinde gelişebilmektedir. Bu bakterilerin ana işlevleri hammaddelerde bulunan şekerin fermentatif dönüştürülmesidir (Orla and Jensen 1919).

L. plantarum fenotip olarak uçları yuvarlak çubuk şeklinde bir yapıya sahiptir. Bu bakterinin gram pozitif bakteriler arasında en yüksek peptidoglikan yoğunluğuna sahip olduğu bilinmektedir. Bu bakteri şekerler ve pirüvat yıkma yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. *L. plantarum* şekerler ve pirüvattan karbon alır ve yan ürün olarak alkol veya laktik asit oluşturmaktadır. *L. Plantarum* çoğunlukla probiyotik bir bakteri olarak tanımlanmıştır ve yaygın olarak bu sektörde kullanılmıştır (Bergey *et al*, 1923).

L. plantarum genotip olarak diğer laktik asit bakterilerinden daha büyük genomlara sahip olduğu bilinmektedir. Dairesel kromozom olarak yaklaşık 3.308.274 baz çifti içerdiği bilinmektedir. Kromozomundaki genel GC içeriği plasmidleri yüzde olarak daha düşük bir GC içeriğine sahip olma eğilimindedir. Bu oran 44,5% olarak gözlemlenmiştir.

1.7. Besiyeri ve Tarihçesi

Besiyerleri mikroorganizmaların gelişip çoğalabilmesi için hazırlanmış ve çeşitli bileşenleri içinde barındıran karmaşık ortam olarak adlandırılmaktadır. Bunlar, mikroorganizmaların çoğaltılması, saflaştırma, tanılama, sayım, izolasyon, duyarlılık testleri, sterilite testleri, gıda, su ve çevre kontrolleri, biyolojik ürünlerin elde edilmesi, antibiyotik ve vitamin analizleri, hayvansal ve bitkisel hastalık tanısında, endüstriyel analizler vb. gibi birçok farklı çalışmada kullanılmaktadır (Halkman 2005).

1.8. Fitaz ve Mannanaz Enzimleri

1.8.1. Fitaz ve fitik asit

1907 yılında kaynaklara geçen fitazın kimyasal adı myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase olarak bilinmektedir. Fitazlar enzimlerin fosfomonoesterazlar sınıfına dâhil edilmektedir. Fitik asitten sırayla fosfatın ayrılmasını veya fitatın indirgenmiş inositol fosfat esterlere ve inorganik fosfata parçalanmasını katalize etmektedir (Lei and Porres 2003; Konietzny and Greiner 2004). Fitazlar, genellikle 40-100 kDa moleküler ağırlığa sahiptir ve monomer yapıya sahip protein olarak değerlendirilmektedir. Geniş substrat spesifikliğı göstermektedir ve genellikle en uygun 4,5-6,0 pH aralığında ve 45-60°C sıcaklık aralığında çalışmaktadır. Fitazın kristal yapısı yapılan çalışmalar sonucunda 2,5 Å çözünürlükte tespit edilmiştir (Pandey *et al.* 2001).

Fitik asit kimyasal olarak myo-inositol halkası ve buna bağlı inorganik fosfattan oluşan bir ester asidi formuna sahiptir. Genel olarak tahıl, baklagil ve yağlı tohumlarda fosforun ana depo formu olarak bulunmaktadır. Kimyasal formülü, myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hekza-dihidrojen fosfat olarak kaynaklara geçmiştir. Moleküler formülü; $C_6H_{18}O_{24}P_6$ ve moleküler ağırlığı 660,04 g/mol olarak bulunmuştur (Kumar *et al.* 2010).

1.8.1.a. Mikrobiyal fitazlar

Fitazların en önemli mikrobiyal kaynaklarını mantarlar ve bakteriler oluşturmaktadır. İlk fitaz 1984 yılında mayadan elde edilmiştir (Nayini and Markakis 1984). Daha sonra birkaç maya suşunun fitatı hidroliz etme yeteneğı olduğu belirlenmiştir. Fitaz enzimleri bakteri, maya ve funguslardan karakterize edilmiş olup, günümüzde ticari olarak *Aspergillus* kullanılmaktadır. Günümüzde ticari amaçla üretilip kullanılan başlıca fitaz kaynakları *Aspergillus niger*, *A. ficuum*, *A. fumigatus*'dur (Wyss *et al.* 1999).

Maya fitazları arasında kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* özellikle ekmek yapımında geniş bir kullanım alanına sahiptir. Yüksek sıcaklık ve pH değerlerine dayanıklı olup

değişmeden sabit kaldığından dolayı bunun gibi fitazlar gıda endüstrisinde büyük kullanım alanına ve öneme sahiptir. Son zamanlarda yapılan çalışmalara göre; ekşi mayadan izole edilen laktik asit bakterilerinin büyük ölçüde fitat indirgeme yeteneğine sahip olduğu gözlemlenmiştir.

1.8.2. Mannanaz Enzimi

Mannanaz enzimi bakteri, mantar, bitki ve hayvanlardan saflaştırılmış bir enzimdir. Mikrobiyal mannanaz hücre dışına salınan bir enzimdir. Mannanaz enzimi geniş pH ve sıcaklık değerlerinde çalışabilmektedir. Bu sebepten dolayı; kâğıt hamuru, gıda, beslenme, petrol ve tekstil endüstrisi gibi sektörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mannanaz, mikrobiyal kaynaklardan çoğunlukla gram-pozitif ve *Bacillus* cinsine ait olan bakterilerden izole edilmiştir. Bazı gram-negatif bakterilerden de izole edildiği bilinmektedir. Mannanaz enziminin varlığı mantarlarda çoğunlukla *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Trichoderma* cinslerinde görülmüştür. Mannanaz, bir araya bağlanmış manon moleküllerden oluşmaktadır. Mannanaz; 3 gruba ayrılmaktadır. Bunlar; hemiselülozun ana bileşenlerinden olan β -mannanaz, β -mannosidaz ve β -glukosidaz'dır. Mannanaz, bir araya bağlanmış, manon moleküllerden oluşmaktadır (Schröder *et al.* 2009).

Çizelge 1.6. Mannanaz sınıflandırılması

<i>Enzim</i>	<i>Substrat</i>	<i>EC numarası</i>
Endo- β -1,4-mannanaz	β -1,4-mannan	3.2.1.78
Exo- β -1,4-mannosidaz	β -1,4-mannobioz	3.2.1.25
β -glukosidaz	β -D-glukopiranozit	3.2.1.21

Mikrobiyal mannanaz genellikle hücre dışına sentezlenen ve reaksiyonu yükselten bir enzimdir. Mannanazın üretimini etkileyen en önemli faktör ortam koşulları olarak belirlenmiştir. Bu faktörler; fiziksel koşullar, zaman, sıcaklık, pH, nitrojen, karbon kaynakları, mineral tuzlar ve oksijen oranı olarak belirtilmiştir. Mikrobiyal mannanaz farklı sıcaklıklarda aktivite göstermektedir ve bu sıcaklık aralığı 37-70°C olarak belirlenmiştir. Genel olarak bakteriyal mannanaz ile mantar mannanazı kıyaslandığında, bakteriyal mannanazlar yüksek sıcaklığa daha toleranslıdır (Aziz *et al.* 2008; Chauhan *et al.* 2012).

Mannanaz enzimi yüksek sıcaklık ve pH'da dayanıklı olduğundan en fazla kâğıt sektöründe kullanılmaktadır (Pan *et al.* 2011). Yine son zamanlarda; mannanaz enziminden deterjan, şampuanlar ve diş macunları, saç jelleri, sağlık ve güzellik bakım ürünleri, kontakt lens temizleyicileri ve sert yüzey temizleme gibi endüstriyel sektörlerde faydalanılmaktadır (Bettiol *et al.* 2000)

Mannanazın farmasötik uygulamalarda ve tıp alanında kullanımı her geçen gün önemini artırmaktadır. Özellikle kolay şekillendirme ve hızlı çözünme özelliğine sahip olduğundan dolayı ilaç tabletlerinin yapımında kullanılmaktadır. Ek olarak, idrar yolu hastalıkları tedavisi için mannoz formu hastalara önerilmektedir. Bu nedenlerden dolayı mannanaz enzimi çok yaygın kullanım alanına ve öneme sahip bir enzimdir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Zamudio *et al.* (2001), yapmış oldukları bir çalışmada, gıda fermantasyonları için uygun mikrobiyal fitazları doğal bitkisel kaynaklı laktik asit bakterilerinden izole ederek elde etmişlerdir. Fitaz aktivitesi, altı laktik asit bakterisi kültürü için değerlendirmişler. En yüksek aktivite *Lactobacillus plantarum* tarafından gözlemlenmiş olmalarına rağmen fitaz aktivitesini çok düşük bulmuşlardır. Fitat parçalayıcı enzim aktivitesi karakterizasyonu yaptıklarında, 52 kDa'lık bir molekül ağırlığında, 65°C'de ve pH 5.5 değerinde en uygun aktiviteye gösterdiği belirlemişlerdir.

Sümengen (2011), yaptığı bu çalışmada, fermente gıda ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus* sp. suşlarından fitaz enziminin izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirmiştir. Bu bakterilerin fitaz enzimi üretimi sodyum fitatlı besiyerinde 30°C'de 48 saatlik inkübasyondan sonra mikroorganizmaların etrafında oluşan şeffaf zonlarla saptamıştır. *Lactobacillus* sp. suşlarını değişik sıcaklık ve pH'larda geliştirerek fitaz enziminin ekstrasellüler ve intrasellüler aktivite sonuçlarını tespit etmiştir. Çalışmanın sonucuna göre, *Lactobacillus* sp. karakteristik özelliklerinden dolayı endüstriyel alanda kullanımının uygun olduğu önerilmiştir.

Sarıbuğra (2013), yapmış olduğu bu çalışmada *Lactobacillus* sp. suşlarından fitaz enzimi izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirmiştir. Suşların fitaz üretimi MRS ortamında 30°C'de 48 saat inkübasyondan sonra, kolonilerin etrafında oluşan zon üretimi ile belirlemiştir. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus*'dan üretilen enzimlerin maksimum aktiviteleri pH 6.0'da 167.3 EU/mL ve pH 5.0'de 163.1 EU/mL olarak belirlemiştir. Sonuçlara göre, *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus acidophilus* enzimleri sahip olduğu karakteristik özelliklerden dolayı endüstriyel alanda kullanıma uygun olduğu belirlemiştir.

Ekren (2013), yapmış olduğu bu çalışmada havadan ve topraktan izole edilmiş olan fungusların fitaz enzimi üretme kapasitesi açısından taramıştır. *Aspergillus niger* UA-D

suşunun en yüksek aktiviteye sahip olduğu saptamıştır. Maksimum aktivitesini pH 3.0 ve 70°C sergilediği bulmuştur. Enzimin geniş bir sıcaklık ve pH aralığında istikrarlı olduğu saptamıştır. Fitaz enziminin geniş bir substrat spesifikliğine sahip olduğu belirlemiştir. Sonuçlara göre enzimin katalitik merkezinde triptofan, sistein, serin ve arjinin rezidülerinin önemli rol oynadığı sonucuna varmıştır. Polihidrik alkollerden gliserol ve sorbitolün sıcaklık stabilitesini artırdığı ve organik çözücülerin ise enzim aktivitesini çok fazla etkilemediği belirlemiştir.

Erkan (2014), yapmış olduğu bu çalışmada doğal yeni bir mikrobiyal kaynaktan fitaz üretimi amaçlanmıştır. Mikroorganizma izolasyonu için ahır ve kümes çevrelerinden alınan 12 farklı toprak örneği kullanmıştır. İzolatlar arasında K12 kodlu izolatın en yüksek fitaz üreticisi olduğu saptamıştır. Üretim ortamında en uygun karbon kaynağının glukoz ve en uygun azot kaynağının ise amonyum nitrat olduğu tespit etmiştir. Glukoz, amonyum nitrat ve sodyum fitat varlığında 150 rpm çalkalama hızında, 72 saat 30°C'de inkübasyonun fitaz üretimi için en uygun koşul olduğu belirtmiştir. Optimize edilen üretim koşullarında elde edilen fitaz enzimi pH 6,5'da 60°C'de 1:9 enzim substrat oranında en yüksek aktivite gösterdiğini gözlemlemiştir.

Jiang *et al.* (2006), yapmış oldukları çalışmada karbon kaynağı olarak konjak toz üzerinde 50°C'de yetiştirilen izole edilmiş *Bacillus subtilis*'de mannanaz yüksek seviyede üretmişlerdir. Saflaştırılmış mannanaz yaklaşık %13.1 oranında bir karbohidrat içerikli peryodik asit-Schiff boyama ile bir glikoprotein olarak bir moleküler kütleye sahip, SDS-PAGE jeli üzerinde tek bir protein bandı olarak ortaya çıkarmışlardır. Saflaştırılmış enzimin ilk 10 N-ucu amino asit sekansı β -mannanaz N-ucu bölgesi ile yüksek bir homoloji sergilemiştir (%90 oranında). Mannanaz aktivitesi için en uygun sıcaklık ve pH, sırasıyla, 65°C ve pH 6.0 olarak belirlemişlerdir. Mannanaz keçiboynuzu zambında oldukça spesifik olduğunu, fakat nişasta ve huş ağacına karşı çok düşük aktivite sergilediğini gözlemlenmiştir. *B. subtilis*'ten saflaştırılmış β -mannanazın benzersiz özellikleri biyoteknolojik uygulamalar için çok cazip halde olduğu belirlemişlerdir.

Duruksu (2007), yapmış olduğu bu çalışmasında *Aspergillus fumigatus* küfünün hücre dışı endo-1,4- β -mannanaz geni klonlanmış ve *Aspergillus sojae* ve *Pichia pastoris* GS115'e aktarmıştır. Her iki ekspresyon sisteminde de yüksek oranda üretim sağlamıştır. %1 glikoz içeren YpSs ortamında üç günlük inkübasyon sonunda mannanaz üretimi *A. sojae*'de 204 U/mL'ye ulaştığını gözlemlemiştir. *P. pastoris* (PpT1)'de ise metanol ile uyarıldıktan 10 saat sonra en yüksek mannanaz aktivitesi 61 U/mL ölçülerek en yüksek değerine ulaştığını gözlemlemiştir. Her iki enzimin spesifik aktivitesi 349 U/mg protein, AsT1' de optimum pH ve sıcaklık yaklaşık 4.5 ve 45°C ve PpT1 'de ise 5.2-5.6 ve 60°C olarak bulmuştur. Keçi boynuzu sakızının mannanaz ile inkübasyonda glikoliz tarafından katalizlenen uzun veya nadir prebiyotik oligosakkarit üretimini olanak veren transglikozilasyon reaksiyonlarını gözlemlemiştir. Değişik karbon kaynakları üzerindeki hidrolitik aktivite ürünleri PACE ve MALDITOF ile analiz yapmıştır. Bu deney sonucuna göre heksamannoz ve daha küçük oligosakkaritler karakterize etmiştir.

Öztürk (2008), yapmış olduğu çalışmasında *Aspergillus fumigatus*'un keçi boynuzu bulunan ortamda endo-beta-1,4 mannanaz enzimini yüksek miktarda üretmeyi amaçlamıştır. Ancak bu mantar güvenli olmaması nedeni ile gıda endüstrisinde kullanılmadığı için *A. fumigatus* IMI385708'un endo-beta-1,4-mannanaz enzimini kodlayan geni, gıda uygulamalarında kullanımı güvenli olan *Aspergillus sojae* ATCC11906 mantarına laboratuvar ortamında klonlamıştır. Sonuç olarak sekiz transformant elde etmiştir. Bu transformantların bazılarının, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz promotör kontrolü altında ifade edilmesinden ve genin *Aspergillus niger*' in glikoamilaz sinyal ve pro-peptit bölgesine füzyonundan dolayı, enzimi daha fazla ürettiğini tespit etmiştir. Sonuç olarak 40 ünite mannanaz enzimi ile 48 saat boyunca hidroliz edilen keçi boynuzu gamından, başlıca mannotrioz, 6¹-galaktozil-beta-Dmannotrioz ve 6³,6⁴-di-alfa-galaktozil-beta-1,4-mannopentaoz oligosakkaritlerini elde etmiştir.

Blibech *et al.* (2009), yapmış oldukları bu çalışmada *Penicillium Occitania* Pol6 tarafından nişasta içeren ortam daha düşük enzim aktivitesi bulmalarına rağmen

keçiboynuzu tohumu içeren ortamda en yüksek oranda β -mannanaz etkinliğini gözlemlemişlerdir. Saflaştırılmış β -mannanaz 18 kDa'lık bir görünür moleküler kütleye sahip olan bir glikoprotein olarak tanımlamışlardır. 40°C ve pH 4.0 de aktif olduğunu tespit etmişlerdir. 70°C'de 30 dakika boyunca sabit ve geniş bir pH stabiliteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Keçiboynuzu çekirdeği sakızı ve Fildişi somunu mannan ile inkübasyon sırasında, enzim çoğunlukla manotrioz, manotrioz ve mannobiose çıkardığını gözlemlemişlerdir.

Chandra *et al.* (2011), yapmış oldukları çalışmada *Paenibacillus* sp. yeni bir karbon kaynağı olarak konjac kullanarak yetiştirdikleri DZ3 den β -mannanaz üretmişlerdir. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi ile tahmin edildiği üzere, moleküler kütlesi yaklaşık olarak 39 kDa belirlemişlerdir. Aktif bant Zimogram net renksiz alanı olarak gözlemlemişlerdir. Mannanaz aktivitesi için en uygun sıcaklık ve pH sırasıyla 60°C ve pH 5,0 olarak belirlemişlerdir. Mannanaz mantar tozu ile düşük etkinlik sergilerken, glukomannan ve galaktomannan ile oldukça spesifik olduğu gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlara göre mannanaz enziminin endüstriyel uygulamalar için ilgi çekici olduğunu ortaya koymuşlardır.

Akcan (2011), yaptığı bu çalışmasında *Bacillus licheniformis* bakterisinden alfa-amilaz enzimini daldırmalı fermentasyon yöntemini kullanarak hücre dışı üretimini göstermiştir. *Bacillus licheniformis* tarafından ekstraselüler α -amilaz üretimi üç kategoride; karbon, azot ve aminoasit kaynaklarına ait çeşitli besinler üzerindeki etkileri incelemiştir. Karbon kaynakları olarak şekerler, arabinoz, sukroz, mısır unu ve mısır nişastası desteklenen maksimum amilaz üretimi için incelemiştir. Kazein, sodyum nitrat, amonyum sülfat, amonyum klorür, amonyum nitrat en iyi organik kaynakları ve inorganik kaynakları sırasıyla incelemiştir. CuSO_4 , ZnSO_4 ve CuSO_4 'ün α -amilaz üretimini inhibe ettiği tespit etmiştir. Maksimum α -amilaz üretimi 37°C'de 72 saat içinde %0.01 L-sistein ihtiva eden bir ortam içinde elde edilmiştir.

Blibech *et al.* (2011), yapmış oldukları çalışmada bir beslemeli-kesikli stratejisi uygulayarak, *Penicillium occitania*'dan üretilen mannanaz enziminin üretiminin akasya

tohumunun bir parti kültivasyonu ile karşılaştırıldığında iki katına ıkarılabilirliği bulmuştur. Ayrıca, enzim faaliyetlerinin çalkalama şişesi fermantasyonuna kıyasla beslemeli-kesikli fermantasyon ile 10 kat kadar artış gösterdiği gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak bu çalışma indükleyici substrat olarak akasya tohumlarının tozu kullanılarak yüksek mannanaz üretimi elde ederek endüstriyel ölçekli kalkınma için kültür sürecinin uygunluğunu göstermişlerdir.

Trabelsi *et al.* (2013), yapmış oldukları bu çalışmada canlılığı ve antibakteriyel aktivite açısından, kaplama malzemesi olarak kitosan ve jelatin kullanarak aljinat *Lactobacillus plantarum*'un hareketsiz haldeki etkinliğini araştırmayı ve değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Canlılığı ve *L. plantarum* TN9 kültürleri önce ve aljinat, çitosan kaplı aljinat ve jelatin kaplı Aljinatta hareketsizleştirme sonra antibakteriyel aktivitesi incelemişlerdir. Bulgular doğrultusunda kapsüllenmiş olan *L. plantarum* yaşayabilirliğini 35 gün korumuş olduğunu ortaya koymuş ve jelatin kullanıldığında hiç bir olumsuz etki gözlemlemişlerdir. Bu kapsül içine soy gıda maddeleri ve yem endüstrisi bir katkı maddesi olarak, gelecekteki bir uygulama için potansiyel bir güçlü bir aday olarak kabul etmişlerdir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Materyal ve Kimyasal Maddeler

3.1.1. Materyal

Çalışmada sodyum sitrat, sodyum fitat, sodyum asetat, trikloroasetik asit, sülfirik asit, amonyum molibdat, demir sülfat, locust bean gum, dinitrosalisilik asid kullanılmıştır. Çalışma tamponu olarak; Sodyum asetat ($C_2H_3NaO_2$), Dipotasyum hidrojen fosfat (KH_2PO_4), Amonyum sitrat, Magnezyum sülfat ($MgSO_4$), Mangan sülfat ($MnSO_4$) kullanılmıştır. Besin maddesi olarak; Buğday unu ve Mısır unu kullanılmıştır. Bakteri olarak ise (CECT 748) *Lactobacillus plantarum* ATCC suşun'dan yararlanıldı.

3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Araştırma esnasında kullanılan çözeltiler, hazırlanma prosedürleri ve kullanıldıkları yerler aşağıda belirtilmiştir:

Mineral Tamponu; 5 g/L $C_2H_3NaO_2$, 2 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L Ammonium Citrate, 0,5 g/L $MgSO_4$, 0,05 g/L $MnSO_4$ 800 mL saf su içerisinde çözüldü ve pH 6,0-6,5 değer aralığında ayarlandıktan sonra son hacim 1 L'ye tamamlandı.

MRS Agar; Dehidre besiyeri 68,2 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir, otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav sonrası 45-50°C'a soğutulup, steril petri kutularına 2/3 oranında dökülür ve katılaşmaya bırakılır.

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

Sodyum Asetat Tamponu; 0,205 gr Sodyum Asetat tartılarak 200 mL saf suda çözüldü, pH'sı 5,5'e ayarlandı ve son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

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

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

Fitaz Substratı; 0,132 gr Sodyum Fitat tartılıp üzerine son hacim 100 mL olacak şekilde Sodyum Asetat tamponu ilave edilerek çözüldü.

DNSA Çözeltisi: 500 mL saf su içerisinde 5 gr DNSA, 0,25 gr Sodyum sülfat ve 5 gr NaOH, çözüldükten sonra son hacim 1 L'ye tamamlandı.

Renklendirme Çözeltisi; Çözelti a; 5,73 mL Sülfirik Asit 93,7 mL saf su içerisine eklenerek karıştırıldı.

Çözelti b; 2,5 gr Amonyum Molibdat tartılarak uygun miktardaki A çözeltisi içerisinde çözüldü ve son hacim a çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlandı.

Çözeltisi c; 2,5 gr Demir Sülfat uygun oranda saf su içerisinde çözüldü ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Daha sonra içerisine 1-2 damla Sülfirik Asit eklendi.

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

3.1.3. Mannanaz ve fitaz enzimlerinin besiyerileri hazırlanması

10 gr Mısır bulunan 3 farklı reaksiyon ortamlarına sırasıyla 10, 15 ve 20 gr buğday kullanılmıştır. Karbon kaynakları g/L oranına göre tartılarak steril petri kaplarına yayıldı ve bu petri kapları steril kabin içerisinde 24 saat UV ışığında bekletilerek kısmi sterilizasyonu sağlandı. Reaksiyonda kullanılacak erlenlere 100'er mL mineral madde ve miktara göre tartılan karbon kaynakları eklendi. Sonra inkübasyona bırakılan bakterilerden steril kabin içerisinde bir öze dolusu alınarak erlenlere inoküle edildi. Daha sonra bu erlenler 35°C'deki etüvde 5 gün boyunca inkübasyona bırakıldı.

Aynı prosedür 20 gr, 30 gr ve 40 gr mısır kullanarak gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. İnkübasyona bırakılan reaksiyon ortamları

3.2. Yöntemler

3.2.1. Mannnanaz enziminin aktivite ölçümü

Mannanazın enziminin aktivitesini ölçmek için DNSA metodu kullanılmıştır. Reaksiyon ortamından 0,25 μL numuneden alınarak steril tüpe aktarıldı. Üzerine 0,75 μL saf su eklendi ve hacim 1 μL 'ye tamamlandı. Daha sonra prosedür gereği ortama substrat ilave edildi ve 10 dakika 50°C'ye ayarlı su banyosunda bekletildi. Ardından DNSA eklenip tekrar 5 dk 90°C'deki su banyosunda bekletilmiştir.

Mannanaz enziminin absorbans değişimi 540 nm spektrofotometrik olarak belirlendi. 5 gün boyunca 6 saat aralıklarla mannanaz aktivitesi ölçüldü. Deneyde kör olarak saf su kullanılmıştır.

3.2.2. Fitaz Enziminin Aktivite Ölçümü

Reaksiyon ortamından 0,25 μL numuneden alındı ve steril tüpe aktarıldı. Üzerine 0,75 μL saf su eklendi. Daha sonra ortama substrat ilave edildi ve 10 dakika boyunca 50°C'ye ayarlı su banyosunda bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için Trikloroasetik asit (TCA) eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Daha sonra üzerine renklendirme çözeltisi eklendi ve 3200 rpm de 10 dk santrifüj yapıldı.

Tüplerdeki süpernatant alınarak üzerine 2 μL saf su eklendikten sonra absorbans değişimi 700 nm spektrofotometrik olarak belirlendi. 5 gün boyunca 6 saat aralıklarla fitaz aktivitesi ölçüldü. Deneyde kör olarak saf su kullanıldı.

3.2.3. Serbest ve immobilize bakteri sayısının tespiti

Lactobacillus plantarum bakterisi MRS Agar besiyerine ekildi ve 35°C'de, 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda petrilere bir öze dolusu bakteri

alınarak 1 μL saf su içeren steril tüpe aktarıldı. Tüpe 2 μL saf su eklenerek toplam hacmi 3mL'ye tamamlandı. 30-40 sn vortexlendikten sonra 3200 rpmde 10 dk santrifüj yapıldı. Sonra seri dilüsyonları yapıldı ve bakteriler petri kaplarına ekildi. Petri kapları 35°C'de, 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı ve daha sonra kültürel sayım işlemi yapıldı.

İmmobilize edilmiş bakteri sayısının belirlenmesi için; Bakteri öncelikle magnetit florosil nanopartikülü üzerine immobilize edildi. Bu amaçla; 0,1 g magnetit florosil nanopartikülü tartıldı ve üzerine 1000 μL ön kültür, 2000 μL distile su ilave edildi. Sonra içinde nanaopartikül ve bakteri bulunan ependorf tüpü alınarak 35°C'ye ayarlı çalkalayıcıda, 60 dakika süre ile inkübe edildi ve böylece bakterilerin magnetit florosil nanopartiküllerine bağlanması sağlandı. Aynı işlemler diğer bakteri içinde tekrarlandı.

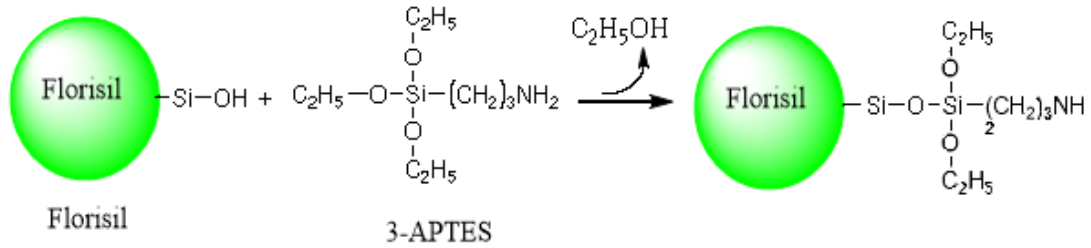
Bağlanmış olan bakteri miktarını belirlemek amacıyla; içerisinde nanopartikül bulunan tüplerin üst fazı alınarak atıldı, alt fazı ise su ile birkaç kez pipetajlama ile yıkandı ve 1000 μL steril saf su ile yeniden homojenize edildi. Bu tüplerden 1000 μL alınıp dilüsyonla sayma tekniği kullanılarak mL'deki serbest ve immobilize bakteri sayısı belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Serbest ve immobilize *L. plantarum*'a ait dilüsyon oranları ve bakteri sayıları

L. plantarum		
Dilüsyon Oranları	Immobilize Hücre sayısı	Serbest Hücre sayısı
10^{-3}	424	860
10^{-4}	153	180
10^{-5}	21	50
10^{-6}	3	11
10^{-7}	≤ 0	1

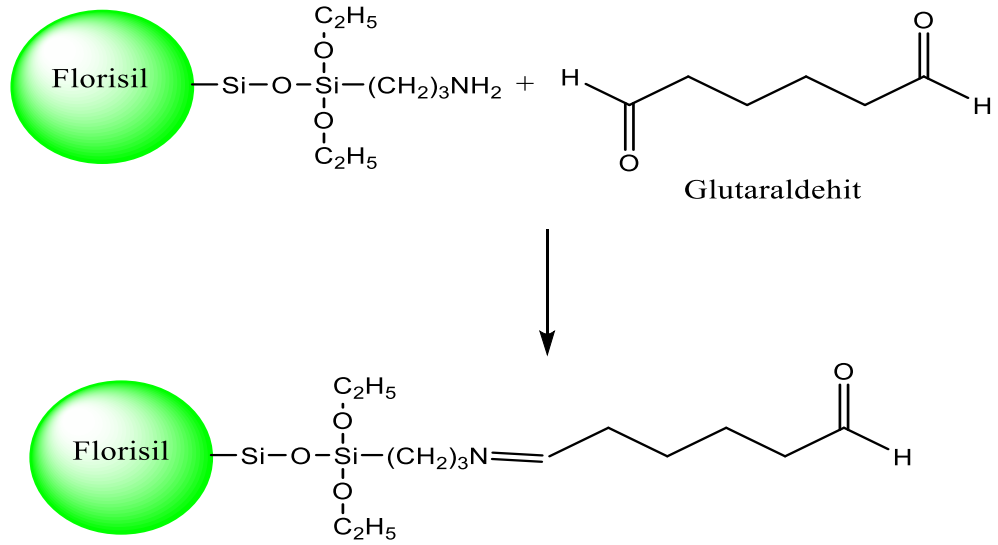
3.2.3. Florisilin akrilamin türevinin glutaraldehit ile aktifleştirilmesi ve schiff bazinin indirgenmesi

Tartılan 10 gr florosil önce 50 μL %5'lik HNO_3 ile yıkanmıştır. Ardından saf su ile yıkanarak nötralize hale getirilmiştir ve 120°C 'de kurutulmaya bırakılmıştır. Kurutulmuş desteğin 1 gramı tartılarak %4'lük (v/v) 3-APTES'in aseton içerisinde hazırlanmış olan çözeltiye eklenmiştir ve 45°C 'de 25 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra aktifleştirilen destek materyali saf su ile yıkanarak etüvde 105°C 'de 1 gece boyunca kurutulmaya bırakılmıştır.



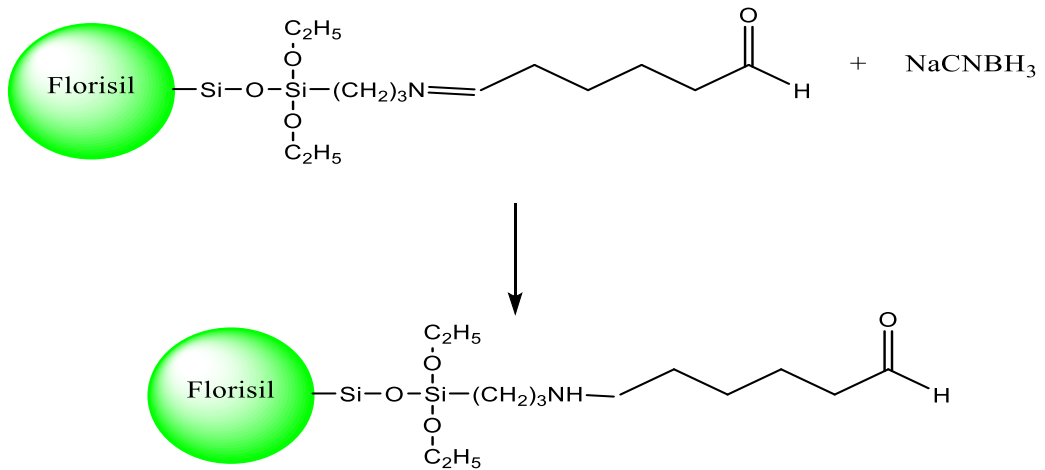
Şekil 3.2. Florisil destek materyalinin 3-APTES ile aktive edilmesi

1 gr akrilamin türevi alınarak 50 mM pH'sı 7.0 olan fosfat tamponu içerisinde %2.5 (w/v) olacak şekilde hazırlanan glutaraldehit çözeltisinden 25 mL eklenerek 2 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalanmaya bırakılmıştır. Daha sonra destek saf su ile yıkanarak glutar aldehit uzaklaştırılmıştır.



Şekil 3.3. Aktifleştirilmiş florisil desteğinin glutaraldehit ile reaksiyonu

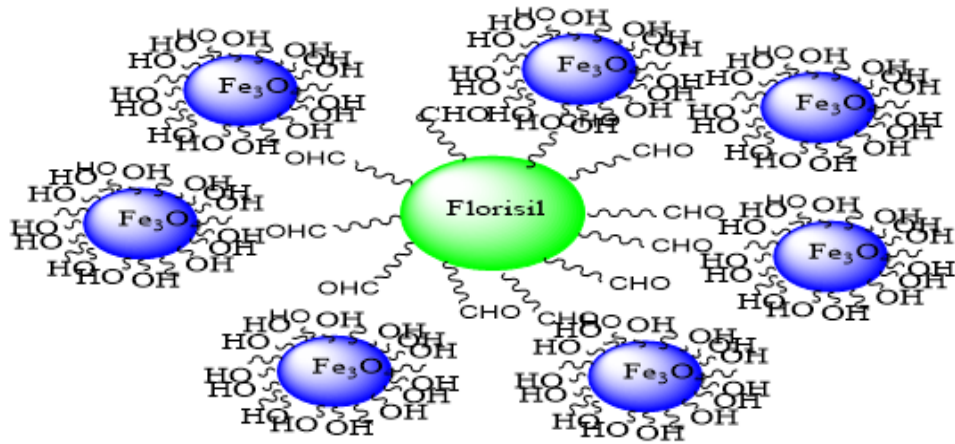
Kurutulan destek materyalinde bulunan Schiff bazı alınarak 50 mM pH 7.0 fosfat tampon ortamında 0,25 M NaCNBH₃ çözeltisinden 10 μL 'si eklenerek oda sıcaklığında 12 saat karıştırılarak indirgenmiştir. Elde edilen destek materyali saf su ile yıkanıp kurutulmuştur.



Şekil 3.4. Aktifleştirilmiş florisil desteğinin glutaraldehit ile reaksiyonu sonucu oluşan Schiff bazının indirgenmesi

3.2.4. Nanomagnetit florisit nanopartiküllerin hazırlanması

1 gr aktifleştirilmiş florisit destek materyali 100 mL 1M asetik asit çözeltisi içerisinde çözüldü. 3 gr Fe_3O_4 nanomateryali ile 1 gece boyunca karıştırıldı. Bu işlemin ardından aktifleştirilmiş florisit bileşiklerinin yüzeyi homojen bir şekilde nano Fe_3O_4 ile kaplanmış oldu.



Şekil 3.5. Aktifleştirilmiş florisit desteğinin nano Fe_3O_4 ile kaplanması

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Fitaz Bulguları

Çizelge 4.1. Fitaz enziminin *L. plantarum* tarafından üretiminin zamana bağlı değişimi

<i>L. plantarum</i>						
Zaman (saat)	Serbest Fitaz Enzim Aktivitesi (EU/mL)			Immobilize Fitaz Enzim Aktivitesi (EU/mL)		
	10 gr MSR	10 gr MSR	10 gr MSR	10 gr MSR	10 gr MSR	10 gr MSR
	10 gr BGDY	15 gr BGDY	20 gr BGDY	10 gr BGDY	15 gr BGDY	20 gr BGDY
0	21,65	20,25	22,50	23,90	26,16	29,94
6	21,40	21,60	20,00	26,26	26,90	25,00
12	29,00	26,00	25,50	27,35	27,70	27,00
24	19,65	19,50	21,25	22,70	24,25	27,45
30	18,90	25,90	24,30	29,60	28,50	29,85
36	20,00	19,00	20,00	24,00	26,20	30,00
48	23,32	24,30	26,50	26,25	27,00	25,00
54	20,52	23,55	23,32	27,35	27,60	27,10
60	21,60	22,70	22,68	22,20	24,30	27,45
72	21,85	22,68	23,75	29,60	28,50	29,80
78	22,46	27,00	22,70	31,90	28,45	27,00
84	27,55	24,84	30,78	29,00	29,80	29,75
96	23,43	25,95	20,15	27,45	28,00	26,60
102	24,30	25,90	24,85	28,20	29,00	30,00
108	23,75	27,00	26,00	27,60	28,10	27,00
	20 gr MSR	20 gr MSR	20 gr MSR	20 gr MSR	20 gr MSR	20 gr MSR
	10 gr BGDY	15 gr BGDY	20 gr BGDY	10 gr BGDY	15 gr BGDY	20 gr BGDY
0	24,50	27,00	24,85	27,45	26,91	28,53
6	20,00	23,50	22,75	26,00	28,00	25,00
12	25,00	22,75	22,75	26,20	26,20	28,23
24	21,60	20,55	20,50	25,00	27,78	27,35
30	20,52	22,25	21,80	31,70	29,75	27,00
36	20,90	20,55	21,60	27,50	27,00	28,50
48	22,90	27,00	28,80	26,00	28,00	26,20
54	17,50	23,75	21,60	26,20	26,20	28,25
60	23,75	22,00	22,15	25,40	26,60	27,80
72	23,90	24,85	24,88	31,50	29,70	27,00
78	23,75	24,20	25,15	28,00	28,75	29,00
84	25,38	24,30	28,10	29,75	30,00	31,00
96	25,70	26,00	24,85	25,40	27,60	25,50
102	24,85	23,75	27,25	24,35	27,40	29,40
108	25,38	25,25	26,00	27,00	29,20	30,25

Çizelge 4.1. (devam)

<i>L. plantarum</i>						
Zaman (saat)	Serbest Fitaz Enzim Aktivitesi (EU/mL)			Immobilize Fitaz Enzim Aktivitesi (EU/mL)		
	30 gr MSR	30 gr MSR	30 gr MSR	30 gr MSR	30 gr MSR	30 gr MSR
	10 gr BGDY	15 gr BGDY	20 gr BGDY	10 gr BGDY	15 gr BGDY	20 gr BGDY
0	25,95	29,00	29,20	32,20	27,25	28,75
6	25,90	26,25	23,76	25,30	24,64	24,86
12	30,50	29,70	28,00	26,80	28,50	27,75
24	35,65	30,25	27,65	27,35	27,50	28,25
30	26,50	29,20	35,70	30,60	32,50	29,50
36	20,50	19,00	20,00	32,20	27,25	28,75
48	23,80	23,20	26,50	25,50	25,00	25,00
54	21,50	23,70	23,25	26,80	28,55	27,80
60	21,75	22,70	23,00	27,35	27,45	28,35
72	21,40	22,70	24,32	30,55	32,45	29,50
78	22,70	26,00	22,70	29,00	29,25	30,00
84	27,56	24,32	30,80	29,25	30,50	30,25
96	23,56	26,00	29,20	27,50	29,50	30,00
102	24,32	26,20	24,86	28,30	30,80	26,50
108	22,70	27,00	27,00	31,25	28,65	27,35
	40 gr MSR	40 gr MSR	40 gr MSR	40 gr MSR	40 gr MSR	40 gr MSR
	10 gr BGDY	15 gr BGDY	20 gr BGDY	10 gr BGDY	15 gr BGDY	20 gr BGDY
0	26,50	27,55	22,70	26,00	31,35	25,50
6	24,20	25,50	23,80	25,00	24,86	25,75
12	28,62	28,00	27,00	28,40	28,30	26,48
24	26,50	28,32	26,00	32,10	28,00	29,25
30	20,53	22,16	21,83	30,00	26,60	27,35
36	20,55	20,50	22,70	26,00	31,45	25,25
48	22,70	27,25	28,65	25,00	25,00	26,00
54	19,00	23,55	22,50	28,45	28,30	26,50
60	23,75	22,00	22,15	32,10	28,00	29,00
72	24,20	24,75	25,00	30,00	26,60	27,35
78	23,80	24,21	24,85	28,75	28,10	27,90
84	23,70	24,32	27,25	29,00	27,00	25,70
96	25,72	25,94	24,86	26,80	26,60	25,75
102	24,86	23,78	28,10	28,75	28,10	28,50
108	25,40	25,90	26,25	28,10	27,00	27,80

10, 20, 30 ve 40 gr mısır (MSR) bulunan reaksiyon ortamına *L. Plantarum* mikroorganizması ile birlikte 10 gr, 15 gr, 20 gr buğday (BGDY) ile oluşturulmuş olan yapay besi yeri ortamından alınan örneklerde fitaz enziminin üretiminin zamana bağlı olarak aktivite değerleri takip edildi. Bu amaçla 108 saat boyunca yapılan fitaz aktivitesi ölçümlerinin sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre; serbest *L. plantarum* bakterisi bulunan 10, 20, 30 ve 40 gr mısır bulunan ortamlara ilave edilen buğday miktarı artıkça fitaz enziminin üretiminin arttığı görüldü. En yüksek aktiviteyi ise 10 gr mısır ve 20 gr buğday ortamında 84. saatte **30.78** EU/mL’de maksimum fitaz enzim aktivite gösterdiği belirlendi. 20 gr mısır ve 20 gr buğday bulunan ortamda ise 48. saat’de maksimuma ulaşarak **28.80** EU/mL fitaz enzim aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. 30 gr mısır ve 20 gr buğday bulunan ortamda ise 30. saat’de **35.70** EU/mL fitaz enzim aktivitesi ile maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Son besi yeri ortamı olan 40 gr mısır ve 20 gr buğday bulunan ortamda ise fitaz enzim üretiminin 48. saat’de maksimuma ulaştığı ve **28.65** EU/mL fitaz aktivite gösterdiği belirlendi.

L. plantarum bakterisi magnetit florosil nanopartikül ile kovalent olarak immobilize edilip aynı ortamda fitaz üretildiğinde ise; 10 gr mısır ve 10 gr buğday bulunan ortamda 78. saatte en yüksek oranda **31.90** EU/mL aktivite gösterdiği belirlendi. 20 gr mısır ve 10 gr buğday bulunan ortamda 30. saatte fitaz enzim aktivitesinin **31.70** EU/mL’de en yüksek oranda aktivite gösterdiği belirlendi. 30 gr mısır ve 10 gr buğday bulunan besi yeri ortamında 0. saatte **32.21** EU/mL fitaz enzim aktivitesi ile maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Son besi yeri ortamı olan 40 gr mısır ve 10 gr buğday bulunan ortamda fitaz enzim üretiminin 24. saatte maksimuma ulaştığı ve **32.10** EU/mL fitaz aktivite gösterdiği belirlendi.

Yapılan karşılaştırmalı çalışmada; ilk uygulamada 10 gr mısır, 20gr buğday fitaz enziminde, serbest *L. plantarum* bakterisi 84. saatte en yüksek üretimi sağlamasına rağmen immobilize *L. plantarum* daha az zamanda 78. saatte en yüksek fitaz aktivitesi göstermiştir. Serbest *L. plantarum* bakterisi 20 gr mısır ve 20 gr buğday bulunan

ortamda ise 48. saatt maksimuma ulaşarak **28.80** EU/mL fitaz enzim aktivitesi, immobilize bakteride; 20 gr mısır ve 20 gr buğday bulunan ortamda 30. saat'de fitaz enzim aktivitesinin **31.70** EU/mL'de en yüksek oranda aktivite gösterdiği belirlenmiştir, her iki uygulamada da immobilize enzim hem zaman hemde aktivite bakımından üstünlük göstermektedir. Serbest bakteri uygulamasında; 30 gr mısır ve 20 gr buğday bulunan ortamda ise 12. saatte **30.80** EU/mL fitaz enzim, 40 gr mısır ve 20 gr buğday bulunan ortamda ise fitaz enzim üretiminin 48. saatte maksimuma ulaştığı ve **28.65** EU/mL görülmüştür. Buna karşın immobilize bakteri de ise maksimum enzim aktivitesine daha uzun zamanda ulaşılmış ancak daha yüksek aktiviteler göstermiştir. 30 gr mısır ve 20 gr buğday bulunan ortamda ise 12. saatte **30.80** EU/mL, 40 gr mısır ve 20 gr buğday bulunan ortamda ise fitaz enzim üretiminin 48. saatte maksimuma ulaştığı görülmüştür. Immobilize bakteride ise değerler şöyledir: 30 gr mısır ve 20 gr buğday bulunan besi yeri ortamında 30. saatte **32.50** EU/mL, 40 gr mısır ve 20 gr buğday bulunan ortamda ise fitaz enzim üretiminin 60. saatte maksimuma ulaştığı ve **32.10** EU/mL fitaz aktivitesi gösterdiği belirlendi. Doğal karbon kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine pozitif etki gösterdiği, Mishra *et al.* 2014'de yapılan çalışma ilede paralellik göstermektedir.

Tüm besi yeri ortamlarında *L. plantarum* bakterisinin magnetit florosil nanopartikül ile kovalent olarak immobilize edilip fitaz üretildiğinde enzim aktivitesinin serbes enzim üretimine göre yaklaşık %10-15 oranında arttığı görülmüştür.

4.2. Mannanaz Bulguları

Çizelge 4.2. Mannanaz enziminin *L. plantarum* tarafından üretiminin zamana bağlı değişimi

<i>L. plantarum</i>						
Zaman (saat)	Serbest Mannanaz Enzim Aktivitesi (EU/mL)			Immobilize Mannanaz Enzim Aktivitesi (EU/mL)		
	10 gr MSR	10 gr MSR	10 gr MSR	10 gr MSR	10 gr MSR	10 gr MSR
	10 gr BGDY	15 gr BGDY	20 gr BGDY	10 gr BGDY	15 gr BGDY	20 gr BGDY
0	75,00	73,75	62,50	83,25	100,50	77,00
6	56,25	52,50	52,25	60,50	64,75	64,25
12	78,75	71,25	64,50	72,50	73,75	75,25
24	76,50	70,00	60,00	69,25	74,00	76,25
30	80,00	72,50	62,50	76,25	80,75	80,75
36	68,75	65,00	60,50	91,50	96,50	97,25
48	77,25	71,50	66,25	86,00	90,00	90,25
54	77,25	72,25	69,50	83,25	81,25	78,25
60	72,50	63,75	62,50	76,00	72,50	76,75
72	80,00	77,50	77,00	96,50	99,25	102,25
78	59,50	58,25	57,50	94,50	101,25	98,75
84	95,00	97,50	87,00	74,25	84,25	75,25
96	87,00	87,00	87,50	81,00	85,00	85,00
102	85,00	87,50	82,50	78,25	80,75	83,50
108	84,50	85,00	80,25	75,50	78,50	80,00
	20 gr MSR	20 gr MSR	20 gr MSR	20 gr MSR	20 gr MSR	20 gr MSR
	10 gr BGDY	15 gr BGDY	20 gr BGDY	10 gr BGDY	15 gr BGDY	20 gr BGDY
0	60,00	55,00	51,25	77,25	79,50	72,50
6	50,00	50,00	53,75	66,00	64,25	65,00
12	60,00	59,50	56,25	73,250	70,75	67,25
24	59,50	58,75	53,75	68,25	66,50	64,00
30	62,00	60,00	57,00	82,25	77,50	68,50
36	60,25	58,75	52,25	91,75	84,50	85,00
48	62,50	60,25	56,00	89,25	83,75	74,00
54	61,25	63,25	61,75	69,50	68,00	66,25
60	58,75	60,25	55,00	76,75	69,50	70,50
72	67,50	63,75	61,25	95,00	93,75	92,50
78	52,50	53,25	52,00	94,25	90,25	90,00
84	77,50	78,75	76,50	70,50	68,50	60,00
96	78,00	80,50	76,25	83,25	82,75	81,00
102	68,75	62,75	61,25	80,25	78,25	78,75
108	65,75	61,25	60,00	78,75	75,00	76,25

Çizelge 4.2. (devam)

<i>L. plantarum</i>						
Zaman (saat)	Serbest Mannanaz Enzim Aktivitesi (EU/mL)			Immobilize Mannanaz Enzim Aktivitesi (EU/mL)		
	30 gr MSR	30 gr MSR	30 gr MSR	30 gr MSR	30 gr MSR	30 gr MSR
	10 gr BGDY	15 gr BGDY	20 gr BGDY	10 gr BGDY	15 gr BGDY	20 gr BGDY
0	110,00	107,50	95,00	74,00	71,25	78,75
6	105,00	102,50	92,50	60,00	61,50	62,00
12	96,25	94,50	85,00	67,00	67,50	67,00
24	94,50	92,50	81,25	61,25	62,75	59,50
30	95,00	91,25	87,50	65,50	66,50	65,75
36	91,25	87,50	85,00	81,00	81,00	77,50
48	85,00	81,25	76,25	74,00	76,75	77,50
54	82,50	77,50	74,50	61,75	64,75	64,50
60	87,50	90,25	70,00	68,00	74,00	70,50
72	90,00	86,25	80,00	82,50	80,00	81,25
78	80,00	75,00	67,50	80,25	82,75	80,00
84	75,25	74,75	72,50	78,75	87,00	84,75
96	85,00	78,75	71,75	79,00	81,25	76,75
102	90,25	80,50	75,00	65,25	82,75	71,25
108	90,00	85,00	77,50	75,00	62,75	62,00
	40 gr MSR	40 gr MSR	40 gr MSR	40 gr MSR	40 gr MSR	40 gr MSR
	10 gr BGDY	15 gr BGDY	20 gr BGDY	10 gr BGDY	15 gr BGDY	20 gr BGDY
0	90,00	88,75	82,50	75,50	77,25	76,75
6	85,00	83,75	81,00	61,50	60,75	57,50
12	83,00	82,50	76,50	64,75	66,75	62,25
24	75,00	73,75	70,00	59,75	61,50	59,50
30	81,25	81,25	77,50	61,50	60,25	59,00
36	77,50	75,00	74,50	76,25	77,00	71,50
48	68,75	67,50	66,25	74,50	75,55	69,50
54	63,50	61,25	60,00	64,75	64,50	59,00
60	67,50	68,75	67,50	68,00	69,50	67,75
72	78,75	72,50	66,25	86,25	77,75	77,50
78	62,50	61,25	56,25	72,75	75,50	74,75
84	65,00	63,25	57,50	68,75	72,50	70,25
96	65,50	64,50	62,50	65,50	68,75	65,75
102	65,00	62,25	61,00	64,75	65,00	63,25
108	73,75	75,00	67,50	62,75	63,75	61,75

10, 20, 30 ve 40 gr mısır (MSR) bulunan reaksiyon ortamına *L. plantarum* mikroorganizması ile birlikte 10 gr, 15 gr, 20 gr buğday (BGDY) ile oluşturulmuş olan yapay besi yeri ortamından alınan örneklerde mannanaz enziminin üretiminin zamana

bağlı olarak aktivite değerleri takip edildi. Bu amaçla 108 saat boyunca yapılan mannanaz aktivitesi ölçümlerinin sonuçları Çizelge 4.2’de verildi.

Elde edilen bulgulara göre; serbest *L. plantarum* bulunan bakterisinin 10, 20 30 ve 40 gr mısır bulunan ortamlara ilave edilen buğday miktarı artıkça mannanaz enzim aktivitesinin de fitaz enzimine benzer olarak üretiminin arttığı görüldü. En yüksek aktiviteyi ise 10 gr mısır ve 15 gr buğday ortamında 84. saatte **97.50** EU/mL’de maksimum mannanaz aktivitesi gösterdiği belirlendi. 20 gr mısır ve 15 gr buğday bulunan ortamda ise 96. saat’de **80.50** EU/mL mannanaz enzim aktivitesi ile maksimuma ulaştığı belirlenmiştir. 30 gr mısır ve 10 gr buğday bulunan besi yeri ortamında ise 0. saat’te ölçümde **110.00** EU/mL ve 40 gr mısır ve 10 gr buğday bulunan ortamda ise 0. saat’te ölçümde **90.00** EU/mL mannanaz enziminin üretiminin maksimum orana ulaştığı tespit edilmiştir.

L. plantarum bakterisi magnetit florosil nanopartikül ile kovalent olarak immobilize edildikten sonra mannanaz enzimi üretildiğinde ise; 10 gr mısır ve 20 gr buğday bulunan ortamda 72. saat’te en yüksek oranda **102.25** EU/mL aktivite gösterdiği belirlendi. 20 gr mısır ve 10 gr buğday bulunan ortamda 72. saat’de mannanaz enzim aktivitesinin **95.00** EU/mL’de maksimuma ulaştığı görülmüştür. 30 gr mısır ve 15 gr buğday bulunan besi yeri ortamında 84. saat’te **87.00** EU/mL mannanaz enzim üretiminin en yüksek aktivitesini göstermiştir. Son besi yeri ortamı olan 40 gr mısır ve 10 gr buğday bulunan ortamda ise 72. saat’te mannanaz enzim üretiminin maksimuma ulaştığı ve **86.25** EU/mL mannanaz enzim aktivitesi gösterdiği belirlendi.

Tüm besi yeri ortamlarında *L. plantarum* bakterisinin magnetit florosil nanopartikül ile kovalent olarak immobilize edilip mannanaz enzimi üretildiğinde enzim aktivitesinin serbest üretime göre yaklaşık %10-15 oranında arttığı görülmüştür.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, florisil destek materyal olarak kullanıldı. 3-APTES ile aktif edilerek yüzeyinde $-NH_2$ grupları oluşturuldu. Ardından matriksin yüzeyindeki amin grupları glutaraldehit ile modifiye edilerek Schiff bazı oluşturuldu. Oluşan Schiff bazı kararlı olmadığı için sodyum siyanoborhidrür kullanılarak seçimli olarak indirgenmesi gerçekleştirildi. Ardından modifiye florisil destek materyalini magnetik hale döndürmek ve yüzey alanını genişletebilmek amacıyla; florisilin ağırlığının 3 katı kadar miktarda nano Fe_3O_4 bileşiği ile muamele edilerek magnetit nano florisil elde edildi.

Literatürde, *Lactobacillus plantarum* mikroorganizmasının magnetit nano florisile immobilizasyonu ile ilgili fazla çalışma bulunmamaktadır. Bulunan çalışmalarda ise aktifleştirilmiş magnetit florisile, glutaraldehit ara kolu üzerinden mikroorganizmalara en uygun bağlanma pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla; pH 5,0-6,0 aralığında ve sıcaklığın 50-65°C araştırıldığı olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan bu çalışmada ise kullanılan *L. plantarum* bakterisinin en uygun gelişme sıcaklığı 35°C olduğu için bu sıcaklık değerinde deney gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizmanın magnetit florisil nanopartikül destek materyaline yaklaşık %50 oranında bağlandığı yayma ekim yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Deneyimizde buğday unu ve mısır kullanma nedenimiz içerdikleri besin bileşenleridir. Buğday bileşenleri; nem %12,0, karbonhidrat %70,0, protein %12,0, yağlar %2,0, selüloz %2,2 ve kül %1,8 oranında bulunmaktadır. Mısır unu bileşenleri; Nem %7-23, nişasta % 61-78, protein %6-12, yağ % 3,1-5,7, kül %1,1-3,9, Lif % 8,3-11,9 oranında bulunmaktadır. Bu besin bileşimlerinden dolayı bu iki besin maddesi doğal karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.

Deneyimizde florasil (magnezyum silikat) kullanmamızın sebebi; yüksek mekanik dayanıklılığa sahip, organik çözücülere karşı dayanıklı, mikrobiyal saldırılara karşı dirençli olan inorganik bir destek materyalidir.

Hem serbest hem de magnetit florosil nanopartikülleri üzerine immobilize edilmiş olan *L. plantarum* izolatlarının değişik oranlardaki karbon kaynaklarından; MSR (10g, 20g, 30g ve 40g) ve BGDY (10g, 15g ve 20g) ihtiva eden reaksiyon ortamlarından alınan örneklerde, fitaz ve mannanaz enzimlerinin en yüksek üretimlerinin zamana bağlı değişimleri takip edilmiştir. Bu amaçla 5 gün boyunca 6 saat aralıklarla yapılan fitaz ve mannanaz aktivite ölçüm sonuçları Çizelge 4.1 ve 4.2’de verilmiştir. Bu veriler incelendiğinde, genel olarak enzim aktivitesinin zamanla bakteri sayısına paralel olarak artış gösterdiği ve belli bir noktada en yüksek üretim seviyesine ulaşp daha sonra ortam koşulları nedeniyle azalma olduğu gözlemlenmiştir.

Deney süresi uzadıkça ortamdaki mannanaz ve fitaz enzim üretim seviyelerinde azalma tespit edilmiştir. Bunun sebebi *L. plantarum* bakterisinin asidik karakterli olduğu için ortamın asit değerini düşürebileceğidir. Deney başlangıcında ve sonunda ölçülen pH miktarları dikkate alındığında deney başlangıcında 6.0-6.5 olarak ölçülen pH miktarı deney sonunda 4.0-4.5 şeklinde ölçülmüştür. Ortamdaki bu asidik değişimin enzim üretimini azaltıcı etki yaptığı düşünülmektedir.

L. plantarum bakterisinin kovalent olarak destek materyaline %50-55 oranında bağlanmasının; izolatın istikrarlı hale geldiğini ve enzim üretiminde artışa neden olduğu düşünülmektedir. Çünkü az sayıda bakterinin daha fazla miktarda mannanaz ve fitaz enzimlerini üretmesi stabil olan bir ortamda kolaylıkla sağlanacaktır. Bu sebepten dolayı besiyeri ortamındaki karbon kaynakları daha ergonomik olarak kullanılıp daha fazla enzim üretimi sağlanabilecektir.

Elde edilen sonuçlara göre; *L. plantarum* bakterisinin fitaz enziminin üretimi serbest halde en yüksek değeri 30 gr mısır ve 10 gr bugday bulunan ortamda 84. saat’te **30.50** EU/mL olarak ölçülmüştür. Nanopartiküle immobilize edilmiş olarak en yüksek değeri

ise 30 gr mısır ve 15 gr buğday bulunan ortamda 30. saatte **32.50** EU/mL olarak ölçülmüştür. Mannanaz enziminin üretimine bakıldığında ise serbest enzimin en yüksek değere 30 gr mısır ve 10 gr buğday bulunan ortamda ilk ölçümde **110.00** EU/mL olarak gözlemlenmiştir. Nanopartiküle immobilize edilmiş olarak ise 10 gr mısır ve 20 gr buğday bulunan ortamda 72. saatteki ölçümde **102.25** EU/mL olarak en yüksek seviyeye ulaşıldığı gözlemlenmiştir. Bakterinin kovalent olarak destek materyaline %50 oranında bağlanmış olduğunu düşündüğümüzde daha az miktarda bakteri ile istenilen enzim aktivitesine ulaşıldığı görülmüştür. Özellikle hücrenin kendisini kullanmamız, farklı çevre koşullarının aktiviteye olumsuz etki ederek, fitaz ve mannanaz enzimlerinin, aktivite kaybının engellenmesi açısından önemlidir. Bu bağlanma sonucunda izolatların istikrarlı hale geldiği ve enzim üretiminde artışa neden olduğu düşünülmektedir.

Sonuçlar göz önüne alındığında, elde edilen yüksek fitaz ve mannanaz enzim aktivitesinden dolayı, *L. plantarum* bakterisinin ortama eklenen mısır ve buğday doğal besin maddelerini karbon kaynağı olarak kullandığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışma sonucunda farklı karbon kaynaklarının bakteriyel fitaz ve mannanaz üretimi üzerine etkisi; standart besiyerine göre bakteriyel üremenin hızlı olduğu ve enzim aktivitesinde %10-15’lik bir artışın olduğu tespit edilmiştir.

Benzer bir çalışmada; Sadigh 2014, KB ve MSR doğal karbon kaynaklarını, *B. Brevis* ve *B. Borstelensis* bakterilerini kullanarak immobilize fitaz ve mannanaz enzimlerinde serbest enzime göre %59-81 civarında artış gözlemlemiştir.

Sonuçlarımıza göre; magnetit florisit nanopartiküllere az miktarda immobilize edilen *L. plantarum* bakterisinin karbon kaynaklarından en verimli şekilde yararlandığı tespit edilmiştir. Bu bakterinin gelecekte preparat halinde tasarlanıp, starter kültür şeklinde çeşitli endüstriyel alanlara servis edilebilecek ve güvenle kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Anonim 2006. Vikipedi: Özgür Ansiklopedi, [Http://tr.Wikipedia.Org/Wiki/Ec](http://tr.Wikipedia.Org/Wiki/Ec) Numarası
- Anonim 2009. Prof. Dr. Fidancı, Enzimler Ders Notları, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
- A. K. Halkman, 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları Yayınları. Ed: Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358. sayfa, 3. Bölüm
- Ademark, P., Varga, A., Medve, J., Harjunpää, V., Drakenbeg, T., Tjerneld, F. and Stalbrand, H., (1998). *Softwood hemicellulose-degrading enzymes from Aspergillus niger: purification and properties of a β -mannanase*. Journal of Biotechnology, 63: 199–210.
- Aras, Kazım ve Gülseren, Erşen. Klinik Biokimya, Ankara, Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd., 1988.
- Aziz SA, Ong LGA, Hassan MA, Karim MIA (2008) Production Parameters Optimization of Mannanase Production from *Aspergillus Niger* FTCC 5003 using Palm Kernel cake as Carbon Source. Asi J Biochem 3(5):297–307
- Benech R.O., Li X., Patton D., Powlowski J., Storms R., Bourbonnais R., Paice M. And Tsang A. (2007) Recombinant Expression, Characterization, and pulp Prebleaching Property of a *Phanerochaete Chrysosporium* endo- β -1,4-mannanase. Enzyme and Microbial Technology, 41:740-747.
- Bettiol Jp, Boutique Jp, Gualco Lmp, J.J., 2000. Nonaqueous Liquid Detergent Compositions Comprising A Borate Releasing Compound and a Mannanase.
- Bulpin P. V., Gidley M. J., Jeffcoat R., Underwood D. R. (1990) Development of a Biotechnological Process for the Modification of Galactomannan Polymers with Plant α -galactosidase. Carbohydrate Polymers, 12: 155.
- Caplice, E., and Fitzgerald, G.F., 1999. Food Fermentations: Role Of microorganisms In Food Production and Preservation. International Journal of Food Microbiology, 50, 131–149.
- Carrington C.M.S., Vendrell M., Puigjaner E.D. 2002. *Characterisation of an endo-(1,4)- β -mannanase (LeMAN4)* Expressed in Ripening Tomato Fruit. Plant Science 163: 599- 606
- Casey, A. & Walsh, G., 2004. Identification and Characterization of A Phytase of Potential Commercial Interest. *Journal of Biotechnology*, 110(3), Pp.313–322.
- Chauhan PS, Puri N, Sharma P, Gupta N., 2012. Mannanases: Microbial Sources, Production, Properties and Potential Biotechnological Applications. Applied Microbiology And Biotechnology, 93(5), Pp.1817–30.
- Christgau, S., Kauppinen, S. and Vind, J. (1994) Expression cloning, purification and Characterization of a β -1,4-mannanase from *Aspergillus Aculeatus*. Biochem. Mol. Biol. Int., 33: 917-925.
- Demain, A.L., and Solomon, N.A., 1981. In Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering, Pp. 3-14. Scientific American, Freeman & Comp., San Francisco.
- Dhawan, S. & Kaur, J., 2007. Microbial Mannanases: An Overview Of Production And Applications. *Critical Reviews In Biotechnology*, 27(4), Pp.197–216.
- Dirk L.M.A., Griffen A.M., Downie B., Bewley J.D. (1995). Multiple Isozymes of endo- β -mannanase in dry and Imbibed Seeds. Phytochemistry 40: 1045-1056.

- Downie, B., Hilhorst, H. W. M., and Bewley, J. D. (1994) A new Assay for Quantifying *endo- β -mannanase* Activity Using Congo red dye. *Phytochemistry* 36: 829–835.
- Duruksu, G., 2009. Cloning , Expression And Characterization Of Endo- B -1 , 4-Mannanase From *Aspergillus Fumigatus* in *Aspergillus Sojae* and *Pichia Pastoris*. , Pp.271–276.
- Furlan, S.A., and Pant, H.K., 2006. *Enzyme Technology: General Properties Of Enzymes*, Springer Science And Business Media, Inc. And Asiatech Publishers Inc., New York, P 11-37.
- Ghareib, M. (1990) Biosynthesis, Purification, and Some Properties of Extracellular Phytase from *Aspergillus Carneus*. *Acta Microbiol. Hung.* 37, 412-418.
- Greiner, R., Konietzny, U., And Jany, K.D., 1993. Purification and Characterisation of Two Phytases drom *Escherichia Coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303, 107–113
- Greiner R, Haller E, Konietzny U, Jany KD (1997) Purification and Characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Archives of Biochemistry And Biophysics*, 341(2), Pp.201–206.
- Greiner, R., 2002. Purification and Characterization of Three Phytases Fromgerminated Lupine Seeds (*Lupinus Albus* Var. Amiga). *J. Agric. Food Chem.*50: 6858–6864.
- Gözükara, Engin M. *Biyokimya*, Ankara, Ofset Pepianat Ltd. Şti., 1990.
- Hagglund P., Eriksson T., Collen A., Nerinckx W., Claeysens M. and Stalbrand H. (2003) A Cellulose-binding Module of the *Trichoderma reesei beta-mannanase* Man5A increases the mannan-hydrolysis of complex Substrates. *J Biotechnol* 101: 37-48.
- Halmer P., Bewley J. D., Thorpe T. A. (1976) An enzyme to degrade lettuce endosperm cell walls: Appearance of a mannanase Following Phytochrome and gibberellin induced germination. *Planta* 130: 189–196.
- Halmer, P. (1989) De novo synthesis of Mannanase by the Endosperm of *Lactuca sativa*. *Phytochemistry* 28: 371–378.
- Handford M.G., Baldwin T.C., Goubet F., Prime T., Miles J., Yu X. and Dupree P. (2003) Localisation and Characterisation of cell wall mannan Polysaccharides in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 218: 27–36.
- Hayaloğlu A.A., ve Erginkaya Z., 2001. Gıda Endüstrisinde Kullanılan Laktik Asit Bakterileri Gıda Teknolojileri Derneği Yayın No:23
- Hilge, M., Gloor, S.M., Rypniewski, W., Sauer, O., Heightman, T.D., Zimmermann, W., Winterhalter, K., and Piontek, K. (1998). High-resolution native and complex structures of thermostable mannanase from *Thermomonospora fusca*: Substrate specificity in glycosyl hydrolase family 5. *Struct. Fold. Des.* 6: 1433–1444.
- Hofvendahl K. and Hahn-Hägerdal B. 2000 Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable Resources. *Enzyme Microb Technol*, 26: 87–107.
- Jareonkitmongol, S., Ohya, M., Watanabe, R., Takagi, H. And Nakamori, S. (1997) Partial Purification of Phytase from A Soil Isolate Bacterium, *Klebsiella Oxytoca* Mo-3. *J. Ferment. Bioeng.* 83, 393-394.

- Jiang Z., Wei Y., Li D., Li L., Chai P., Kusakabe I. (2006) High-level Production, Purification and Characterization of a Thermostable β -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. *Carbohydrate Polymers*, 66: 88-96.
- John, F.K., 1987. *Enzyme Technology* (H.J. Rehm Ve G.Reed Editör), Biotechnology, Vol.7a. New York S 37-62.
- Kerovuo, J., 2000. A Novel Phytase from *Bacillus*. Characterization Andproduction of the Enzyme. Academic Dissertation, 68 P., Helsinki,
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkinnen, N., And Apajalahti, J., 1998. Isolation, Characterization, Molecular Gene Cloning, And Sequencing Of A Novel Phytase from *Bacillus Subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2079-2085.
- Konietzny, U. and Greiner, R., 2003. Phytic Acid: Nutritional Impact. In: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, B. Caballero, L. Trugo, P. Funglas (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: 11-18.
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., and Becker, K., 2010. Dietary Roles of Phytate and Phytase In Human Nutrition: A Review. *Food Chemistry*, 120(4), Pp.945–959.
- Lehninger, Albert L. *Biochemistry*, New York, Worth Publishers, Inc., 1988.
- Lei, X.G., and Porres, J.M., 2003. Phytase Enzymology, Applications, and Biotechnology. *Biotechnology Letters*, 25: 1787-1794.
- Leviatov S., Shoseyov O., Wolf S. (1995). Involvement of endomannanase in the Control of Tomato seed Germination under low Temperature conditions. *Annals of Botany* 76:1-6.
- Li, M., M. Osaki, M. Honma and T. Tadano. 1997. Purification and Characterization of Phytase Induced In Tomato Roots Under Phosphorus-Deficient Conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 43: 179-190.
- Lindberg B., Rosell K.G., Svensson S. (1973) Positions of the O-acetyl groups in pine glucomannan. *Svensk Paperstid* 76: 383–384.
- Liu, B.L., A. Rafiq, Y.M. Tzeng And A. Rob. 1998. The Induction and Characterization of Phytase and Beyond. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 22: 415-424.
- Madsen, G.B., Norman, B.E., And Slott, S., 1973. A New Heat-Stable Bacterial Amylase and Its use In High-Temperature Liquefaction .*Starke* 25, 304.
- Manary, M.J., Krebs, N.F., Gibson, R.S., Broadhead, R.L., Hambridge, K.M., 2002. Community-Based Dietary Phytate Reduction and its Effect On Iron Status In Malawian Children. *Ann. Trop. Paediatr.* 22:133– 136.
- McCleary B.; Clark A.; Dea I.; Rees D. (1985) *The fine structure of carob and guar galactomannans*. *Carbohydrate Research*, 139: 237.
- McCleary B.V. (1978). A simple assay procedure for β -D-mannanase. *Carbohydrate Research*. 67:213–221.
- McCleary B.V. 1979. Enzymatic hydrolysis, fine structure, and gelling interactions of legume-seed D-galacto-D-mannans. *Carbohydrate Research*, 71: 205–230.
- McCleary B.V., and Matheson N.K. (1975) Galactomannan structure and β -mannanase and β -mannosidase activity in germinating legume seeds. *Phytochemistry* 14: 1187–1194.

- MEGEP, 2007. Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Geliştirilmesi Projesi, Gıda Teknolojisi, Enzimlerin Özellikleri.
- Messi P, Bondi M, Sabia C, Batini R, Manicardi G. 2001. Detection And Preliminary Characterization Of A Bacteriocin (Plantaricin 35d) Produced By A *Lactobacillus Plantarum* Strain. *Int J Food Microbiol*, 64: 193-198.
- Moreira, L.R.S. & Filho, E.X.F., 2008. An Overview Of Mannan Structure And Mannan-Degrading Enzyme Systems. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 79(2), Pp.165–78.
- Nayini, N.R., and Markakis, P., 1984. The Phytase of Yeast. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 17, 24–26.
- Nomaguchi M., Nonogaki H., Morohashi Y. (1995). Development of galactomannan Hydrolyzing activity in the Micropylar Endosperm tip of Tomato seeds prior to Germination. *Physiology of Plant* 94: 105-109.
- Norita, S., Rosfarizan, M. & Ariff, A.B., 2010. Evaluation Of The Activities Of Concentrated Crude Mannan-Degrading Enzymes Produced by *Aspergillus Niger*. *Mal J Microbiol*, 6(2), Pp.171–180.
- Orla and Jensen, S. 1919 The Lactic acid bacteria. *M6m. acad. roy. sci., Danemark*, Sect. sci., 8 s6r., 5, 81-197.
- Outtrup, H., and Jorgensen, S. T., 2002. The importance of Bacillus species in the Production of Industrial Enzymes. In *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*, pp. 206–218.
- Pan, X., Zhou J., Tian A., Le K., Yuan H., Xue Y., Ma Y., Lu H., 2011. High Level Expression Of A Truncated B-Mannanase From Alkaliphilic Bacillus Sp. N16-5 In *Kluyveromyces Cicerisporus*. *Biotechnology Letters*, 33(3), Pp.565–70.
- Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A, And Soccol, V.T., 2001. Production, Purification and Properties of Microbial Phytases. *Bioresource Technol.*, 7: 203-214.
- Pandey, A., and Ramachandran, S., 2006. *Enzyme Technology: General Introduction*, Springer Science And Business Media, Inc. And Asiatech Publishers Inc., New York, P 1-11.
- Pamela C. Champe. "Lippincott's Illustrated Reviews. Biochemistry". J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1987.
- Petty L.A.; Carter S.D.; Senne B.W.; Shriver J.A. (2002). Effects of β -mannanase addition to corn-soybean meal diets on growth. *Journal of Animal Science*. 80, 4:1012- 101
- Powar, V.K., Jagannathan, V., 1982. Purification And Properties Of Phytate Specific Phosphatase From *Bacillus Subtilis*. *J. Bacteriol.*, 151: 1102-1108.
- Pressey R. (1989). *Endo- β -Mannanase* in tomato fruit, *Phytochemistry*. 28:3277- /3280.
- Prud'homme, R. K.; Constien, V.; Knoll, S. Polymers in aqueous media: Performance through association. Glass, J.E., Ed.; *Adv. Chem. Ser.* 1989, 223, 89.
- Puchart, V.; Katapodis, P.; Biely, P.; Kremnický, L.; Christakopoulos, P.; Vršanská, M.; Kekos, D.; Macris, B.J. and Bhat, M.K. (1999) Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme Microbial Technology*, 24: 355-361.
- Puchart, V.; Vrsanská, M.; Svoboda, P.; Pohl, J.; Ogel, Z.B. and Biely, P. (2004) Purification and Characterization of two forms of endo- β -1,4-mannanase from a

- Thermotolerant fungus *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). *Biochim. Biophys. Acta.* 1674: 239-250.
- Reid, J.S.G., Davies, C., and Meier, H. (1977) Endo- β -mannanase, the Leguminous Aleurone Layer and the Storage galactomannan in Germinating seeds of *Trigonella foenum graecum* L. *Planta* 133: 219–222.
- Rodriguez, E., E.J. Mullaney And X.G. Lei. 2000. Expression of the *Aspergillus Fumigatus* Phytase Gene in *Pichia Pastoris* And Characterization of the Recombinant Enzyme. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 268(2): 373-378.
- Sabini, E., Schubert, H., Murshudov, G., Wilson, K.S., Siika-Aho, M., and Penttila, M. 2000. The three-dimensional structure of a *Trichoderma reesei* mannanase from glycoside hydrolase family 5. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56: 3–13.
- Schallmey, M., Singh, A., Ward, O.P., 2004. Developments in the Use of *Bacillus* species for Industrial Production. *Can. J. Microbiol.* 50, 1–17.
- Schröder, R., Atkinson, R.G. & Redgwell, R.J., 2009. Re-Interpreting The Role Of Endo-B-Mannanases As Mannan Endotransglycosylase/Hydrolases In The Plant Cell Wall. *Annals of Botany*, 104(2), Pp.197–204.
- Segueilha, L., Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G., and Galzy, P., 1992. Purification and Properties of the Phytase From *Schwanniomyces Castellii*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74, 7–11.
- Selle, P. H., Ravindran, V. Ravindran, G. and Bryden, W. L. 2007. Effects of Dietary Lysine and Microbial Phytase on Growth Performance and Nutrient Utilization of Broiler Chickens. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, 20, 1100-1108.
- Shieh, T. R. And Ware, J. H. (1968) Survey of Microorganisms for the Production of Extracellular Phytase. *Appl. Microbiol.* 16, 1348-1351.
- Shimizu, M. (1993) Purification and Characterization of Phytase and Acid Phosphatase By *Aspergillus Oryzae* K1. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 1364-1365.
- Shimizu, M., 1992. Purification and Characterization of Phytase from *Bacillus Subtilis* (Natto) N-77. , 58(8), Pp.1266–1269.
- Singh, G., Bhalla, A. & Hoondal, G.S., 2010. Solid State Fermentation And Characterization of Partially Purified Thermostable Mannanase From *Bacillus Sp.* Mg-33. *Bioresources*, 5(3), Pp.1689–1701.
- Stalbrand, H., Siika-aho, M., Tenkanen, M. and Viikari, L. (1993) Purification and characterization of two β -mannanases from *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology*, 29: 229-242.
- Sutardi, M. And Buckle, K. A. (1988) Characterization Of Extra- And Intracellular Phytase From *Rhizopus Oligosporus* Used In Tempeh Production. *Int. J. Food Microbiol.* 6, 67-69.
- Takahashi R., Kusakabe I., Kobayashi H., Murakami K., Maekawa A., Suzuki T. (1984) Purification and some properties of mannanase from *Streptomyces sp.* *Agricultural and Biological Chemistry* 48:2189–2195.
- Tang, C.M., Waterman, L.D. and Smith, M.H. (2001). The cel4 gene of *Agaricus bisporus* encodes a β -mannanase. *Applied Environmental Microbiology* 67: 2298-2303.
- Tekinşen O.C., ve Atasever M., 1994, Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür, Selçuk Ü. Vet. Fak. Yayını, 150s., Konya.

- Telefoncu, A., 1983. *Biotechnol. Bioeng.* 25,713.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, s.126-159, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Telefoncu, A., 1995. *Biyoteknoloji*, s.253, Ege Üniversitesi, Basımevi, İzmir.
- Telefoncu, A., 1997. Enzimoloji. Yüksek Lisans Yaz Okulu. 21-27 Eylül 1997. Kuşadası, Aydın, Türkiye.446 S.
- Telefoncu, A., Tarhan, L., Pekin, B., 1981. *Biotechnol Bioeng.* 23, 1669.
- Toorop P.E., Bewley J.D., Hilhorst H.W.M. (1996). Endo- β -mannanase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination. *Planta* 200: 153-158.
- Tunail N. ve Köşker, 1989. Süt Mikrobiyolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:1116, 138s Ankara, 18–19.
- Ullah, A.H.J., 1988. *Aspergillus Ficum* Phytase: Partial Primary Structure, Substrate Selectivity, And Kinetic Characterization. *Preparative Biochemistry*, 18(4), Pp.459–471.
- Villarroya H., Williams J., Dey P., Villarroya S., and Petek F. (1978) Purification and properties of β -mannanases I and II from germinated seeds of *Trifolium repens*: Mode of galactomannan degradation in vitro. *Bot. J.* 175:1079–1087.
- Wiseman, A., 1987. *Handbook of Enzymes Biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes In Industry P. 274-373.
- Wolfson, D., Olmstead, S., Meiss, D., And Ralston, J., 2008. Making Sense Of Digestive Enzymes. Klaire Labstm. A Division Of Protherar. Inc.
- Wozniowski T., Blaschek W., Franz G. (1992). Isolation and characterization of an endo- β -mannanase of *Lilium testaceum* bulbs. *Phytochemistry*, 31: 3365-3370
- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Remy, R., Fimbel, R., Oesterheld, G., Lehmann, M., Loon, A.P.G.M., 1999. Biochemical Characterisation of Fungal Phytases: Catalytic Properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 367–373.
- Yamada, K., Minoda, Y. and Yamamoto, Y. (1968) Phytase from *Aspergillus Terrus*. Production, Purification and Some General Properties of the Enzyme. *Agric. Biol. Chem.* 32, 1275-1282.
- Yoon, S.J., Choi, Y.J., Min, H.K., Cho, K.K., Kim, J.W., Lee, S.C., Jung, Y.H., 1996. Isolation and Identification Of Phytase-Producing Bacterium, *Enterobacter* Sp. 4, and Enzymatic Properties of Phytase Enzyme. *Enzyme and Microbial Technol.*, 18: 449-454.
- Zhu Wm, Liu M, Wu Dq. 2000. Isolation and Characterization of A New Bacteriocin from *Lactobacillus Gasseri* Kt7. *J Appl Microbiol*, 88: 877–886.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Gümüşhane'de doğdu. İlkokul ve lise eğitimini Kocaeli’de tamamladı. 2009 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim dalında lisans eğitimine başladı. 2013 yılında Ziraat Mühendisi ünvanı ile mezun oldu. 2013 yılında Atatürk Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nın Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji dalında yüksek lisansına başladı. 2015 yılında yüksek lisansını tamamlayarak mezun olmuştur.