



Mikrobiyal Fitazlar, Uygulama Alanları ve Biyoteknoloji

Meltem AŞAN¹

Geliş Tarihi: 01.11.2006

Öz: Fitazlar, (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase, EC 3.1.3.8) fitatdan fosfatların serbest kalmasını katalizlerler. Birçok tahıl tanesi, baklagiller ve yağlı tohumlar fosforu fitat olarak depolarlar. Fitazlar; bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Ancak mikrobiyal kaynaklı olanlar ticari kullanımlar ve biyoteknolojik uygulamalar için en ümit verici olanıdır. Bu enzim, fosfor beslenmesini artırmak ve hayvansal atıkların oluşturduğu fosfor kirliliğini azaltmak amaçları ile hayvan beslemede yaygın olarak kullanılmaktadır. Fitazlar aynı zamanda gıda sanayinde, myo-inositol fosfatların hazırlanmasında, kağıt endüstrisinde ve toprak iyileştirmede de kullanılmaktadır. Biyoteknoloji, iyileştirilmiş özellikleriyle yeni fitazların geliştirilmesinde kullanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyal fitaz, fitat, yem ve gıda katkısı, biyoteknoloji

Microbial Phytases, Applications and Biotechnology

Abstract: Phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase, EC 3.1.3.8) catalyze the release of phosphate from phytate. Several cereal grains, legumes and oilseeds store phosphorus as phytate. Phytases can be produced from plants, animals and microorganisms. Microbial sources, however, are most promising for commercial exploitations and biotechnological applications. The enzyme has been widely used in animal feeding to improve phosphorus nutrition and to reduce phosphorus pollution of animal waste. Phytases have been also used in food industry, preparation of myo-inositol phosphates, paper industry and as a soil amendment. Biotechnology are using for developing new effective phytases with improved properties.

Key Words: Microbial phytase, phytate, feed and food additives, biotechnology

Giriş

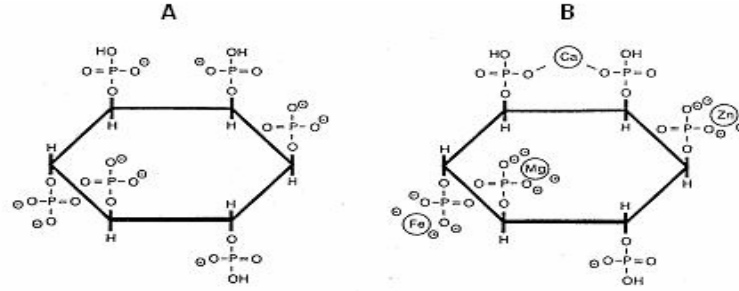
Tahıl ve baklagil tohumlarının olgunlaşması sırasında fitik asitin (myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis dihidrojen fosfat) önemli bir miktarı birikmekte olup (Honke ve ark. 1998) bu tohumların çoğunda ve yan ürünlerinde %1-2 fitik asit bulunmaktadır (Reddy ve ark. 1982). Fitik asit; tahıl, baklagil ve yağlı tohumlarda fosforun ana depo formudur. Kimyasal olarak tam tarifi myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hekza-dihidrojen fosfat'tır (IUPAC-IUB 1977). Moleküler formülü ise $C_6H_{18}O_{24}P_6$ 'dır. Fitik asitin tuzları fitat olarak tanımlanır. Fitat, fitik asitin potasyum-magnezyum ve kalsiyum tuzlarının karışımıdır (Vohra ve Satyanarayana 2003) (Şekil 1).

Fitaz (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase), fitik asiti (myo-inositol heksafosfat), inorganik monofosfat, myo-inositol fosfat ve serbest myo-inositol'e hidrolize eden enzimdir (Kerovuo 2000) (Şekil 2). Bitkilerde, hayvansal dokularda ve çeşitli mikroorganizmalarda fitaz aktivitesinin olduğu bildirilmiştir (Miksch ve ark. 2002).

Fitatı parçalayan enzimler IUPAC-IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry) tarafından iki sınıfa ayrılmıştır: Fitatın D3 pozisyonundaki ortofosfatı uzaklaştıran 3-fitaz (myo-inositol-hekzakisfosfat 3-fosfohidrolaz, EC 3.1.3.8) ve myo-inositol halkasındaki L-6 (D-4) pozisyonundaki defosforilasyonu sağlayan 6-fitaz (myo-inositol-hekzakisfosfat 6-fosfohidrolaz, EC 3.1.3.26). Mikrobiyal fitazlar genellikle 3-fitaz sınıfında yer alırken bitkisel kökenli fitazlar 6-fitaz sınıfında yer almaktadır (Konietzny ve Greiner 2002).

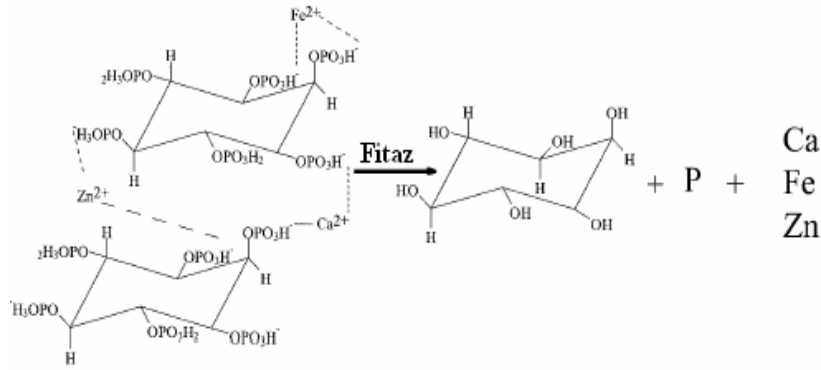
Fitatı parçalayan enzimlerle yem hammaddelerinde ve insanlar için hazırlanan gıdalardaki fitat içeriğini azaltmak amacıyla özellikle son yıllarda birçok çalışma yürütülmektedir. Fitatı parçalayan enzimler bitkisel materyalin besleyici değerini artırmak amacı ile tavsiye edilmektedir. Son yıllarda fitaz enzimlerinin özellikle entansif hayvan yetiştiriciliği yapılan alanlarda hayvan gübresiyle ortaya

¹ Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Zootekni Bölümü-Adana



Myo-inositol hekzafosforik asit

Şekil.1. Fitik asitin (A) ve fitik asit şelatının (fitat'ın) (B) yapısı (Anonim, 2006)



Şekil 2. Fitatın, fitaz enzimi ile inositol, fosfat ve diğer elementlere hidrolizi (Lei ve Porres 2003)

çıkan fosfor kirliliğini azaltmak amacıyla kullanımını da gündeme getirmiştir. Yapılan bir çok çalışmada fitatı parçalayan enzimlerin fitatdan fosfor kullanımını artırmakta olduğu ve çevrede ortofosfat birikimini önemli derecede azalttığı bildirilmiştir (Cromwell ve ark. 1995, Simons ve ark. 1990). Ayrıca bunların yanı sıra myo-inositol fosfatların hazırlanması, kağıt endüstrisi ve toprak iyileştirme alanlarında da fitaz enzimi kullanılmaktadır. Ayrıca son yıllarda biyoteknoloji alanındaki gelişmeler sonucunda heterolog mikrobiyal ekspresyon sistemleriyle büyük miktarlarda ve düşük maliyetli fitaz üretimi de mümkün olabilmektedir.

Mikrobiyal fitazlar: Fitaz enzimi bitkilerde, mikroorganizmalarda ve bazı hayvansal dokularda bulunmasına rağmen yapılan son araştırmalar mikrobiyal fitazların biyoteknolojik uygulamalar için en ümit verici olduğunu göstermiştir (Pandey ve ark. 2001, Vohra ve Satyanarayana 2003). Bakteri, maya ve funguslardan fitaz enzimleri karakterize edilmiş olup, günümüzde ticari olarak üretimde toprak fungusu olan *Aspergillus* üzerinde durulmaktadır. Ancak substrat spesifitesi, proteolise karşı direnç göstermesi ve katalitik aktivitesi gibi özelliklerinden dolayı bakteriyel

fitazlar, fungal enzimlere alternatif oluşturabilmektedir (Konietzyn ve Greiner 2004).

Bakteriyel fitazların ortalama olarak moleküler ağırlığı (40-55 kDa) glukolizasyon farkı olduğu için fungal fitazlardan (80-120 kDa) daha küçüktür (Choi ve ark. 2001, Golovan ve ark. 2000, Han ve Lei 1999, Kerovu ve ark. 1998, Rodriguez ve ark. 2000a, Van Hartingveldt ve ark.1993).

İzole edilen fitazların çoğunun pH optimumu 4.5-6.0 arasında yer almaktadır. Ancak *Bacillus* sp.'ye ait nötral veya alkali fitazlar da bulunmaktadır (Choi ve ark. 2001, Kim ve ark. 1998). *A. niger* fitazının (phyA) pH optimumu ise asidik sınırlarda olup 2.5 ve 5.5'dir. Bu iki sınır arasında aktivitede azalma meydana gelmektedir. Mikrobiyal fitazların çoğunun sıcaklık optimumu ise 45-60°C arasında yer almaktadır. Ancak Pasamontes ve ark. (1997a,b) *A. fumigatus*'a ait sıcaklığa dirençli fitazın 100°C'ye kadar olan sıcaklıklarda 20 dakikalık inkübasyonlarda sadece %10'luk kayıpla aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir. Mikrobiyal fitazların bazı özellikleri Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Mikrobiyal fitazların bazı özellikleri

Fitaz Kaynağı	pH optimumu	Sıcaklık optimumu (°C)	Spesifik aktivite (U/mg)
<i>Aspergillus niger</i>	2.2, 5.0-5.5	55-58	50-103
<i>Aspergillus terreus</i>	5.0-5.5	70	142-196
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5.0-6.0	60	23-28
<i>Aspergillus oryzae</i>	5.5	50	11
<i>Aspergillus caespitosus</i>	5.5	80	-
<i>Emericella nidulans</i>	6.5	-	29-33
<i>Myceliophthora thermophila</i>	5.5	-	42
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	6.0	65	110
<i>Penicillium simplicissimum</i>	4.0	55	3
<i>Penicillium lycii</i>	5.5	58	1080
<i>Cladosporium</i>	3.5	40	909
<i>Pichia anomala</i>	4.0	60	-
<i>Candida krusei</i>	4.6	40	1210
<i>Escherichia coli</i>	4.5	55-60	811-1810
<i>Klebsiella terrigena</i>	5.0	58	205
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5.0, 5.5	50, 60	224, 297
<i>Klebsiella aerogenes</i>	4.5, 5.2	68	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	4.5	60	23
<i>Citrobacter braaki</i>	4.0	50	3457
<i>Pseudomonas syringae</i>	5.5	40	769
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	4.0	45	-
<i>Bacillus subtilis</i>	6.5-7.5	55-60	9-15
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	7.0-8.0	70	20

E. coli ve *Citrobacter braakii* fitazı, ticari olarak kullanılan *Aspergillus niger* fitazına kıyasla pepsin ve pankreatine daha dirençlidir (Kim ve ark. 2003; Rodriquez ve ark. 1999). Ayrıca *C. braakii* fitazı tripsine de dirençlidir (Rodriquez ve ark. 1999). *E. coli* fitazı, *Bacillus* fitazı ile karşılaştırıldığında, pankreatine benzer hassasiyetlik gösterirken pepsine karşı daha hassastır (Simon ve Igbasan 2002). *E. coli* ve *C. braakii* fitazları yem katkısı olarak uygun özelliklere sahiptirler. *E. coli* fitazı asidik koşullar altında yüksek bir pH stabilitesine sahip olup pH 2.0'de birkaç saat sonunda bile önemli bir aktivite kaybı göstermemektedir (Greiner ve ark. 1993).

Fitaz Enziminin Uygulama Alanları

Yem katkısı: Fitat, tohumların çimlenmesi sırasında enerji ve fosfor kaynağı olarak görev alsa da bağlı fosfor tek mideli hayvanlarca çok az miktarda kullanılabilir. Bu nedenle inorganik fosfor yenilenemez ve pahalı bir mineral olup kanatlı, domuz ve balık rasyonlarında fosfor kaynağı olarak ilave edilmektedir (Lei ve Porres 2003).

Fitat ve fitata bağlı fosfor tüm kanatlı rasyonlarında bulunmakta ve fitat fosforunun da

kısmen kullanıldığı bilinmekteydi (Lowe ve ark. 1939). İlk olarak Warden ve Schaible (1962), broylerde, ekzogen olarak verilen fitazın, fitat fosforunun kullanımını ve kemikteki mineralizasyonu artırdığını bildirmişlerdir. Ancak bundan yaklaşık 30 yıl sonra, yem katkısı olarak, fitata bağlı fosforu serbest bırakacak ve fosfor atığını azaltacak *Aspergillus niger* fitazının ticari olarak kullanımı başlamıştır. Günümüzde tek mideli hayvanlarda yem katkısı olarak fitaz kullanımı oldukça yaygınlaşmış olup hatta nişasta tabiatında olmayan polisakkaritleri parçalayan enzimlerden daha fazla kullanılmaktadır (Bedford 2003). Geçtiğimiz 10 yıl içerisinde kanatlı ve domuz rasyonlarında mikrobiyal fitaz kullanımı ile bu konudaki bilimsel çalışmalar ve deneyimler artmakta ve yem katkısı yeni fitaz enzimleri araştırılmakta ve kullanılmaktadır. Bazı kanatlı yem maddelerindeki toplam fosfor, fitat fosforu ve toplam fosfordaki fitat fosfor oranları Çizelge 2'de verilmiştir. Ruminantlar ise, rumendeki mikrobiyal flora tarafından üretilen fitaz enzimi ile fitatı parçalayabilmektedirler (Yanke ve ark. 1998). Fitatın parçalanması ile açığa çıkan fosfor hem mikrobiyal flora hem de konakçı ruminant tarafından kullanılmaktadır.

Çizelge 2. Bazı kanatlı yem hammaddelerindeki toplam fosfor, fitat fosforu ve toplam fosfordaki fitat fosfor oranları

Yem Maddesi	Toplam P (g/kg)	Fitat-P (g/kg)	Oran (%)
Tahıllar			
Arpa	3.21	1.96	61.0
Mısır	2.62	1.88	71.6
Sorgum	3.01	2.18	72.6
Buğday	3.07	2.19	71.6
Yağlı Tohum Küspeleri			
Kanola küspesi	9.72	6.45	66.4
Pamuk tohumu küspesi	10.02	7.72	77.1
Soya fasulyesi küspesi	6.49	3.88	59.9
Yan Ürünler			
Pirinç kepeği	17.82	14.17	79.5
Buğday kepeği	10.96	8.36	76.3

Birçok farklı kaynaktan elde edilen mikrobiyal fitaz ürünleri günümüzde ticari olarak kullanılmaktadır. Bunlar arasında yem katkıları olarak en yaygın olarak kullanılanları *A. niger* (3-fitaz), *Peniophora lycii* (6-fitaz) ve *Escherichia coli* (6-fitaz) fitazlarıdır. Kanatlı rasyonlarına fitaz, granül veya sıvı formda veya yüksek peletleme sıcaklığındaki (>80°C) enzim denatürasyonu probleminde kaçınmak için peletleme sonrasında uygulanabilmektedir (Selle ve Ravindran 2006).

Bitkisel fosfor kaynaklarındaki kullanılmayan fitat fosforu zaman içerisinde birikmekte ve entansif olarak hayvan yetiştiriciliği yapılan alanlarda çevre kirliliğine neden olmaktadır. Topraktaki aşırı fosfor deniz ve göllere akmakta ve burada yaşayan canlılarda birikerek insanlarda da nerotoksik etki oluşturmaktadır (Lei ve Porres 2003).

Su ürünleri üretiminde, soya küspesi ve diğer bitki kökenli küspeler kullanılarak birçok çalışma yürütülmüştür (Mwachireya ve ark. 1999). Pahalı protein kaynakları yerine daha düşük fiyatlı bitkisel protein kaynakları kullanıldığında masraflarda önemli derecelerde azalmaların olabildiği bildirilmektedir. Balık üretim masraflarının %70'ini yem giderleri oluşturmaktadır (Rumsey 1993). Kanatlı ve domuzlarda olduğu gibi balıklarda yem maddeleri içerisindeki fitin fosforundan yararlanacak sindirim enzimine sahip olmadığından suda fosfor birikimi meydana gelmektedir. Bu nedenle fitaz su ürünleri üretiminde, hem düşük fiyatlı bitkisel kökenli maddelerin kullanımını artırmak hem de suda fosforu kabul edilebilir seviyede tutabilmek amaçları ile kullanılmaktadır. Balık beslemesinde, yüksek seviyelerde bitkisel kökenli maddeler içeren yemlerde fitaz enziminin kullanılması ile ilgili birçok çalışma yürütülmektedir (Robinson ve ark. 1996, Mwachireya ve ark. 1999).

Gıda sanayi : Fitik asit tuzları olarak tanımlanan fitatlar, bitki tohumları ve danelerde fosfat ve inositolün başlıca depo formudur. Fitat bitki tohumlarının olgunlaşması sırasında oluşur ve olgun tohumlarda toplam fosfatın %60-90'nını oluşturur (Loewus 2002). Fitat bu nedenle bitkisel kökenli gıdaların başlıca bileşenidir. Bazı bitkisel kökenli gıdalardaki kuru maddedeki fitat miktarı Çizelge 3'de verilmiştir. Diyetlerdeki bitki kökenli gıdaların miktarına ve gıdaların işleme derecelerine bağlı olarak günlük fitat tüketimi en fazla 4500 mg'a kadar yükselmelidir. Ortalama olarak vejetaryen diyetlerinde ve gelişmekte olan ülkelerde kırsal kesimlerde günlük fitat tüketimi yaklaşık 2000-2600 mg olup bu değer karışık diyetlerde 150-1400 mg'dır (Reddy 2002).

Diyetlerde fitatın varlığı ile ilgilenilmesinin nedeni mineral alımındaki negatif etkisidir. Bu mineraller çinko, demir, kalsiyum, magnezyum, manganez ve bakırdır (Konietzny ve Greiner 2003, Lopez ve ark. 2002). Fizyolojik pH değerlerinde çözünmez mineral-fitat komplekslerinin oluşumu düşük mineral emiliminin temel nedeni olarak bildirilmektedir. Çünkü bu kompleksler aslında insan sindirim sisteminde absorbe olmamaktadır. Ayrıca sindirim sisteminin üst kısmında sınırlı miktarda mikrobiyal popülasyonun olması ve içsel fitatı hidrolize edici enzimlerin olmaması nedenleri ile ince bağırsakta, fitat çok sınırlı miktarda hidroliz olabilmektedir (Iqbal ve ark. 1994).

Fitat, asidik ve alkali pH'da proteinlerle kompleks oluşturmaktadır (Cheryan 1980). Bu interaksyon proteinin yapısında değişiklikler meydana getirmekte ve bunun sonucunda enzimatik aktivitede, proteinin çözünürlüğünde ve proteolitik parçalanmada azalmalar meydana gelebilmektedir.

Çizelge 3. Bazı bitkisel kökenli gıdalardaki fitat miktarı (kurumadede)

Gıda	Fitat (mg/g)
Karma unlu ekmek (%70 buğday, %30 çavdar)	0.4-1.1
Karma unlu ekmek (%70 çavdar, %30 buğday)	0-0.4
Buğday ekmeği	3.2-7.3
Mayasız buğday ekmeği	10.6-3.2
Çavdar ekmeği	4.3-8.2
Mayasız çavdar ekmeği	12.2-19.3
Yulaf kepeği	7.3-2.1
Mısır	9.8-21.3
Pirinç (kabuksuz, pişmiş)	1.2-3.7
Pirinç (kabuklu, pişmiş)	12.7-21.6
Sorgum	5.9-11.8
Nohut (pişmiş)	2.9-11.7
Börülce (pişmiş)	3.9-13.2
Soya fasulyesi	9.2-16.7
Mercimek (pişmiş)	2.1-10.1
Yeşil fasulye (pişmiş)	1.8-11.5
Yerfıstığı	9.2-19.7

Fitaz enzimi yem katkısı olarak kullanılmasının yanı sıra gıda sanayinde de büyük bir potansiyele sahiptir. Ancak şimdiye kadar marketlerde fitaz enzimi kullanılmış gıdalar bulunmamaktaydı. Bu alandaki çalışmalar, gıda işlemede teknik geliştirmenin yanı sıra bitki kökenli gıdaların besleyici değerlerinin artırılması üzerine yoğunlaşmıştır. Fitat içeriği yüksek diyetler mineral maddelerin absorpsiyonunu oldukça azaltmakta (Konietzny ve Greiner 2003, Lopez ve ark. 2002) ve gıdaların işlenmeleri sırasında fitatın defosforilasyonu, sadece kısmen fosforile olmuş myo-inositol fosfat esterlerinin oluşmasına neden olmaktadır (Sandberg ve ark. 1999, Sandström ve Sandberg 1992, Han ve ark. 1994). Myo-inositol fosfat esterleri insanlar için önemli fizyolojik özelliklere sahiptir (Shears 1998). Bu nedenle fitaz enziminin gıda üretimi sırasında kullanılması ile fonksiyonel gıdaların üretilmesi mümkün olacak (Greiner ve ark. 2002) ve böylelikle fitaz enzimi ile biyokimyasal olarak aktif myo-inositol fosfat esterleri oluşacak ve insanlarda mineral maddelerin emilmesi de sağlanmış olacaktır. Gıda sanayinde gıdaların işlenmesi sırasında fitaz ilavesi ekmek yapımı (Haros ve ark. 2001), bitkisel protein izolatlarının üretimi (Fredrikson ve ark. 2001, Wang ve ark. 1999) ve tahıl kepeklerini parçalamada kullanılmaktadır (Kvist ve ark. 2005).

Gıda işleme ve hazırlama sırasında, fitat genel olarak, bitkilerde ve mikroorganizmalarda doğal olarak bulunan fitazlarla tamamen hidrolize olmamaktadır. Özellikle demir olmak üzere minerallerin yararlanımını artırmak için fitat çok düşük düzeylere indirilmelidir (Hurrell 2003).

Myo-inositol fosfatların hazırlanması: Günümüzde, transmembran sinyalizasyonunda ve

intraselüler kaynaklardan kalsiyumun hareketini sağlamada görev alan inositol fosfat ve fosfolipidlere olan ilginin artması, çeşitli inositol fosfatların hazırlanmasını gündeme getirmiştir (Billington 1993). *S. cerevisiae* fitazı kullanılarak fitik asitin enzimatik hidrolizi ile D-myo-inositol 1,2,6-trifosfat, D-myo-inositol 1,2,5-trifosfat, L-myo-inositol 1,3,4-trifosfat ve myo-inositol 1,2,3-trifosfatların hazırlandığı bildirilmiştir (Siren 1986a). Ayrıca *E. coli* fitazı kullanılarak inositol 1,2,3,4,5-pentakisfosfat, inositol 2,4,5-trifosfat ve inositol 2,5-bifosfat da hazırlanmaktadır (Greiner ve Konietzny 1996). İnositol fosfat türevleri enzim stabilizatörü (Siren 1986b), enzim inhibitörü, biyokimyasal ve metabolik araştırmalarda enzim substratı ve ilaç olarak da kullanılmaktadır (Laumen ve Ghisalba 1994). İnositol fosfat karışımları eklem iltihabı ve astım gibi solunum hastalıklarına karşı kullanıldığı ve spesifik inositol trifosfatların ağrı kesici olarak önerildiği de bildirilmiştir (Siren 1998).

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

Kağıt endüstrisi: Kağıt endüstrisinde bitki fitik asitinin uzaklaştırılması oldukça önemlidir. Günümüzde termostabil fitazlar, kağıt hamuru ve kağıt yapma aşamalarında fitik asiti parçalamak amacıyla kullanılan biyolojik maddelerdir. Fitik asitin enzimatik olarak parçalanması sonucunda kanserojen veya toksik maddeler içeren ürünler oluşmaz. Bu nedenle kağıt endüstrisinde fitaz enzimlerinin kullanımı, daha temiz bir teknolojinin kullanılmış olması ve dolayısıyla çevreyi koruma açısından önem taşımaktadır (Liu ve ark. 1998).

Toprak iyileştirme: Bazı alanlarda toprakta, fitik asit ve türevleri toplam organik fosforun %50'sini oluşturabilmektedir (Dalal 1978). Findenegg ve Nelemans (1993), mısır bitkisi için topraktaki fitik asitten fosforun kullanılabilmesinde fitazın etkisini araştırmışlardır. Toprağa fitaz ilave edildiğinde fitinin parçalanma oranının artmasına bağlı olarak büyümeyi uyardığını bildirmişlerdir. Bu çalışma bitkilerin köklerinde fitaz geninin ekspresyonu ile transgenik bitkilerle topraktaki fosforun kullanılabileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır (Day 1996).

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

Yem katkısı olarak kullanılan fitaz enzimi hayvanın sindirim sisteminde fitat fosfatının serbest kalmasında etkin, yem hammaddelerinin işlenmesi ve depolanması sırasında yüksek sıcaklıkla aktivitesini kaybetmeye karşı dirençli ve üretimi ucuz olmalıdır. Yemlerin peletlenmesi sırasında uygulanan 65-95°C'lerdeki sıcaklıklarda aktivite kaybı olmaması için termostabilite oldukça önem kazanmaktadır. Fitaz enziminin, peletlenmiş yemlere aktivite kaybı olmaması için sonradan spreyleneceği veya kimyasal olarak kaplanması yöntemleri olsa bile yem katkısı olarak termostabil fitaz enzimlerinin kullanımı daha iyi bir yöntem olacaktır. *Aspergillus fumigatus*'un fitaz enzimi sıcaklığa dirençli olarak bulunmuş ve bu da büyük bir potansiyel oluşturmuştur (Rodriguez ve ark. 2000b). Bu enzimi daha fazla miktarda üretmek, değişik substratlara karşı rekombinant enziminin reaksiyonunu belirlemek, yüksek sıcaklık ve proteaz enzimlerine karşı tepkisini ölçmek amaçları için *A. fumigatus*'un fitaz geni *Pichia pastoris*'de eksprese edilmiştir. Yapılan çalışmalar rekombinant enzimin 65-90°C'lerde, 20 dakika inkübasyon sonrasında aktivitesini %20-39 koruduğunu ve en yüksek aktiviteyi sodyum sitrata nazaran 10 ve 200 mM sodyum asetat'ta gösterdiğini bildirmişlerdir. Enzim, pepsine karşı dirençli iken yüksek seviyedeki tripsin ile parçalanmaktadır. Elde edilen bulgular sonucunda *P. pastoris*'in *A. fumigatus* fitazını yüksek seviyede üretmede konakçı olarak iyi bir potansiyel oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Yüksek bitkilerde tohum, dane ve polende fitaz enzimi bulunmaktadır (Konietzny ve Greiner 2002; Reddy ve ark. 1989). Bu enzimler çimlenme sırasında fitatın parçalanmasını sağlayarak bitkinin büyümesi ve gelişmesi için gerekli fosfat, mineraller ve myo-inositoleri sağlarlar (Reddy ve ark. 1989). Bitki

köklerinde de düşük bir fitaz aktivitesi bulunmaktadır (Li ve ark. 1997, Hübel ve Beck 1996). Köklerden üretilen fitaz, bitkinin topraktaki fosfatı kullanılmasında bir mekanizmadır. Toplam toprak fosforunun en azından %50'si fosfatın organik formları olup genelde inositol penta- ve heksakisfosfatlardır (Richardson ve ark. 2001a, Richardson ve ark. 2001b). Köklerdeki düşük fitaz aktivitesi ve rhizosfere fitaz enzimi üretilmemesi nedenleri ile fitat bitkiler tarafından oldukça az kullanılabilir (Hayes ve ark. 2000). Böylece, toprak mikroorganizmaları, bitki rhizosferinde kolonize olması ve *Bacillus* sp. ve *Enterobacter* sp. gibi ekstraselüler fitaz aktivitesi göstermeleri sonucunda, bitki gelişimini hızlandırıcı rhizobakteriler gibi bitkiye fitat fosforunun kullanımını sağlayacaktır (İdris ve ark. 2002). Günümüzde fosfatın sınırlı olduğu koşullar altında bitki beslemede toprak fitatından fosforun kullanılmasının öneminin anlaşılması ile bitki kökünde ekstraselüler olarak *Aspergillus* fitazının ekspresyonu ile fitatın bitkilerce kullanımı sağlanmış (Richardson ve ark. 2001a) ve ekstraselüler fitaz aktivitesine sahip fitaz üreten toprak mikroorganizmalarının yanı sıra bitki kökü çevresine saflaştırılmış fitaz ilavesi de yapılmıştır (İdris ve ark. 2002, Richardson ve ark. 2001b). Genetik olarak yapısı değiştirilmiş bitkilerde fitaz ekspresyonu Çizelge 4'de verilmiştir.

Ayrıca, yem katkısı olarak fitaz enzimini kullanırken karşılaşılan fiyat, peletleme sırasında uygulanan yüksek sıcaklık nedeniyle inaktivasyon, depolama sırasında aktivite kaybı gibi problemler fitaz genini domuz ve kanatlılar gibi tek mideli çiftlik hayvanlarında endojen olarak sindirim sisteminde ürettilerle de çözülebilir. Bu nedenle, *E. coli* fitazı domuzun tükürük bezlerinde klonlanmış ve tükürükte üretilmiştir.

Çizelge 4. Genetik olarak yapısı değiştirilmiş bitkilerde fitaz ekspresyonu

Konakçı bitki	Fitaz kaynağı	Doku
Tütün	<i>A. niger</i>	Yaprak (üretilmiş)
Tütün	<i>A. niger</i>	Tohum
Tütün	<i>A. niger</i>	Kök (üretilmiş)
Tütün	<i>B. subtilis</i>	Kök (üretilmiş)
Tütün	<i>B. subtilis</i>	Yaprak (üretilmiş)
Arabidopsis	<i>A. niger</i>	Kök (üretilmiş)
Arabidopsis	<i>B. subtilis</i>	Kök (üretilmiş)
Arabidopsis	<i>E. coli</i>	Tohum
Susam	<i>A. niger</i>	Kök (üretilmiş)
Soya fasulyesi	<i>A. niger</i>	Kallüs (üretilmiş)
Patates	<i>A. niger</i>	Yaprak
Pirinç	<i>A. fumigatus</i>	Tohum
Pirinç	<i>S. occidentalis</i>	Yaprak
Pirinç	<i>E. coli</i> + <i>S. ruminantium</i>	Tohum
Şeker kamışı	<i>E. coli</i>	Kallüs

Tükürükteki fitaz yemlerle alınan fitatı tamamen parçalamış ve fekal fosfat miktarını %75 azaltmıştır (Golovan ve ark. 2001a, Forsberg ve ark. 2003). Ayrıca *E. coli*'ye ait *appA* geni farelerin yine tükürük bezlerinde klonlanmış ve eksprese edilmiştir. Farelerde fekal fosfor miktarını %11 oranında azalttığı tespit edilmiştir (Golovan ve ark. 2001b).

Sonuç

Dünyada fitaz enziminin kullanımının artması nedeniyle bu enzim bilim ve teknolojinin oldukça ilgilendiği bir alan olmuştur. Fitaz enziminin ilavesi hayvanların yem hammaddeleriyle aldıkları fitat fosforundan yararlanmalarını artırmakta ve özellikle entansif hayvan yetiştiriciliği yapılan alanlarda hayvansal atıklardaki fosforun birikiminden kaynaklanan çevre kirliliğini azaltmaktadır. Ayrıca fitaz enzimi insan beslenmesine ve sağlığına olumlu katkılarda bulunmaktadır. Spesifik fitik asit veya inositol türevi ürünlerdeki gelişmeler de dikkati çekmekte ve fitaz enziminin kullanımı için yeni bir alan oluşturmaktadır. Mikrobiyal fitazlar üretimleri ve uygulanmalarının uygunluğu nedeni ile teknolojik ve ekonomik anlamda önerilmektedir. Biyoteknoloji ise fitaz enzimlerinin kullanım alanlarının artmasıyla birlikte günümüzde kullanılan ve gelecekte de bu enzimleri üretmede ve özelliklerinin geliştirilmesinde kullanılacak oldukça etkin bir teknolojidir.

Kaynaklar

- Anonim, 2006.
<http://www.ansc.purdue.edu/courses/ansc443/Classnotes/Nutrition.html> (02.08.2006).
- Bedford, M.R., 2003. New enzyme Technologies for poultry feeds. Br. Poul. Sci., 44 (Suppl. 1): S14-S16.
- Brocades, G. 1991. DNA sequence encoding phytase. Pat. EP 420 358.
- Billington, D.C. 1993. The inositol phosphates. Chemical Synthesis and Biological Significance. Verlag Chemie, Weinheim.
- Cheryan, M. 1980. Phytic acid interactions in food systems. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 13: 297-355.
- Choi, Y.M., H.J. Suh, and J.M. Kim. 2001. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. J. Prot. Chem., 20: 287-292.
- Cromwell, G.L., R.D. Coffey, G.R. Parker, H.J. Monegue and J.H. Randolph. 1995. Efficacy of a recombinant-derived phytase in improving the bioavailability of phosphorus in corn-soybean meal diets for pigs. Journal of Animal Sciences, 71: 1831-1840.
- Dalal, R.C. 1978. Soil organic phosphorus. Adv. Agronom., 29: 83-117.
- Day, P.R., 1996. Genetic modification of plants: significant issues and hurdles to success. Am. J. Clin. Nutr., 63:651S-656S.
- Findenegg, G.R. and J.A. Nelemans. 1993. The effect of phytase on the availability of P from myo-inositol hexaphosphate (phytate) for maize roots. Plant Soil, 154: 189-196.
- Forsberg, C.W., J.P. Phillips, S.P. Golovan, M.Z. Fan, R.G. Meidinger, A. Ajakaiye, D. Hilborn and R.R. Hacker. 2003. The Enviropig physiology, performance, and contribution to nutrient management advances in a regulated environment: The leading edge of change in the pork industry. J. Anim. Sci., 81(E. Suppl.2): E68-E77.
- Fredrikson, M., P. Biot, M. Larsson Alminger, N.G. Carlsson and A.S. Sandberg. 2001. Production process for high-quality pea-protein isolate with low content of oligosaccharides and phytate. J. Agric. Food Chem., 49: 1208-1212.
- Golovan, S.P., G. Wang, J. Zhang and C.W. Forsberg. 2000. Characterization and overproduction of the *Escherichia coli appA* encoded bifunctional enzyme that inhibits both phytase and acid phosphatase activities. Can. J. Microbiol., 46: 59-71.
- Golovan, S.P., R.G. Meidinger, A. Ajakaiye, M. Cottrill, M.Z. Wiederkehr, D.J. Barney, C. Plante, J.W. Pollard, M.Z. Fan, M.A. Hayes, J. Laursen, J.P. Hjorth, R.R. Hacker, J.P. Phillips and C.W. Forsberg. 2001a. Pig expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. Nature Biotechnol., 19: 741-745.
- Golovan, S.P., M.A. Hayes, J.P. Phillips and C.W. Forsberg. 2001b. Transgenic mice expressing bacterial phytase as a model for phosphorus pollution control. Nature Biotechnol., 19: 429-433.
- Greiner, R., U. Konietzky and K.D. Jany. 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys., 303: 107-113.
- Greiner, R. and U. Konietzky. 1996. Construction of a bioreactor to produce special breakdown products of phytate. J. Biotechnol., 48: 153-159.
- Greiner, R., M. Larsson Alminger, N.G. Carlsson, M. Muzquiz, C. Burbano, C. Cuadrado, M.M. Pedrosa and C. Goyoaga. 2002. Enzymatic phytate degradation-A possibility to design functional foods? Pol. J. Food Nutr. Sci., 21: 50-54.
- Greiner, R. and U. Konietzky. 2006. Phytase for food application. Food Technol. Biotechnol., 44(2): 125-140.
- Han, O., M.L. Failla, A.D. Hill, E.R. Morris and J.C. Jr. Smith. 1994. Inositol phosphates inhibit uptake and transport of iron and zinc by a human intestinal cell line. J. Nutr., 124: 580-587.
- Han, Y.M. and X.G. Lei. 1999. Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris*. Arch. Biochem. Biophys., 364: 83-90.
- Haros, M., C.M. Rosell and C. Benedito. 2001. Fungal phytase as a potential breadmaking additive. Eur. Food Res. Technol., 213: 317-322.

- Hayes, J.E., R.J. Simpson and A.E. Richardson. 2000. The growth and phosphorus utilization of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose 1-phosphate or inorganic phosphate. *Plant and Soil*, 220: 165-174.
- Honke, J., H. Kozłowska, C. Vidal-Valverde, J. Frias, and R. Górecky. 1998. Changes in quantities of inositol phosphates during maturation and germination of legume seeds. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 206: 279-283.
- Hurrell, R.F. 2003. Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. *J. Nutr.*, 133(suppl.): 2973-2977.
- Hübel, F. and E. Beck. 1996. Maize root phytase. *Plant Physiol.*, 112: 1429-1436.
- Idris, E.E., A. Farouk, R. Greiner, H. Bochow and R. Borris. 2002. Extracellular phytase activity of several *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effects. *Microbiol.*, 148: 2097-2109.
- Iqbal, T.H., K.O. Lewis, and B.T. Cooper. 1994. Phytase activity in the human and rat small intestine. *Gut*, 35: 1233-1236.
- IUPAC-IUB (Commission on Biochemical Nomenclature). 1977. Nomenclature of phosphorus containing compounds of biochemical importance. *Eur. J. Biochem.*, 79: 1-9.
- Kerovuo, J., M. Lauraeus, P. Nurminen, N. Kalkkinen and J. Apajalahti. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2079-2085.
- Kerovuo, J. 2000. A Novel Phytase from *Bacillus*. Characterization and Production of the Enzyme. Academic Dissertation, 68 p., Helsinki.
- Kim, Y., H.K. Kim, K.S. Bae, J.H. Yu and T.Oh. 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microb. Technol.*, 22: 2-7.
- Kim, H.-W., Y.O. Kim, J.H. Lee, K.K. Kim and Y.J. Kim. 2003. Isolation and characterization of a phytase with improves properties from *Citrobacter braakii*. *Biotechnol. Lett.*, 25: 1231-1234.
- Konietzny, U. and R. Greiner. 2002. Molecular and catalytic properties of phytase-degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food Sci. Technol.*, 37: 791-812.
- Konietzny, U. and R. Greiner. 2003. Phytic acid: Nutritional Impact. In: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, B. Caballero, L. Trugo, P. Finglas (Eds.), Elsevier, London, UK, 4555-4563.
- Konietzny, U. and R. Greiner. 2004. Bacterial phytase: Potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 11-18.
- Kvist, S., J.M. Carlsson, J.M. Lawther and F.B. DeCastro. 2005. Process for the fractionation of cereal brans. US patent application US 20050089602.
- Laumen, K. and O. Ghisalpa. 1994. Preparative scale chemo enzymatic synthesis of optically pure D-myo-inositol 1-phosphate. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58: 2046-2049.
- Lei, X.G. and C.H. Stahl. 2001. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57: 474-481.
- Lei, X.G. and J.M. Porres. 2003. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnology Letters*, 25: 1787-1794.
- 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.
- 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.
- Loewus, F. 2002. Biosynthesis of phytate in food grains and seeds. In: *Food Phytases*, N.R. Reddy, S.K. Sahte (Eds.), CRC Pres, Boca Raton, Florida, USA, 53-61.
- Lopez, H.W., F. Leenhardt, C. Coudray and C. Rèmèsy. 2002. Minerals and phytic acid interactions: Is it a real problem for human nutrition? *Int. J. Food Sci. Technol.*, 37: 727-739.
- Lowe, J.T., H. Steenbock and C.H. Keiger. 1939. Cereals and rickets. IX. The availability of phytin-P to the chick. *Poult. Sci.*, 18: 40-44.
- Miksch, G., S. Kleist, K. Friesch and E. Flaschel. 2002. Overexpression of the phytase from *E. coli* and its extracellular production in bioreactors. *Appl. Microbiol. And Biotech.*, p.253.
- Mwachireya, S.A., R.M. Beames, D.A. Higgs and B.S. Dosanjh. 1999. Digestibility of canola protein products derived from the physical, enzymatic and chemical processing of commercial canola meal in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) held in fresh water. *Aquacul. Nutr.*, 5: 73-82.
- Pandey, A., G. Szakacs, C.R. Soccol, J.A. Rodriguez-Leon and A.T. Soccol. 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technol.*, 7: 203-217.
- Pasamontes, L., M. Haiker, M. Wyss, M. Tessier and A.P.G.M. vanLoon. 1997a. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5): 1696-1700.
- Pasamontes, L., M. Haiker, M. HenriquezHuecas, D.B. Mitchell and A.P.G.M. vanLoon. 1997b. Cloning of the phytases from *Emericella nidulans* and the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Biochimica et Biophysica Acta-Genes Structure and Expression*, 1353(3): 217-223.
- Reddy, N.R., S.K., Sahte and D.K. Salunkhe, 1982. Phytases in legumes and cereals. *Adv. Food Res.*, 28: 1-92.

- Reddy, N.R., M.D. Pierson, S.K. Sahte and D.K. Salunkhe, 1989. Phytases in cereals and legumes. CRC Pres Inc., Boca Raton, FL.
- Reddy, N.R. 2002. Occurrence, distribution, content, and dietary intake of phytate. In: Food Phytases, N.R. Reddy, S.K. Sahte (Eds.), CRC Pres, Boca Raton, Florida, USA, 25-51.
- Richardson, A.E., P.A. Hadobas and J.E. Hayes. 2001a. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. The Plant J., 25: 641-649.
- Richardson, A.E., P.A. Hadobas, J.E. Hayes, C.P. O' Hara and R.J. Simpson. 2001b. Utilization of phosphorus by pasture plants supplied with myo-inositol hexakisphosphate is enhanced by the presence of soil microorganisms. Plant and Soil, 229: 47-56.
- Rodriguez, E., J.M. Porres, Y. Han and X.G. Lei. 1999. Different sensitivity of recombinant *Aspergillus niger* phytase (r-phyA) and *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase (r-AppA) to trypsin and pepsin in vitro. Arch. Biochem. Biophys., 365: 262-267.
- Rodriguez, E., Z.A. Wood, P.A. Karplus and X.G. Lei. 2000a. Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*. Arch. Biochem. Biophys., 382: 105-112.
- Rodriguez, E., E.J. Mullaney and X.G. Lei. 2000b. 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.
- Robinson, E.H., S. Jackson and M.H. Li. 1996. Supplemental phytase in catfish diets. Aquacul. Mag., 22: 80-82.
- Rumsey, G.L.. 1993. Fish meal and alternate sources of protein in fish feeds: Update. Fisheries, 18: 14-19.
- Sandberg, A.S., M. Brune, N.G. Carlsson, L. Hallberg, E. Skoglund and L. Rossander-Hulthén. 1999. Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. Am. J. Clin. Nutr., 70: 240-246.
- Sandström, B. and A.S. Sandberg. 1992. Inhibitory effects of isolated inositol phosphates on zinc absorption in humans. J. Trace Elem. Electrol. Health Dis., 6: 99-103.
- Selle, P.H. and V. Ravindran. 2006. Microbial phytase in poultry nutrition. Animal Feed Science and Technology (In Press).
- Shears, S.B. 1998. The versatility of inositol phosphates as cellular signals. Biochim. Biophys. Acta, 1436: 49-67.
- Simon, O. and F. Igbasan. 2002. In vitro properties of phytase from various microbial origins. Int. J. Food Sci. Technol., 37: 813-822.
- Simons, P., H. Versteegh, A.W. Jongbloed, P.A. Kemme, P. Slump, K.D. Bos, M.G.E. Wolters, R.F. Beudeker and G.J. Verschoor. 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. British Journal of Nutrition, 64: 525-540.
- Siren, M. 1986a. Stabilized pharmaceutical and biological material composition. Pat.SE 003 165.
- Siren, M. 1986b. New myo-inositol triphosphoric acid isomer. Pat. SW 052 950.
- Siren, M. 1998. Use of an ester of inositoltriphosphate for the preparing of medicaments. U.S. Patent 5846957.
- Van Hartingsveldt, W., C.M.J. Van Zeijl, M. Hartevelde, R.J. Gouka, M.E.G. Suykerbuyk, R.G.M. Luiten, P.A. Van Paridon, G.C.M. Selten, A.E. Veenstra, R.F.M. Van Gorcom, and C.A.M.J.J. Van den Hondel. 1993. Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*. Gene, 127: 87-94.
- Vohra, A. and T. Satyanarayana. 2003. Phytases: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. Critical Reviews in Biotechnology, 23(1): 29-60.
- Wang, M., N.S. Hettiarachchy, M. Qi, W. Burks and T. Siebenmorgen. 1999. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. J. Agric. Food Chem., 47: 411-416.
- Warden, W.K. and P.J. Schaible. 1962. Preliminary investigations concerning utilization of phytin phosphorus by the chick. Poult. Sci., 41 (Abstract).
- Yanke, L.J., H.D. Bae, L.B. Selinger and K.J. Cheng. 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. Microbiol., 144: 1565-1573.

İletişim Adresi:

Meltem Aşan
 Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi
 Zootekni Bölümü - Adana
 E-posta: asanm@cu.edu.tr