

TOPRAK BAKTERİLERİNDEN İZOLE EDİLEN FİTAZLARIN ÖZELLİKLERİ*

Characterization of Phytases Isolated from Soil Bacteria

Esen BİLGİN
Biyoloji Anabilim Dalı

Sadık DİNÇER
Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Toprak izolatlarındaki fitaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışmada; Çukurova Üniversitesi kampüsü topraklarından *Bacillus* cinsine ait organizmalar izole edilmiştir. Bu bakterilerin fitaz üretimi, fitatli besiyerinde 37°C'de 24 saatlik inkübasyon sonucu mikroorganizmaların etrafında oluşan şeffaf zonlarla saptanmıştır. *Bacillus* sp. 6'dan izole edilen enzim en iyi aktivite gösterdiği için bu suş diğer çalışmalarda kullanılmıştır.

Üretilen enzimlerin kısmi saflaştırılması yapıldıktan sonra, enzim örneklerinin belirli sıcaklık ve pH değerlerindeki aktiviteleri saptanmıştır. Deney sonucunda *Bacillus* sp. 6'dan izole edilen fitazın 65°C'de pH 6'da maksimum aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.

SDS-PAGE uygulamasından sonra ilk bandı 53 kda ve ikinci bandı 60 kda olan iki farklı moleküler ağırlığa sahip bant bulunmuştur

Anahtar Kelimeler: *Bacillus* sp., Fitaz, Fitik Asit.

ABSTRACT

In this study, to determine phytase activity in soil isolates, the organisms belong to *Bacillus* spp. were isolated from Çukurova University campus. Phytase production of these strains were determined by production of clear zones around the colonies on the phytate containing media, after 24 hours incubation at 37°C. The organisms called *Bacillus* sp.6 showed the best activity, so choosed for other studies.

After portial purification of enzymes, phytase activities were determined at different temperature and pH values. Consequently the highest phytase activity of *Bacillus* sp.6 was obtained at 65°C and pH 6.

After SDS-PAGE, two bands with different molecular weights were seen. It was found that, the first one was 53 kda and the second band was 60 kda.

Key Words: *Bacillus* sp., Phytase, Phytic acid

*Yüksek Lisans Tezi-MSc. Thesis

Giriş

Tahıl bitkileri, legümler dünyada hasat edilen alanların yaklaşık % 90'ında üretilmektedir. Bunlar, hayvanlar alemi için temel besin kaynaklarıdır. Bu bitkilerin en önemli içeriklerinden biri de fitik asittir (myo-inositol hexakis fosfat). Tahıl bitkileri ve legümlerdeki toplam fosforun %80'inden fazla miktarı tuz formunda (fitat) depo edilir (Reddy ve ark.,1989).

Kimyasal yapısına bağlı olarak fitik asit oldukça stabildir. Normal fizyolojik şartlar altında fitik asit kalsiyum, magnezyum, demir ve çinko gibi bazı temel mineralleri şelatlar. Aynı zamanda protein ve aminoasitlere bağlanabilir ve sindirim enzimlerini inhibe edebilir (Pallauf ve Rimbach, 1996). Dolayısıyla bitkisel kökenli gıdalarda fitik asit antinutritive bir etki gösterir ve bu nedenle enzimatik hidrolizi şarttır.

Fosfatazlar, birçok organo-fosfat bileşiklerindeki monofosfoester bağlarının parçalanmasını katalizleyen enzimlerdendir. Ancak bu enzimler fitik asit içindeki monofosfoester bağlarını hidrolize edemez. Fitik asidin hidrolizi oldukça önemli olduğu için, fitik asidi hidrolizleyen enzim sınıfına fitazlar denmiştir. Bu enzimler (myo-inositol hexakisfosfat hidrolazlar) fitik asidi daha az fosforlanmış myo-inositol türevlerine hidrolize ederler ve inorganik fosfat açığa çıkarırlar. Fitazlar doğada oldukça yaygındır; mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hatta bazı hayvan dokularında vardır (Kerovno, 2000).

Geviş getiren hayvanlar; anaerobik bağırsak fungusları ve rumen mikroflorasında bulunan bakteriler tarafından üretilen fitazların aktivitesine bağlı olarak fitik asidi parçalarlar. Ancak domuz, kümes hayvanları ve balık gibi monogastrik hayvanlar fitat fosforunu çok az kullanabilirler. Çünkü bunlar gastrointestinal fitaz sisteminden yoksundurlar. Dolayısıyla bunların yemlerine inorganik fosfat eklenir ve iyi bir büyüme sağlanır. Ancak bu eklenen inorganik fosfat, fitik asidin antinutritive etkisini azaltmaz. Bu problem fitaz eklenip fitat hidrolizinin sağlanması ile çözülebilmektedir (Simell ve ark., 1989). Dolayısıyla fitaz önemli bir endüstriyel enzim ve geniş kapsamlı araştırmaların konusu olmuştur. Eklenen fitaz, substratı üzerinde etkili bir şekilde çalışarak fitik asidin antinutritive etkisini azaltmış ve inorganik fosfat eklenme gereksinimini azaltarak ya da yok ederek besinlerin maliyetini de azaltmıştır. Ayrıca fitaz doğaya geçen fosforların miktarını da azaltarak doğa için faydalı bir ürün olmuştur(Wodzinski ve Ulah, 1996).

Bunların yanı sıra fitazlar, fitatların parçalanmasıyla oluşan spesifik ürünlerin ekonomik kullanımı için önemlidir. Fitazlar myo-inositol hexafosfatın sıralı hidrolizini gerçekleştirerek, myo-inositol fosfat üretimini sağlarlar (Greiner ve Konietzy, 1999).

Myo-inositol fosfatlar hayvan hücrelerinde de bulunmuştur. Ancak hayvan hücrelerindeki bu bileşikler fosfor deposu ya da myo-inositol deposu olarak rol almazlar. Bunların temel rolü, hücre zarı yapısının sağlamlığı ve bütünlüğünü sağlamaktır. Myo-inositol fosfatlar metabolik parçalanma için enzim substratı, enzim inhibitörleri ve dolayısıyla ilaç olarak kullanılabilirler (Laumen ve Ghisalba,

1994). Bu bileşiklerin kimyasal sentezi oldukça zordur (Billington, 1993). Dolayısıyla fitazlar bu özel myo-inositol fosfat türevlerinin endüstriyel üretimi için kullanılır.

Materyal ve Metot

Materyal

Araştırmada kullanılan bakteri örnekleri Çukurova Üniversitesi kampüsünden dört farklı Legüm bitkisinin (akasya ağacının) bulunduğu topraklardan izole edilmiştir.

Metot

Tüm saflaştırma basamakları 0-4°C'de yapılmıştır. Islak buğday ekstraktında büyütülen bakteriler 30 dakika boyunca 7000xg'de santrifüjle toplanmıştır. Daha sonra süpernatant alınmış ve üzerine son konsantrasyonu 1mM olacak şekilde CaCl₂ eklenmiştir. Enzim üzerine 3 hacim soğuk etanol eklenmiş ve çökme için buzdolabında bir gece bekletilmiştir. Presipitat 1800xg'de 20 dakika santrifüjle toplanmış ve toplanan presipitat soğuk etanolle tekrar yıkanmıştır. Ardından bir defa da soğuk asetonla yıkanmıştır. Fazla aseton azot gazı akımı ile uzaklaştırılmış ve kurutmaya liyofilizasyonla devam edilmiştir. Kuru presipitat bu şekilde buzdolabında saklanmıştır. Bu şekilde enzimin kısmi saflaştırılması yapılmıştır (Kim ve ark., 1998).

Fitaz enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi amacıyla %10'luk SDS-PAGE elektroforez kullanılmıştır. Standart protein olarak Amresco K494-500UL kullanılmıştır. Marker protein içinde moleküler ağırlıkları farklı olan 4 protein bant oluşmuştur.

Enzim proteinleri 1:3 oranında örnek tamponu içinde çözülmüş ve 20 mikrolitrelik miktarlarda çukurlara uygulanmıştır. Örnekler jelle uygulandıktan sonra alt ve üst rezervuara elektroforez tamponu doldurularak 100 mA voltajda izleme boyası jel tabanının 2-3 cm üzerine gelinceye kadar separe edilmiştir.

SDS-PAGE jeli elektroforez işleminden sonra CBB R-250 protein boyası ile boyanmış, fazla boya geri alınmıştır (Bollag ve Edelstein, 1991).

Araştırma Bulguları

Bacillus sp.'den izole edilen fitaz enziminin pH 3'de absorbans değeri 0.070 olarak ve aktivite yüzdesi 12 olarak hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi pH 3'ten sonra pH 6'ya kadar giderek artmıştır. Enzim enyüksek aktivitesini pH 6'da göstermiştir. pH 6'da enzimin absorbans değerinin 0.576 olduğu görülmüştür. pH 7'de enzim aktivitesinin azaldığı ama bu azalışın çok fazla olmadığı görülmektedir. pH 7'den sonra enzim aktivitesi hızlı bir şekilde düşmüştür. pH 9'da absorbans değerinin 0.096 ve aktivite yüzdesinin 17 olduğu görülmüştür. SDS-PAGE elektroforez sonuçlarına göre 60kDa ve 53 kDa olmak üzere iki bant gözlenmiştir.

Tartışma ve Sonuçlar

Endüstride faydalı olan ve ticari olarak kullanılan enzimlerin bazı avantajlara sahip olması gerekmektedir. Buna göre bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilmesi için işlem maliyeti bakımından ucuz olması, fiziksel ve kimyasal koşullara bağlı olmadan aktivitesini en yüksek düzeyde koruması ve mümkün olan en uzun süreyle sürdürmesi, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olması, alerjik ya da toksik etkiye sahip olmaması, yani güvenilir olması gerekir (Sarıkaya,1995).

Endüstriyel alanda kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kökenli olmakla birlikte ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan izole edilmektedirler. Bunun nedeni, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve daha ucuz olmaları, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilmesi gibi avantajlara sahip olmasıdır (Wiseman, 1987; Horikoshi, 1996).

Fitazlar; (myo-inositol-hexakis fosfat fosfohidrolazlar) asit fosfataz enzimleridir; etkili olarak fitik asitten fosfatı ayırır ve myo-inositol ve inorganik fosfat oluştururlar (Mitchell ve ark., 1997).

Fitazlar son 15 yıldır biyoteknoloji, çevresel koruma, besin alanlarında hem bilim adamları hem de girişimcilerin ilgisini çekmektedir (Lei ve Stahl, 2001).

Domuz ve kümes hayvanlarının basit yapıları midelerinden dolayı (Bitar ve Reinhold, 1972), bu hayvanlar, yemlerinde kullanılan tohumlardaki fitat fosfatını kullanamazlar ve diyetlerine inorganik fosfat eklenmesi oldukça pahalıdır. Ayrıca diyetlerde kullanılan fitat fosforu bu hayvanlar tarafından dışkı ile atılır ve bu da fosfor kirliliğine neden olur (Sweeten, 1992). Hindistan'da hayvan yemlerine dikalsiyum fosfat (DCP) eklenmektedir ve fitazın %50-60 DCP'nin yerini aldığı görülmüştür.10 kg DCP'nin 250 gr fitaz enzimine karşılık geldiği tahmin edilmektedir.

Bunların yanı sıra fitazlar, fitatların parçalanmasıyla oluşan spesifik ürünlerin ekonomik olarak üretimi için önemlidir. Fitazlar, myo-inositol-hexafosfat'ın sıralı hidrolizini gerçekleştirerek, myo-inositol fosfat üretimini sağlarlar (Greiner ve Konietzy, 1999).

Son yıllarda endüstriyel öneminden dolayı hem bilim adamları, hem de girişimcilerin ilgisini çektiği için çalışmalarımızda fitaz enzimi üretimi amacıyla *Bacillus* sp. örnekleri izole edilerek, bunlardan en iyi sonucu veren suş kullanılmıştır. Bu amaçla Çukurova Üniversitesi kampüsünden Legüm bitki köklerinin bulunduğu topraklardan izole edilen *Bacillus* sp. bakterisinin fitaz enzim aktivitesi analizleri yapılmıştır.Liu ve ark. (1998), legüminöz bitkilerinin olduğu topraklardan bazı bakteriyel strainleri izole etmişlerdir.

Liu ve ark. (1998) fitazın moleküler ağırlığının organizma türlerine bağlı olarak 35-700 kDa arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Tambe ve ark. (1994) *Klebsiella aerogenes* fitazının moleküler ağırlığının 700 kDa; Greiner ve ark. (1997) *Klebsiella terrigena* fitazının moleküler ağırlığının 40 kDa olduğunu bulmuşlardır. Shimuzi (1992) *Bacillus subtilis*'e ait fitazın moleküler ağırlığının 38 kDa olduğunu rapor etmişlerdir. Powar ve Jagannathan (1982) yaptıkları çalışmada, *Bacillus subtilis*'den izole ettikleri fitazda birbirine yakın iki protein bandı bulmuşlardır. Her iki

bandın da fitaz aktivitesi verdiğini görmüşlerdir. Bu iki izozimin bakteri tarafından üretilebileceğini düşünmüşlerdir. Kim ve ark. (1998) *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından üretilen fitazın 44 kDa olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada *Bacillus* sp.'den izole edilen fitazın SDS_PAGE analizi sonucu moleküler ağırlığı 60kDa ve 53 kDa olarak saptanmıştır (Şekil 4.7).

Enzim karakterizasyonunda bir diğer parametre enzimin aktivite gösterdiği pH aralığının saptanması ve optimum pH'ın belirlenmesidir. Fitazların optimum pH'ları 2,2'den 8'e kadar değişmektedir. Çoğu mikrobiyal fitazlar, özellikle de fungal orijinliler 4,5 ile 5,6 arasında değişen optimum pH'a sahiptir. Çoğu fungal fitazlara zıt olarak *Aspergillus fumigatus* fitazı geniş bir aralıkta optimum pH'a sahiptir. Bu suşlarda pH 4.0 ve 7.3 arasında yüksek aktivite gözlenmiştir. Bazı bakteriyel fitazlar özellikle *Bacillus* suşlarından elde edilenler, 6.5-7.5 pH optimumuna sahiptirler (Kerovuo, 2000). Yaptığımız çalışmada *Bacillus* sp.'ye ait fitazın pH 3-9 arasındaki aktiviteleri incelenmiştir. Spektrofotometrik analizler sonucunda pH 6'da enzimin maksimum aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Benzer sonuçlar farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Powar ve Jagannathan (1982) *Bacillus subtilis*'ten izole edilen fitazın optimal pH aralığının 6-6.5 olduğunu, Kim ve ark. (1998) *Bacillus* sp. DS 11'e ait fitazın pH 7.5'te maksimum aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Buğdaydan elde edilen hazır fitazda ise pH 5'te maksimum aktivite gözlenmiştir. Lim ve ark. (1973) buğday unundan elde ettikleri fitazın maksimum pH'ının 5.6 olduğunu bulmuşlardır. Bitki tohumu fitazlarındaki optimum pH 4.0-7.5 arasındadır. Çoğu ise 4.0 ve 5.6 arasında değişen optimum pH'a sahiptir. Zambak poleni (Hara ve ark. 1985), ve legüm tohumunda (Scot, 1999) yaklaşık pH 8'de maksimum aktivite gösteren 2 alkali bitki fitazı bulunmuştur.

Kaynaklar

- BILLINGTON, D. C. (1993) The Inositol Phosphates. Chemical Synthesis and Biological Significance. Verlag Chemie, Weinheim.
- BITAR, K., REINHOLD, J.G., (1972) Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf and man. *Biochim. Biophys. Acta* 268:442-452.
- BOLLAG, D.M, ve EDESISTEIN, S.J., 1991. *Proteins Methods*. Wiley-Liss Press, USA, Sayfa: 180
- GREINER, R., HALLER, E., KONIETZNY, U. and JANY, K. D. (1997) Purification and characterization of phytase from *Klebsiella terrigena*. *Arch. Biochem. Biophys.* 341, 201-206.
- GREINER, R., KONIETZNY, U. (1999) Improving enzymatic reduction of myo-inositol phosphates with inhibitory effects on mineral absorption in black beans (*Phaseolus vulgaris* var. preto). *Journal of Food Processing and Preservation* 23:249-261
- HARA, A., EBINA, S., KONDO, A. and FUNAGUMA, T. (1985) A new type of phytase from pollen of *Typha latifolia* L. *Agric. Biol. Chem.* 49, 3539-3544.
- HORIKOSHI, K., (1996) Alkaliphiles from an industrial point of view. *Fems Microbiol. Rev.*, 18, pp. 259-270.

- KEROVNO, J. (2000) A novel phytase from Bacillus. Characterization and production of the enzyme. Doktora Tezi, Helsinki 2000.
- KEROVUO, J., LAPPALAINEN, I., REINIKAINEN, T. (2000). The metal dependence of Bacillus subtilis phytase. Biochemical and Biophysical Research Communications 268, 365-369.
- KIM, Y. O., KIM, H. K., YU, J. H. and OH, T. K. (1998) Purification and properties of a thermostable phytase from Bacillus sp. DS 11. Enzyme Microbiol. Technol. 22, 2-7.
- LAUMEN, K. and GHISALBA, O. (1994) Preparative scale chemo-enzymatic synthesis of optically pure D-myo-inositol 1-phosphate. Biosci. Biotech. Biochem. 58, 2046-2049.
- LEI, X.G., STAHL, C.H., (2001) Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57:474-481.
- LIM, P.E. AND TATE, M.E., (1973) Properties of phytase fractions F₁ and F₂ from wheat bran and the myo-inositol phosphatase produced by fraction F₂. Biochim. Biophys. Acta 302, 316-328.
- LIU, B., RAFIQ, A., TZENG, Y. and ROB A. (1998) The induction and characterization of phytase and beyond. Enzyme and Microbial Technology 22:415-424.
- MITCHELL, D.B., VOGEL, K., WEIMANN, B.J., PASAMONTES, L., VON LOON, A.P.G.M., (1997) The phytase subfamily of histidine acid phosphatases, isolation of genes for two novel phytases from the fungi Aspergillus terreus and Myceliophthora. Microbio. UK 143, 245-252.
- PALLAUF, J. and RIMBACH, G. (1996) Nutritional significance of phytic acid and phytase. Arch. Anim.Nutr. 50, 301-319
- POWAR, V. K. and JAGANNATHAN, V. (1982) Purification and properties of phytate-specific phosphatase from Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 151, 1102-1108.
- REDDY, N. R., PIERSON, M. D., SAHTE, S. and SALUNKHE, D. K. (1989) Phytates in cereals and legumes. CRC Pres, Inc., Boca Raton, Fla.
- SCOTT, J. J. (1991) Alkaline phytase activity in nonionic detergent extracts of legume seeds. Plant Physiol. 95, 1298-1301.
- SHIMIZU, M. (1992) Purification and characterization of phytase from Bacillus subtilis (natto) N-77. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56, 1266-1269.
- SHIMIZU, M. (1993) Purification and characterization of phytase and acid phosphatase by Aspergillus oryzae K1. Biosci. Biotech. Biochem. 57, 1364-1365.
- SIMELL, M., TRUNEN, M., PIIRONEN, J. and VARA, T. Feed and food applications of phytase. Lecture at 3rd Meet. Industrial Applications of Enzymes, Barcelona, Spain. 1989.
- SWEETEN, J.M. (1992) Livestock and poultry waste management: a national overview in: BLAKE, J.D., MAGETTE, W. (eds) National livestock, poultry

- and aquaculture waste management. Amer Soc. Agric. Eng. St Joseph, Minnesota, pp:4-15.
- TAMBE, S. M., KAKLIJ, G. S., KELKAR, S.M. and PAREKH, L. J. (1994) Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*; evidence for unusually small active enzyme peptide. *J.Ferment. Bioeng.* 77, 23-27.
- WISEMAN, A. (1987) The application of enzymes in industry. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Second edition. Chapter 3.
- WODZINSKI, R. J. and ULAH, A. H.J. (1996) Phytase. *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 263-302.