

Fitazlar: Çevreye Etkisi, Beslenme ve Biyoteknolojideki Önemi

Derya Berikten , Merih Kıvanç 

Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 26470, Eskişehir

Geliş Tarihi (Received): 25.07.2017, Kabul Tarihi (Accepted): 22.03.2018

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): derya.berikten@gmail.com (D. Berikten)

☎ 0 222 335 05 80/ 47 25 📠 0 222 335 36 16

ÖZ

Hayvanlar alemi için önemli besin kaynaklarından olan tahıllarda, baklagillerde ve yağlı tohumlarda fosfatın temel depo formu fitik asittir. Basit mideli hayvanlar ve insanlar gastrointestinal fitaz enziminden yoksun oldukları için fitatı tam olarak parçalayamaz ve fitat fosfatından yararlanamazlar. Ayrıca, fitik asit beslenme karşıtı bir etki de göstermektedir, çünkü bazı metal iyonları ve proteinlerle fizyolojik pH değerlerinde çözünmeyen kompleksler oluşturarak bunların biyolojik kullanımını engellemektedir. Beslenme karşıtı etkisi, yapısındaki fosforun kullanılmayıp atılmasıyla oluşan çevresel kirlilik ve gıdalara ekstra fosfor ekleme gereksinimini ortaya çıkartması sebebiyle fitik asitin fitaz enzimleri tarafından defosforilasyonu oldukça önemlidir. Fitazlar endüstriyel olarak özellikle yem ve gıda sanayi olmak üzere çok çeşitli alanlarda kullanıma sahiptirler. Farklı kaynaklardan elde edilebilen fitaz enzimleri içerisinde endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalar için en uygun olanları mikrobiyal fitazlardır. Termofilik fungusların ürettiği fitazlar, geniş pH aralığında aktif olma, yüksek spesifik aktivite ve özellikle endüstriyel proseslerde uygulanan yüksek sıcaklıklarda aktivitesini kaybetmemesini sağlayan termostabilite gibi özelliklere sahiptirler. Bu yüzden mikrobiyal fitazlar arasında oldukça önemli bir yere sahiptirler. Bu derlemede, fitaz enziminin özellikleri, beslenme, insan sağlığı, çevresel açıdan önemi ve fitaz kaynakları, kullanıldığı alanlar ele alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: Fitaz, Termostabil enzimler, Fungal fitazlar, Fitat

Phytases: Their Effects on Environment, Nutritional and Biotechnological Importance

ABSTRACT

Phytic acid is the primary storage form of phosphate in cereals, legumes and oilseeds, which are the principal components of animal feeds. Because of the lack of gastrointestinal phytase enzyme, monogastric animals and human are unable to digest phytate completely and do not benefit the phosphate of phytates. Furthermore, phytic acid shows anti-nutritive effect because it forms non-soluble complexes with some metal ions and proteins at physiologic pH values that prevent their bioavailability. Because of the anti-nutritive effect, the need for extra phosphorus addition to feeds and formation of environmental pollution due to excretion of phosphorus in its structure that cannot be used, de-phosphorulation of phytic acid by phytase enzyme is very important. Industrially, phytases have to be used in various fields especially in feed and food industries. Among phytase enzymes obtained from different sources, microbial phytases are the most appropriate ones for industrial and biotechnological applications. Phytases produced by thermophilic fungi have several features such as activity at a wide pH range, high specific activity and especially thermostability at high temperatures applied in industrial processes. So they have very important place among microbial phytases. In this review, properties of phytase enzyme, precautions for human nutrition and health and environment, sources and uses of phytases are discussed.

Keywords: Phytase, Thermostable enzyme, Fungal enzyme, Phytate

GİRİŞ

Enzimler canlı hücrede meydana gelen kimyasal tepkimeleri katalizleyen veya düzenleyen biyokatalizörlerdir. Organizmadaki organik moleküllerin yapımı, yıkımı, kas hareketleri ve solunum gibi fizyolojik olaylar enzimler yardımıyla yürütülmektedir [1]. Enzimler biyolojik reaksiyonları katalize ettikleri için biyokatalizörler ve kimyasal kataliz yönünden mikro heterojen katalizörler olarak adlandırılabilirler [3]. Enzim örneklerinin spesifik aktivitelerini tanımlamak için "enzim birimi" veya "ünitesi" terimleri kullanılmaktadır. Enzim birimi (U) dakikada 1 mikromol substrat dönüşümünü katalizleyen miligram enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır [4].

Endüstride kullanılan enzimler mikroorganizma, bitkisel ve hayvansal kaynaklı olabilmektedir [5]. Hayvansal kaynaklı enzimler genellikle tavuk yumurtalarının beyazı, domuz midesi, pankreas, geviş getirenlerin karın bölgesi gibi yenilebilir organlardan izole edilebildiği için insan yiyeceklerinin hazırlanmasında uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Bitkisel kaynaklardan elde edilen biyoteknolojik enzimler, yenilebilir bitkilerden elde edilebilmektedir. Mikrobiyal enzimler ise bakteriler, mayalar ve mikrofunguslar kullanılarak üretilmektedirler [6].

Endüstriyel alanda kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleridir [5]. Ayrıca mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler mikroorganizmaların özelliklerine bağlı olarak çeşitli niteliklere sahip olabilmektedirler. Bu özellikler de onların aynı gruptaki enzimlerden ayrılıp ön plana çıkmasını sağlamaktadır. Bu özelliklerden bir tanesi de termostabilitedir ve bu özellik endüstriyel proseslerde oldukça önemlidir.

1990'lerde moleküler biyolojik tekniklerin kullanılması ve gelişmesi ile genetik analizlerin önünün açılması, rekombinant üretimin başlaması çarpıcı şekilde termostabil enzim alanındaki çalışmaların artmasına sebep olmuştur. Bu durum aynı zamanda termal çevrelerden birçok mikroorganizmanın izole edilmesini teşvik etmiştir. Termostabil enzimler endüstriyel proseslerin sıklıkla kısmen şiddetli koşullarına karşı koyabilen güçlü bir katalizör alternatifi sunmaktadır [7].

Günümüz dünyasında, çeşitli biyofinerilerde uygulanan proseslerin bir çoğu yüksek sıcaklıklarda stabil olabilen enzimleri içermektedir. Bu termostabil enzimler çoğunlukla mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bir enzim veya proteinin termostabil olarak tanımlanması için seçilen yüksek sıcaklıkta (>55°C) uzun bir yarı ömre sahip olması gerekmektedir. Termofilik organizmaların extrasellüler enzimleri genellikle yüksek termostabilite göstermektedir. Termostabil enzimlerin biyoproseslerde seçilmesinin

sebepleri organik solventlere yüksek tolerans, oda koşullarında uzun süre saklama, düşük kontaminasyon riski ve tabii ki ham maddelerin ön işlemleri sırasında uygulanan yüksek sıcaklıklara karşı düşük aktivite kayıplarını sağlayan termostabilitedir. Ayrıca termostabilite kolay karışma, yüksek substrat çözünürlüğü, yüksek kütle transfer oranı gibi özellikleri de yanında getirmektedir [7]. Ayrıca termostabil fungal enzimlerin birçoğu ekstrasellüler olmalarından dolayı kullanım kolaylığı ve düşük maliyet sağlamaktadır. Ekstrasellüler termostabil fungal enzimlerin bazıları proteaz, lipaz, α -amilaz, glukozamilaz, selülaz, ksilanaz, lakkaz ve fitazdır [8].

Fitik asidin defosforilasyonunu sağlayan fitazlar, son yıllarda özellikle beslenme, çevreyi koruma ve insan sağlığı açısından ön plana çıkmıştır. Yüksek sıcaklıklara dayanıklı termostabil fitazlara yem üretimi, gıda işleme, kağıt yapımı ve bunlar gibi bir çok endüstriyel proseste gereksinim olduğu belirtilmiştir [9, 7]. Bu derleme kapsamında fitaz enziminin özellikleri, kullanım alanları, fitaz kaynakları ve ayrıca enzimin substratı olan fitik asidin özellikleri, fitaz ile ilişkilerine bağlı olarak beslenme üzerine etkisi, insan sağlığı, çevreye açısından önemi ele alınmıştır.

FİTAZ ENZİMİ

Fosfatazlar, birçok organo-fosfat bileşiklerindeki monofosfoester bağlarının parçalanmasını katalizleyen enzimlerdendir. Ancak bu enzimler fitik asit içindeki monofosfoester bağlarını hidrolize edemez. Fitik asidin (myo-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakis-dihidrojen fosfat) hidrolizi oldukça önemli olduğu için, fitik asidi hidrolizleyen enzim sınıfına fitazlar denmiştir. Son 20 yıldır fitazlar, beslenme, çevrenin korunması ve insan sağlığı açısından önemli enzimlerden birisi haline gelmiştir. Fitaz (myo-inositol hexakisfosfat bifoshidrolaz) myo-inositol hexakisfosfat'ın (fitik asit), inorganik mono fosfat ve düşük myo-inositol fosfatlar ve bazı durumlarda serbest myo-inositol'e hidrolizini katalizlemektedir. Bu enzim kademeli olarak fitatın inositol merkezindeki ortofosfat gruplarını parçalamaktadır [10, 11].

Fitazlar, monomerik yapıdaki genellikle 40-100 kDa moleküler ağırlığa sahip proteinler olarak değerlendirilmektedir. Optimum pH ve sıcaklığı 4.5-6.0 ve 45-60°C olan fitazlar bunun yanında geniş substrat spesifikliğine sahiptir. Fitazın kristal yapısı, 2.5 Å^o çözünürlükte tespit edilmiştir. Fitazın termostabilitesini arttırmak için immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir [12].

FİTİK ASİT (MYO-İNOSİTOL-1,2,3,4,5,6-HEXAKİS DİHİDROJEN FOSFAT)

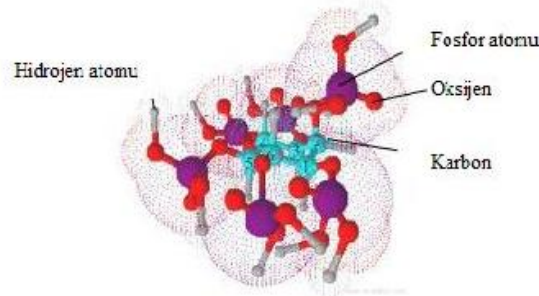
Fitazın substratı olan fitik asitin (myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis dihidrojen fosfat, IP6) büyük bir bölümü tahıl ve baklagil tohumlarının olgunlaşması sırasında birikmektedir (Şekil 1) [9]. Tohumlarda bulunan toplam fosforun %60'dan fazlasını fitik asit oluşturmaktadır. Bu miktar tohumların çoğunda ve yan ürünlerinde, tohumların tamamının %1-2'sine karşılık gelmektedir. Bunun yanında birçok bitki türünün köklerinde, yumrularında, spor ve polenlerinde de daha düşük

miktarlarda fitik asit bulunabilmektedir [13]. Bazı baklagil, tahıl ve meyvelerdeki fitik asit miktarları Tablo 1'de verilmiştir. Fitik asitin kimyasal formülü myo-inositol

1,2,3,4,5,6-hekzadihidrojen fosfat'tır. Moleküler formülü, $C_6H_{18}O_{24}P_6$ ve moleküler ağırlığı 660.04 g/mol'dür [14].

Tablo 1. Baklagil, tahıl ve meyvelerdeki fitik asit miktarları [15]

Bitki türü	Yapısı	Fitik asit (%)
Pirinç	Kepek	5.88
Susam	Kuru tohum	4.71
Bal kabağı	Embriyo	4.08
Keten tohumu	Kuru tohum	3.36
Kanola	Kuru tohum	2.50
Ayçiçeği	Embriyo	2.10
Hardal	Kuru tohum	2.00
Kaju	Embriyo	1.97
Kendir	Kuru meyve	1.74
Yerfıstığı	Kabuklu tohum	1.70
Domates	Tohum	1.66
Soya fasulyesi	Kuru tohum	1.55
Badem	Kuru embriyo	1.42
Patlıcan	Tohum	1.42
Fasulye	Kuru tohum	1.41
Antepfıstığı	Embriyo	1.38
Kavun	Tohum	1.36
Kivi	Taze meyve	1.34
Bakla	Kuru tohum	1.11
Salatalık	Çimlenmemiş tohum	1.07
Sorgum	Kuru tane	1.06
Kakao tanesi	Kuru tohum	1.04
Arpa	Kuru tane	1.02
Yulaf	Kuru tane	1.02
Buğday	Kuru tane	1.02
Bezelye	Kuru tohum	1.00



Şekil 1. Myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hekzafosfat 'Fitik Asit' [16]

Fitik asit heksahidrik siklik alkol mezo-inositolün hekzafosforik esteridir. Fitik asitin tuzları fitat olarak tanımlanmaktadır. Fitat tohum çimlenmesi için fosfor ve enerji kaynağı olarak görev yapmasına rağmen, bağlı fosfor; insanlar, köpekler, domuzlar, kuşlar ve agastrik hayvanlarda bağırsak sindirim enzimi olan fitazın bulunmayışından dolayı çok az miktarda kullanılabilir [14]. Kanatlı, domuz ve balık rasyonlarında fitat fosforunun kullanılmayışından dolayı, bu canlıların yemlerine pahalı bir mineral olan fosfor ilave edilmektedir [17]. Bununla beraber bitkisel yemlerde bulunan ve kullanılmayan fitat fosforu gübre ile dışarı atılmaktadır. Bunun sonucunda yoğun hayvan yetiştiriciliği yapılan alanlarda çevresel kirlilik meydana gelmektedir. Topraktaki fazla fosfor göl ve denizlere taşınarak, bu çevrelerde fosfat kirlenmesine sebep olmaktadır [10, 9] ve akuatik organizmaların aşırı şekilde

artmasını uyararak su ekosisteminin bozulmasına ve insanlar için zararlı hale gelmesine sebep olabilmektedir [18].

Fitik asit merkez inositol halka yapısının etrafında bulunan altı fosfat grubundan oluşan ve geniş bir pH aralığında yüksek derecede negatif yüklü olan bir iyon dur. Oldukça negatif yüklü bir molekül olmasından dolayı divalent ve trivalent katyonlar (Ca^{+2} , Mg^{+2} , $Fe^{+2/+3}$, Zn^{+2} , Mn^{+2}) için çok yüksek afiniteye sahiptir. Bu pozitif yüklü iyonlarla şelat oluşturarak insanlar ve diğer monogastrik hayvanlarda ince bağırsakta metallerin emilimini azaltıp biyoyararlılığını negatif yönde etkilemektedir (Şekil 2) [19, 20]. Gelişmekte olan ülkelerde insanlardaki kalsiyum, demir ve çinko gibi minerallerin eksikliğini yaygınlaşması, insan beslenmesinde kullanılan bitki kökenli temel gıdalar

yalıyla alınan fosfat ve diğer mineralleri bağlayan fitata dayandırılmaktadır. İnsanların gastrointestinal kanallarında yeterli düzeyde fitaz aktivitesi bulunmadığı için fitata bağlı mineraller emilmeden dışarı atılmaktadır [21].

Fitat; düşük ve yüksek pH değerlerinde non-spesifik fitat-protein kompleksleri oluşturmaktadır. Bu kompleks oluşumlar proteinlerin yapısını değiştirmekte ve sindirim enzimlerinin (α -amilaz, pepsin, tripsin gibi endojen proteazlar) proteinleri tanımasını engelleyerek proteinleri proteolitik sindirime karşı dirençli hale getirmektedir. Monogastrik hayvanlardaki düşük büyüme performansının ana nedeni olarak fitat içeren yemlerle beslenmeleri gösterilmektedir. Fitat karbonhidratlarla da kompleks oluşturmaktadır ve bu kompleksler karbonhidratları daha az parçalanabilir hale getirmektedir [14].

Ayrıca amilaz aktivitesi fitatın Ca^{+2} iyonu ile kompleks oluşturmasından dolayı inhibe olur ve bu da karbonhidrat parçalanmasını düşürücü etki yapmaktadır. Diğer taraftan diyabet hastaları tarafından tahıl ve baklagil içerikli diyetlerin uygulanması karbonhidratların glukoza dönüşümünün azalmasından dolayı düşük glisemik indekse sebep olmakta ve kan şekerinin kontrol altında tutulmasını kolaylaştırmaktadır. Fitat diğer besin öğeleriyle olduğu gibi lipidler ile de kompleks oluşturmaktadır ve lipofitini meydana getirmektedir. Bu da bağırsaklarda metalik bir sabun oluşturarak lipidlerin yararlanabilirliğini azaltmaktadır [14].

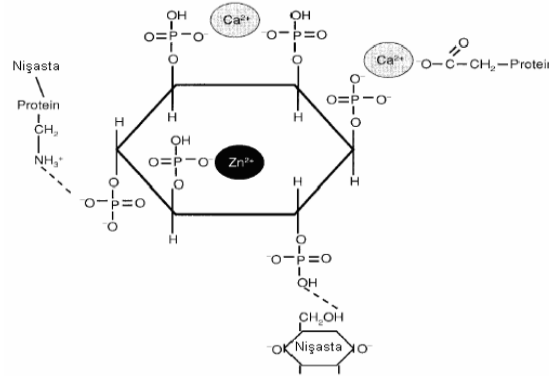
Fitik asitin negatif etkilerinin yanında antikanserojenik (kolon kanseri, göğüs kanseri, prostat kanseri, karaciğer kanseri, rabdomiyosarkom, pankreas kanseri, kan ve kemik iliği kanseri), antimutajenik, antioksidan,

hipolipidemik, hipokolesterolemik, pıhtılaşmayı önleyici, diş çürümesini önleyici, böbrek taşı oluşumunu önleyici, kolestrolü düşürücü, Parkinson ve Alzheimer hastalığının tedavisinde yardımcı, HIV, obezite, diyabet ve kalp rahatsızlıkları gibi hastalıkları önleyici etkileri olduğunun düşünülmesi nedeniyle gıdalardaki yüksek fitik asit içeriğinin göz önünde tutulması gereği ön plana çıkmaktadır [22, 14].

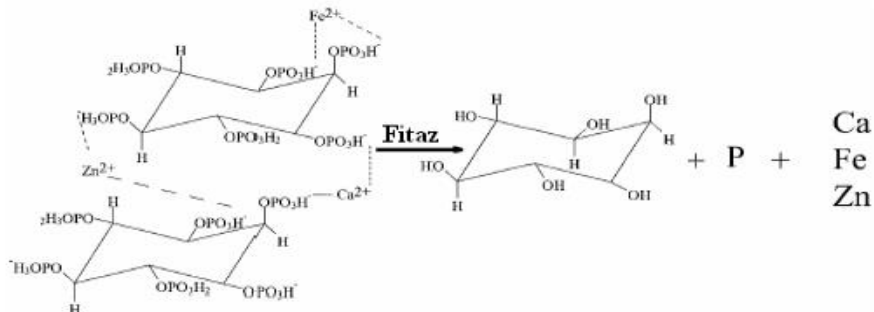
Fitin fosforunun kullanılabilir hale gelmesi için fitik asit molekülünün hidrolize olması gerekmektedir. Fitin fosforunun hidrolizi; pişirme ve otoklavlama, bitkisel endojen fitaz enziminin zengin gıdaları kullanma, ıslatma, çimlendirme, depolama, dış kabuğun soyulması için öğütme gibi yöntemlerle gerçekleştirilmektedir [24]. Ayrıca fermentasyon işlemi sırasında maya ve laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan fitaz enzimi de yem ve yiyeceklerdeki fitat miktarını düşürmektedir (Şekil 3) [25].

FİTAZLARIN SINIFLANDIRILMASI

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 [26, 10, 11].



Şekil 2. Fitik asit şelatının kimyasal yapısı [23]



Şekil 3. Fitatın fitaz enzimi ile inositol, fosfat ve diğer elementlere hidrolizi [18]

Fitaz enzimleri; optimum pH'larına göre alkali veya asit fitazlar, katalitik mekanizmalarına göre histidin asit fosfatazlar (HAF), β -pervane fitazlar (BPFhy), sistein fosfatazlar (SF) veya mor asit fosfatazlar (MAF) ve fitat hidrolizinin stereospesifitesine göre 3- veya 6- fitazlar olarak gruplandırılmaktadırlar [11].

Histidin Asit Fosfatazlarının (HAF) bütün üyeleri genel bir katalitik mekanizma ve genel bir aktif bölge motifi gösterirler. Bu tipteki fitazların aktif bölgeleri 3 boyutlu katlanmalar sırasında amino asit dizisinin N ve C- uçlarının bir araya gelmesi ile oluşmaktadır. Bu uzak diziler bir araya gelerek tek bir katalitik merkez oluşturmakta ve bu da fosfomonoesterlerin iki adımda hidrolizlenmesi reaksiyonunu başlatmaktadır. Hem prokaryotik hem de ökaryotik histidin asit fitazlar (HAFhy) bilinmektedir. En çok bilinen prokaryotik HAFhy *Escherichia coli* fitazı, ökaryotik HAFhy ise *Aspergillus niger* ve *A.fumigatus* fitazlarıdır. Fungal fitazların doğru katlanmaları glikozilasyon ve disülfid bağları ile gerçekleşmektedir [11].

Bacillus amyloliquefaciens'in termostabil fitazının moleküler yapısı tanımlanmıştır. Bu fitat parçalayan enzim HAFhy sınıfından değildir. Ve hiçbir bilinen fosfataz grubuna girmeyen bir yapı göstermesinden dolayı az rastlanan yeni bir enzim sınıfı oluşturmaktadır. β -pervane fitaz ismi enzimin moleküler yapısının çoğunlukla β -yaprağından (β -sheet) oluşması ve beş yapraklı pervaneyeye benzemesinden gelmektedir [11].

Anaerobik Rumen bakterisi olan *Selenomonas ruminantium*'un sahip olduğu fitaz sistein fitaz grubundandır. Bu tip fitazların en önemli özelliği aktif bölgelerinin substrat spesifikliğı sağlayan geniş ve derin bir cep halinde olmasıdır. Bu derin ve geniş cep fitik asitin tamamen fosforillenmiş olan inositol gruplarını içine alabilmektedir. Bu oldukça yüksek kapasiteli elektrostatik çevre bu gruptaki diğer enzimlerin aksine substrat olarak fitata uyum sağlamaktadır [11].

Mor Asit Fosfatazların (MAF) tüm üyeleri özel 7 metal-ligand aminoasit seti içeren metallofosfoesteraz sınıfındadırlar. Bitkilerde, hayvanlarda, funguslarda ve bakterilerde bulunan geniş bir fosfataz grubudur. HAF ve SF lerde olduğu gibi bu gruptaki enzimlerin tümü substrat olarak fitatı kullanamamaktadırlar. Mor asit fitazların moleküler yapısı halen tam olarak aydınlatılmamıştır [11].

FİTAZ KAYNAKLARI

Genel olarak dört fitaz kaynağı vardır bunlar: bitkisel fitazlar, mikrobiyal fitazlar (fungal ve bakteriyel fitazlar), insanlar ve hayvanlarda ince bağırsak mukozasından salgılanan fitazlar ve kalın bağırsak ile ilişkili mikroflora tarafından endojen olarak üretilen fitazlardır [14]. Bu enzimlerin içerisinde endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalar için en uygun olanların mikrobiyal fitazlar olduğu bildirilmiştir [27, 11, 28].

Bitkisel Fitazlar

Fitaz enzimi, birçok bitkisel kaynaklardan izole edilip tanımlanmıştır. Bu kaynaklardan bazıları; pirinç, kolza

tohumu, soya fasulyesi, mısır, buğday ve çavdardır. Bu bitkilerin yanında beyaz hardal, patates, marul, ıspanak, turp, çimen ve zambak poleninden de fitaz elde edilmiştir. Ayrıca çavdar ve tritikale (buğday×çavdar melezi) gibi bitkisel kaynaklar asit fosfataz aktivitesine sahiptir. İstenilen özelliklere sahip fitaz kodlayan mikrobiyal genler, verimli fitaz düzeylerini arttırmak için bitkilerin içerisine konulup çoğaltılabilmektedir [14]. Genel olarak fitaz kodlayan genler, özellikle *A. niger*, *Bacillus subtilis*, *A. fumigatus*, *E. coli* ve *Schwanniomyces occidentalis*'den elde edilmiştir. Bu genler çeşitli bitkilere aktarılarak verimli derecede fitaz üretebilen transgenik bitkiler elde edilmiştir [27].

Mikrobiyal Fitazlar

Mikrobiyal fitazlar funguslar, bakteriler, mayalar ve protozoonlardan izole edilmiştir [29]. Bu organizmalar içerisinde en yüksek fitaz aktivitesi funguslarda özellikle *Aspergillus* türlerinde belirlenmiştir (Tablo 2) [11]. Yapılan bir tarama çalışmasında fitaz üretimi için topraktan 2000'den fazla mikroorganizma izole edilmiş ve elde edilen fitazlar içerisinde az sayıda görülen ekstraselüler fitaz üreticilerin filamentöz funguslar olduğu gözlenmiştir [30]. Mikrobiyal fitaz enzimlerin birçoğu histidin asit fosfataz veya alkali fitaz alt ailesine bağlıdırlar ve kinetik, steriyospesifik ve biyokimyasal olarak önemli varyasyonlar göstermektedirler [11].

Bakterilerden izole edilen fitazlar glikozillenmemiş histidin asit fosfatazlar veya β -pervane yapısındaki alkali fitazlardır [11]. Bakteriler arasında *E.coli*, *B. subtilis*, *Klebsiella terringa*, *Lactobacillus sp.*, *Pseudomonas spp.* büyüme evresinde ekstraselüler fitaz üreterek fitatı indirgeyebilirler [14]. Ayrıca *Aerobacter aerogenes* [32] *Raoultella sp.* [19], *Citrobacter braakii* [33], *Enterobacter* [34] ve anaerobik rumen bakterilerinden özellikle *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella sp.*, *Mitsuokella multiacidus* [35] ve *Mitsuokella jalaludinii*'nin [36] de fitaz ürettikleri saptanmıştır.

1984'de ilk rapor edilen fitaz mayadan elde edilmiştir [37]. Daha sonra birkaç maya suşunun fitatı hidroliz etme yeteneğı olduğu gözlenmiştir. Maya fitazları arasında *Saccharomyces cerevisiae* özellikle ekmek yapımında büyük öneme sahiptir. *Pichia anomala* ve *Candida krusei* WZ-001'den hücreye bağlı fitazın üretimini bildirmiştir [38, 39]. Yüksek sıcaklık ve pH'da bile değişmeden aynen stabil kalmalarından dolayı bu gibi fitazlar gıda uygulamalarında büyük öneme sahiptirler. *P. anomala* [40], *Schwanniomyces castellii* [41] ve *Lactobacillus sanfranciscensis* [42]'den izole edilen fitazlar yüksek sıcaklıklara direnç göstermektedirler. Rekombinant teknolojisi aracılığıyla *E.coli* fitazının termal stabilitesinin artırılmasında, maya olan *Pichia pastoris* kullanılmıştır [43]. Fitaz üreten denizel mayaların da olduğu rapor edilmiştir. Bu deniz mayaları henüz tam olarak karakterize edilmemiştir. Ancak filogenetik olarak *Hanseniaspora uvarum*, *Yarrowia lipolytica*, *Kadamaea ohmeri*, *Candida tropicalis* ve *C. carpophila* ile ilişkili oldukları, alkali fitaz üretebildikleri ve böylece denizel fosfor kirliliğı biyoremediasyonunda uygulanabilecekleri ön görülmektedir [44].

Tablo 2. Çeşitli mikrobiyal fitazlar ve biyokimyasal özellikleri [31]

Kaynak	MA(kDa)	Opt T(C°)	Opt pH	Km(mM)	pI	Spesifiklik
Fungi						
<i>Aspergillus fumigatus</i>	75	58	5	-	-	-
<i>A. niger</i>	85	58	2.5-5.0	0.04	4.50	P
<i>A. niger</i> SK-57	60	50	5.5-2.5	0.0187	-	P
<i>A. niger</i>	353	50	2.5	0.606	-	P
<i>A.oryzae</i>	120-140	50	5.5	0.33	4.15	B
<i>A.nidulans</i>	77.8	55	5.5	-	-	-
<i>Rhizopus oligosporus</i>	-	55	4.5	0.15	-	-
<i>A.niger</i> ATCC9142	84	65	5	0.1	-	B
<i>Rhizopus oligosporus</i>	124	65	5	0.01	-	B
<i>Peniophthora lycii</i>	72	50-55	4-4.5	-	3.61	-
<i>Ceriporia sp.</i>	59	55-60	5.5-6.0	-	7.36-8.01	-
<i>Agrocybe pediades</i>	59	50	5.0-6.0	-	4.15-4.86	-
<i>Trametes pubescens</i>	62	50	5.0-5.5	-	3.58	-
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	60	65	7	0.11	4.7-5.2	B
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	-	55	-	-	-	-
<i>Rhizomucor pusillus</i>	-	70	5.4	-	-	B
<i>Myceliophthora thermophila</i>	-	37	6	-	-	B
<i>Sporotrichum termophile</i>	456	60	5.5	0.15	4.9	B
Mayalar						
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	45	4.6	-	-	-
<i>Schwanomyces castellii</i>	490	77	4.4	0.038	-	B
<i>Arxula adenivorans</i>	-	75	4.5	0.25	-	B
<i>Candida krusei</i> WZ001#	330	40	4.6	-	-	-
<i>Pichia anamola</i> #	64	60	4	0.2	-	B
<i>P. rhoanensis</i>	-	70-75	4.0-4.5	0.25	-	-
<i>P. spartnae</i>	-	75-80	4.5-5.0	0.33	-	-
Bakteriler						
<i>Aerobactor aerogens</i> *	-	25	4.0-5.0	0.135	-	-
<i>Bacillus sp.</i> DS11	-	70	7	0.55	5.3	P
<i>Bacillus subtilis</i>	37	60	7.5	0.04	-	-
<i>B. subtilis</i> (natto)	38	60	6.0-6.5	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	43	55	7.0-7.5	-	6.5	P
<i>B. subtilis</i>	44	55	6.0-7.0	-	5	P
<i>B. licheniformis</i>	47	65	6.0-7.0	-	5.1	-
<i>B. amyloliquefaciens</i>	44	70	7.0-7.5	-	-	-
<i>Esherichia coli</i> *	42	55	4.5	0.3	6.3-6.5	P
<i>Klebsiella oxytoca</i>	40	55	5.0-6.0	-	-	-
<i>K. aerogenes</i>	700	65	4.5	-	3.7	P
<i>Pseudomonas syringe</i> *	47	40	5.5	0.38	-	P
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> *	50	45	4	-	5	-

[Fitaz konumu: (*)intraselüler, (#)hücreye bağlı, () ekstraselüler; B:geniş spektrum, P: fitat spesifik]

Filamentli funguslardan izole edilen fitazlar genellikle 3-fitazlardan olup histidin asit fosfatazlarıdır. Glikozillenmiş olan bu fitazlar, geniş bir çeşitliliğe sahip olan substrat

grubunda aktiftirler. Günümüzde ticari olarak fitaz enzimi üretiminde toprak fungusu olan *Aspergillus* cinsi üzerinde durulmaktadır. Yaygın olarak kullanılan, ticari

amaçlı üretilen fitaz kaynakları *A. niger*, *A. ficuum*, *A. fumigatus*'dur [45]. *A. niger* PhyA ilk karakterize edilen ve ticarileştirilen fitaz enzimidir. 1.4 kb'lık DNA fragmentince kodlanan bu enzim 80 kDa moleküler ağırlığındadır. Fitik aside karşı yüksek bir afiniteye sahip olup çift optimum pH'lı (2.5 ve 5.0-5.5) ve 55-60°C optimum sıcaklığa sahiptir [46].

Fitaz geni üzerinde yapılan dizi analizi ve blast çalışmaları ile *Aspergillus fumigatus* fitazının, *A. niger* fitazı ile %66 dizi benzerliği göstermesine karşılık sıcaklık toleransının daha iyi olduğu belirtilmiştir [47, 48]. Bu termotoleransın ısı denatürasyonundan sonra yeniden katlanma yeteneğinin yüksek olması ile alakalı olduğu bildirilmiştir. Termotoleransın ısı uygulamalarındaki tamponların spesifikliği ile de ayarlanabileceği kaydedilmiştir. Enzim geniş bir pH aralığına sahiptir ve az fosforillenmiş inositolfosfatlara karşı oldukça aktiftir. Buna karşın, fitata karşı spesifik aktivitesinin düşük olduğu bildirilmiştir [11]. *A. fumigatus*, *Emericella nidulans*, *Myceliophthora thermophila* fitazlarının birçok fosfatlı bileşikler üzerinde önemli ölçüde aktivite gösterdikleri belirlenmiştir [45]. Quan ve arkadaşları [49] hava kaynaklı fungus *Cladosporium sp.* FP-1'den düşük moleküler ağırlıklı (32.6 kDa) fitaz izole etmişlerdir. Bu enzim glikozillenmiş olup, optimum pH'sı 3.5, optimum sıcaklığı 40°C olarak belirlenmiştir [49]. Neves ve arkadaşları [50] tarafından *Lichtheimia blakesleeana*'nın fitaz ürettiği saptanmıştır [50]. Ayrıca endofitik funguslardan olan *Fusarium verticillioides* ve *Rhizoctonia sp.*'nin de fitaz üreticisi oldukları belirlenmiştir. *Fusarium verticillioides* fitazının karakterizasyonu sonucunda; sıcaklık optimumunun 50°C olduğu ve 60°C kadar stabil kalabildiği, optimum pH'sının ise 5.0 olduğu saptanmıştır [51].

Basidiomyceteler üzerine yapılan bir çalışmada bunların fitazlarının 6-fitazlar (EC 3.1.3.26) olarak gruplandırılabilirliğini gösterilmiştir. Ayrıca *Peniophora lycii* fitazı dışındakilerin optimum sıcaklıklarının 40-60°C, pH larının ise 5.0-6.0 arasında olduğu ortaya konmuştur [52]. *P. lycii* phyA fitazı ticari olarak kullanılmaktadır ancak yüksek sıcaklık uygulamalarına ve proteazlara hassas olduğu düşünülmektedir [53]. Birçok tür ekstraselüler fitaz aktivitesi için test edilmiş ve *Calcarisporiella thermophila*, *Chaetomium thermophilum*, *Corynascus thermophilus*, *Myceliophthora thermophila*, *Talaromyces thermophilus*, *Thermomucor indicae-seudaticae*, *Malbranchea cinnamomea*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizomucor miehei* termofilik funguslarının fitaz ürettikleri saptanmıştır [54, 20].

Dejenere primerlerle yapılan PCR, dizi analizi ve blast çalışmaları sonucunda *Myceliophthora thermophila* fitaz geninin *A. niger* fitaz geni ve diğer histidin asit fosfatlar ile yüksek oranda dizi benzerliği gösterdiği ortaya konmuştur [55]. Termofilik fungus *Thermomyces lanuginosus*'tan izole edilen fitaz geni moleküler olarak tanımlanmış ve *A. niger* ile karşılaştırıldığında daha yüksek termostabilite, katalitik verim ve yüksek geçiş sıcaklığına sahip olduğu bildirilmiştir [54, 20].

FİTAZLARIN KULLANIM ALANLARI

Yem Katkısı Olarak Kullanımı

Ruminantlar, rumenlerindeki mikrobiyal flora ile üretilen fitazlarla fitatı parçalarlar. Fitazların yardımıyla fitattan hidrolize olan inorganik fosfat hem mikroflora hem de ruminantlar tarafından kullanılmaktadır. Bu durum monogastrik hayvanlarda farklıdır. Domuz, balık, kümes hayvanları gibi monogastrikler, fitik asidi metabolize edemezler. Çünkü gastrointestinal fitazları yoktur. Dolayısıyla bunların fosfat ihtiyacını karşılamak için yemlerine inorganik fosfat eklenmektedir. Bu da maliyeti ve fosfat kirlilik problemlerini arttırmaktadır. Hayvan yemlerine fitaz eklenmesi fosfatın yem malzemesi içine geçmesini sağlamak ve gübredeki fosfat miktarını azaltmaktadır [10, 9].

Domuzların mısır ve buğday içeren yemlerine eklenen mikrobiyal fitazın P kullanılabilirliğini sırasıyla %38 ve 12 oranında arttırdığı [56] ve gübreye geçen fosfat miktarını ise %60 oranında azalttığı bildirilmiştir [57]. Büyümekte olan domuzlarda yapılan bir çalışma mısır ve soya fasulyesi içerikli yemlere mikrobiyal fitaz eklenmesiyle Zn gereksiniminin 1/3 oranında düştüğünü göstermiştir [58]. Broiler piliçlerinin beslenmelerinde de fitaz kullanımının aminoasit, Ca, Na, sialik asit ve fitat fosforunun çevreye salınımını belirgin şekilde azalttığı bildirilmiştir [59]. Su ürünlerinin üretiminde daha ucuz olduğu için bitki kaynaklı proteinler tercih edilmeye başlandığından beri sucul ortamlarda çevresel P kirliliği ön plana çıkmıştır. Balıkların basit midelerinden dolayı bu yemlerin defitinizasyonunun şart olduğu ve fitaz enziminin yetiştirilen balık türüne göre değişen pH ve sıcaklık değerlerine olan hassasiyeti ortaya konmuştur [60]. Ticari olarak kullanılan 4 adet fitaz enziminin hayvan yemi üretiminde karşılaşılabilecek ekstrem sıcaklık ve pH gibi koşullarda aktivitelerini büyük oranda kaybettikleri belirlenmiştir [61]. Çiftlik hayvanlarının yemlerinde *A. niger* fitazının başarılı bir şekilde kullanılabildiği rapor edilmiştir [62].

Gıdalarda Kullanımı

Fitaz enzimi yem katkısı olarak kullanılmasına ek olarak gıda sanayinde de büyük potansiyele sahiptir. Tahıl, legüm ve soya proteinlerince zengin beslenme, fitat alımında artışa neden olmaktadır. Vejeteryanlar, dengesiz ve yüksek oranda tahıl ile beslenenler, gelişmemiş ülkelerde mayasız ekmeğe tüketen insanlar ve soya kaynaklı mama tüketen bebekler fazla oranda fitat almaktadır [63]. İnce bağırsakta parçalanmamış fitat Zn, Ca, Mg ve Fe absorpsiyonunu negatif olarak etkilemektedir. Ayrıca sindirim enzimlerini ve bazı proteinleri de inhibe etmektedir. Tüm bu sebepler nedeniyle, gıda alanındaki çalışmalar, gıda işlemedeki geliştirilmenin yanı sıra bitki kökenli gıdaların daha besleyici hale getirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Ekmeğe yapım aşamalarında fitaz kullanımında başarılı sonuçlar elde edilmiştir [64]. Haros ve arkadaşları [65] tarafından yapılan çalışmada, fungal fitazların tam buğday ekmeğinin fermantasyonuna ve oluşan ekmeğin kalitesine olan etkilerine incelenmiştir. Fitazın ekmeğe yapımında oldukça olumlu etkilerinin olduğunu, ekmeğe

yapım süresinin kıaldığını, ekmek miktarının arttığını, fitatin parçalanması ile besinsel bileşimin arttığını, fitazların endojen α -amilazı aktif hale getirmesi ile α -amilazdan faydalanılmasının sağlandığını ortaya koymuşlardır [65]. Tarhanalar üzerine yapılmış olan bir çalışmada ise fitaz enzimi, maya ve malt unu kullanılarak yüksek kaliteli undan hazırlanan tarhanaların bazı besinsel özellikleri araştırılmıştır. Parametre olarak fermentasyon kaybı, ham kül, ham protein ve bunların sindirilebilirlikleri kullanılmıştır. Fitaz enzimi fermentasyonun kül sindirilebilirlik oranını artırıcı yönde etki etmiştir [66]. Gıdaların işlenmesi sırasında fitaz ilavesi soya sütü gibi içeceklerin yapımında, tahıl kepeklerini parçalamada, bitkisel protein izolatlarının ve mısır ıslatma sıvısının hazırlanmasında kullanılmaktadır [27].

Myo-İnositol Fosfatların Hazırlanmasında Kullanımı

Çeşitli inositol fosfatların hazırlanmasının temel sebebi, transmembran sinyalizasyonunda ve hücrelerarası kaynaklardan kalsiyumun hareketini sağlamada büyük rol oynayan inositol fosfatlar ve fosfolipidlerin ön plana çıkması olarak görülmektedir. Ayrıca myo-inositol fosfatların artrit ve astım gibi solunum hastalıklarını engellediği düşünülmektedir. Ayrıca spesifik inositol-trifosfatların ağrı kesici olarak kullanılması da önerilmiştir [67]. İlginç olarak inositol-trifosfat esterlerinin HIV'ı da içine alan retroviral enfeksiyonlara karşı inhibitör etkisinin olduğu gösterilmiştir [68]. Bu tip etkilerinden dolayı spesifik myo-inositol fosfatların kullanılmasına olan ilgi artmıştır. Myo-inositol fosfatların kimyasal sentezi oldukça zordur ve oldukça ekstrem basınç ve sıcaklıkların uygulanması gerekmektedir [69]. Fitazlar, myo-inositol heksafosfatın sıralı hidrolizini sağladığı için, myo-inositol fosfat türevleri ve serbest myo-inositolün fitaz kullanılarak üretilmesi kimyasal senteze potansiyel bir alternatiftir. *Saccharomyces cerevisiae* fitazının, fitik asidi hidroliz etmesiyle; D-myoinositol 1, 2, 6-trifosfat, D- myo-inositol 1, 2, 5-trifosfat ve myo-inositol 1, 2, 3-trifosfatın elde edilebileceği gösterilmiştir [70].

Kağıt Hamuru ve Kağıt Endüstrisinde Kullanımı

Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde, bitki fitik asitinin uzaklaştırılması önemlidir. Termostabil fitaz, kağıt hamuru ve kağıt yapımı süresince fitik asiti parçalamada kullanılan yeni biyolojik ajandır. Fitik asitin enzimatik parçalanması ile mutajenik ve çok zehirli yan ürünler meydana gelmez. Bundan dolayı kağıt hamuru ve kağıt yapımında fitazların kullanımı, temiz teknolojilerin gelişmesine yardımcı olmakla beraber çevreyi koruma açısından da önem taşımaktadır [71].

Toprak İyileştirmede Kullanımı

Bazı topraklarda, fosfatın organik formları olan inositol penta- ve heksakisfosfatlar toplam organik fosforun %50'sini oluşturabilmektedir [72]. Topraktaki organik fosfatın çeşitli bileşiklerle kompleksler oluşturması onun kalitesini ve kullanılabilirliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Fitaz enzimi inorganik fosforun

dönüşümünde ve bitkiler tarafından kullanılabilir hale gelmesinde oldukça önemlidir. Mısır bitkisi için topraktaki fitik asitten fosforun kullanılabilmesinde fitazın etkisi araştırılmıştır. Araştırmacı, toprağa fitaz ilave edildiğinde fitinin parçalanma oranının artmasına bağlı olarak büyümeyi uyardığını bildirmiştir [73]. Legümlerle yapılmış olan diğer bir çalışmada toprağa fitaz üreticisi *Aspergillus niger* türleri aşılanmıştır. Bu şekilde yapılan üretim sonucunda topraktaki serbest fosfat miktarının arttığı ve gelişimi etkileyen fosfatlı gübrelere ihtiyaç duyulmayacağı belirlenmiştir [74].

SONUÇ

Son yıllarda bilim insanları insan, hayvan beslenmesinde ve sağlığında yine çevre koruma alanında önemi ortaya çıkan fitat ve fitaz enzimi üzerine yoğunlaşmışlardır. Özellikle sağlık alanındaki yararlarını anlatan bazı çalışmalar olmasına karşılık bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Fitaz ve fitatların sağlık, biyoteknoloji ve çevre açısından önemini ortaya koymak günümüzde büyük önem taşımaktadır. Bu derlemede fitatlar, fitaz enzimi ve fitazların sağlık, çevre ve biyoteknolojik önemi üzerinde durulmaya çalışılmış ve bu konudaki çalışmalar gözden geçirilmiştir. Fitaz enzimi kullanılarak fitatları daha yararlı hale getirmek mümkün olabilecektir. Fitaz enzimi kaynaklarına bakıldığında mikroorganizmaların bu alanda kullanılmasının gelecek vaat ettiği düşünülmektedir. Fitaz enziminin çok geniş bir kullanım alanı olmasına karşılık hayvan yemi hazırlamada kullanımı için uygun enzim piyasadan sağlanabilirken gıdalarda kullanılacak formlarının bu kadar yaygın olmadığı görülmektedir. Hâlbuki fitaz enziminin bu alanda büyük bir kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Özellikle sağlık açısından bakılınca kanser, kalp ile ilgili hastalıklarda, diyabet ve böbrek taşlarına karşı koruma göz önüne alındığında önemi daha iyi ortaya çıkmaktadır. Fosforun daha iyi değerlendirilmesi ile çevre kirliliğinin önüne de geçilebilecektir. Ancak bu konuda birçok çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Telefoncu, A., 1986. İmmobilize Enzimler ve İmmobilizasyon Yöntemleri. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu, İzmir.
- [2] Shuler, M.L., Kargi, F., 2002. Bioprocess Engineering. 2nd ed. Prentice Hall PTR, USA.
- [3] Gözükara E., 1997. Biyokimya 2. Nobel Tıp Kitapevleri.
- [4] Bailey J.E., Ollis D.F., 1977. Biochemical Engineering Fundamentals. Edited by Mc Graw-Hill, USA.
- [5] Wiseman, A., 1987. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry. Handbook of Enzymes Biotechnology, Ed. by Ellis Horwood Second Edition, Chichester, UK, 274-373p.
- [6] Turner, P., Mamo, G., Karlsson, E.N., 2007. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories* 6(9): 1-23.

- [7] John, F.K., 1987. Enzyme Technology. Biotechnology 7A, Edited by H.J. Rehm, G. Reed, Lincoln, UK, 37-62p.
- [8] Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Bhat, M.K., 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(3): 461-488.
- [9] Lei, X., Blake, J.P., Forsberg, C.W., Fox, D.G., Grabau, E., Mroz, Z., Sutton, A.L., Walker, W.R., Webb, K., Matthews, J.C., Shears, S.B., Veum, T., Bell, A.W., 2006. Animal Agriculture's Future Through Biotechnology. Part 4, CAST Council for Agricultural Science and Technology, Issue paper no: 33.
- [10] Sariyska, M.V., Gargova, S.A., Koleva, A.L., Angelov, A.I., 2005. *Aspergillus niger* phytase: Purification and characterization. *Biotechnol.&Biotechnol. Eq.* 19: 98-105.
- [11] Polaina, J., Maccabe, A.P., 2007. Industrial Enzymes Structure, Function and Applications. *Springer* 641: 505-529.
- [12] Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A., Soccol, V.T., 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technol* 7: 203-214.
- [13] Feil, B., 2001. Phytic acid. *Journal of New Seeds* 3(3): 1-35.
- [14] Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2010. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition. *Food Chemistry* 120: 945-959.
- [15] Afinah, S., Yazid, A.M., Anis Shobirin, M.H., Shuhaimi, M., 2010. Phytase: Application in food industry. *International Food Research Journal* 17: 13-21.
- [16] Bohn, L., Meyer, A.S., Rasmussen, S.K., 2008. Phytate: Impact on environment and human nutrition, A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang Univ. Sci. B.* 9(3):165-191.
- [17] Wodzinski, R.J., Ullah, A.H.J., 1996. Phytase. *Advances in Applied Microbiology* 42: 263-303.
- [18] Lei, X.G., J.M. Porres., 2003. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnology Letters* 25: 1787-1794.
- [19] Greiner, R., Haller, E., Konietzny, U., Jany, K.D., 1997. Purification and characterisation of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 341: 201-206.
- [20] Chadha, B.S., Harmeet G., Mandeep M., Saini, H.S., Singh, N., 2004. Phytase production by the thermophilic fungus *Rhizomucor pusillus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 105-109.
- [21] Akdeniz, V., Kınık, Ö., Yerlikaya, O., Akan E., 2016. İnsan sağlığı ve beslenme fizyolojisi açısından çinkonun önemi, *Akademik Gıda* 14(3): 307-314.
- [22] Vats, P., Banerjee, U.C., 2004. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 3-14.
- [23] Kornegay, E.T., 2001. Digestion of phosphorus and other nutrients: the role of phytases and factors influencing their activity. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. Ed. by M.R. Bedford, G.G. Partridge, CAB International Publishing, UK, 237-272p.
- [24] Pekşen, E., Artık, C., 2005. Antibesinsel maddeler ve yemeklik tane baklagillerin besleyici değerleri. *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi* 20(2): 110-120.
- [25] Midilli, M., Muğlalı, H., Alp, M., Kocabağlı, N., Tanör, M.A., Toklu, G.S., 2003. Yeme katılan fitaz enziminin broylerde besi performansı ve mineral dengesi üzerine etkisi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* 27: 751-759.
- [26] Konietzny, U., Greiner, R., 2002. Molecular and catalytic properties of phytate degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food Sci. Technol.* 37: 791-812.
- [27] Grenier, R., Konietzny, U., 2006. Phytase for food application. *Food Technol. Biotechnol.* 44(2): 125-140.
- [28] Bommarius, A.S., Riebel, B.R., 2000. Biocatalysis. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.* 611: 152-158.
- [29] Aşan, M., 2007. Mikrobiyal fitazlar, uygulama alanları ve biyoteknoloji. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi* 13(2): 147-155.
- [30] Shieh, T.R., Ware, J.H., 1968. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Applied Microbiology* 16: 1348-1351.
- [31] Singh B., Kunze G., Satyanarayana T., 2011. Developments in biochemical aspects and biotechnological applications of microbial phytases. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 6(3): 69-87.
- [32] Greaves, M.P., Anderson, G., Webley, D.M., 1967. The hydrolysis of inositol phosphates by *Aerobacter aerogenes*. *Biochim. Biophys. Acta* 132: 412-418.
- [33] Kim, H.W., Kim, Y.O., Lee, J.H., Kim, K.K., Kim, Y.J., 2003. Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*. *Biotechnol. Lett.* 25: 1231-1234.
- [34] 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.
- [35] Yanke, L.J., Bae, H.D., Selinger, L.B., Cheng, K.-J., 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiol.* 144: 1565-1573.
- [36] Lan, G.Q., Abdullah, N., Jalaludin, S., Ho, Y.W., 2002. Culture conditions influencing phytase production of *Mitsuokella jalaludinii*, a new bacterial species from the rumen of cattle. *J. Appl. Microbiol.* 93: 668-674.
- [37] Nayini, N.R., Markakis, P., 1984. The phytase of yeast. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 17: 24-26.
- [38] Vohra, A., Satyanarayana, T., 2001. Phytase production by the yeast *Pichia anomala*. *Biotechnology Letter* 238: 551-554.
- [39] Quan, C., Zhang, L., Wang, Y., Ohta, Y., 2001. Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92(2): 154-160.
- [40] Vohra, A., Satyanarayana, T., 2002. Purification and characterisation of a thermostable and acid-

- stable phytase from *Pichia anomala*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 687-691.
- [41] Segueilha, L., Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G., Galzy, P., 1992. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 74: 7-11.
- [42] De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M.R., Mcsweeney, P.L.H., Faccia, M., Giovine, M., Gobetti, M., 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Int. J. Food Microbiol.* 87: 259-270.
- [43] Rodriguez Couto S., Rivela, I., Sanroman, A., 2000. Extracellular ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in a new solid state bioreactor. *Biotechnology letters* 22: 1443-1147.
- [44] Hirimuthugoda, N.Y., Chi, Z., Li, X., Wang, L., Wu, L., 2006. Diversity of phytase-producing marine yeasts. *Ciencias Marinas* 32: 673-682.
- [45] Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Remy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehmann, M., Loon, A.P.G.M.V., 1999. Biochemical characterization of fungal phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Applied and Environmental Microbiology* 65(2): 367-373.
- [46] Han, Y., Wilson, D.B., Lei, X.G., 1999. Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (phyA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1915-1918.
- [47] Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M., Loon, A.P.G.V., 1997. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1696-1700.
- [48] Wyss, M., Pasamontes, L., Remy, R., Kohler, J., Kuszniir, E., Gadiant, M., Müller, F., Loon, A.P.G.M.V., 1998b. Comparison of the thermostability properties of three acid phosphatases from molds: *Aspergillus fumigatus* phytase, *A.niger* phytase, and *A.niger* pH 2.5 acid phosphatase. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4446-4451.
- [49] Quan, C.S., Tian, W.J., Fan, S.D., Kikuchi, Y., 2004. Purification and properties of a low-molecular weight phytase from *Cladosporium* sp. FP-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94: 260-266.
- [50] Neves M.L.C., Silva M.F., Souza-Motta C.M, Spier M.R, Soccol C.R, Porto T.S., Moreira K.A., Porto A.L.F., 2011. *Lichtheimia blakesleeana* as a new potential producer of phytase and xylanase. *Molecules* 16: 4807-4817.
- [51] Marlida, Y., Delfita, R., Gusmanizar, N., Ciptaan, G., 2010. Identification characterization and production of phytase from endophytic fungi. *Engineering and Technology* 41: 1043-1046.
- [52] Lassen, S.F., Breinholt, J., Ostergaard, P.R., Brugger, R., Bischoff, A., Wyss, M., Fuglsang, C.C., 2001. Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytase from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. *Applied and Environmental Microbiology* 67(10): 4701-4707.
- [53] Simon, O., Igbasan, F., 2002. In vitro properties of phytases from various microbial origins. *International Journal of Food Science and Technology* 37: 813-822.
- [54] Berka, R.M., Rey, M., Brown, K.M., Byun, T., Klozt, A.V., 1998. Molecular characterization and expression of a phytase gene from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(11): 4423-4427.
- [55] Mitchell, D.B., Vogel, K., Weimann, B., Pasamontes, L., P.G.M., A., Loon, V., 1997. The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology* 143: 245-252.
- [56] Dungalhoef, M., Rodehutsord, M., Spiekers, H., Pfeffer, E., 1994. Effects of supplemental microbial phytase on availability of phosphorus contained in maize, wheat and triticale to pigs. *Animal Feed Science and Technology* 49(1-2): 1-10.
- [57] Nahm, K.H., 2002. Efficient feed nutrient utilization to reduce pollutants in poultry and swine manure. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 32(1):1-16.
- [58] Revy, P.S., Jondreville, C., Dourmad, J.Y., Nys, Y., 2006. Assessment of dietary zinc requirement of weaned piglets fed diets with or without microbial phytase. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 90: 50-59.
- [59] Cowteson, A.J., Acamovic, T., Bedford, M.R., 2004. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids from broiler chickens. *British Poultry Science* 45: 101-108.
- [60] Cao, L., Wang, W., Yang, C., Yang, Y., Diana, J., Yakupitiyage, A., Luo, Z., Li, D., 2007. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 497-507.
- [61] Boyce, A., Walsh, G., 2006. Comparison of selected physicochemical characteristics of commercial phytases relevant to their application in phosphate pollution abatement. *Journal of Environmental Science and Health Part A.* 41: 789-798.
- [62] Vats, P., Bhushan, B., Banerjee, U.C., 2009. Studies on the dephosphorylation of phytic acid in livestock fed using phytase from *Aspergillus niger* van teigem. *Bioresource Technology* 100: 287-291.
- [63] Simell, M., Trunen, M., Piironen, J., Vara, T., 1989. Feed and food applications of phytase, Lecture at 3rd Meet. Industrial Applications of Enzymes, Barcelona, Spain.
- [64] Haros, M., Rosell, C. M., Benedito, C., 2001. Fungal phytase as a potential breadmaking additive. *Eur Food Technol.* 213: 317-322.
- [65] Haros, M., Rosell, C.M., Benedito, C., 2001. Use of fungal phytase to improve breadmaking performance of whole wheat bread. *J Agric Food Chem.* 49(11): 5450-4.
- [66] Bilgiçli, N., Türker, S., 2004. Tarhanada sindirilebilir protein ve kül miktarı üzerine maya,

- malt unu ve fitaz katkılarının etkileri. *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 18(33): 90-97.
- [67] Siren, M., 1995. Method of Treating Pain Using Inositol Triphosphate. U.S. Patent 5407924.
- [68] Siren, M., 1998. Use of an Ester of Inositoltriphosphate for the Preparing of Medicaments. U.S. Patent 5846957.
- [69] Billington, D.C., 1993. The Inositol Phosphates. Chemical Synthesis and Biological Significance. Verlag Chemie, Weinheim/VCH Publishers, New York, USA.
- [70] Siren, M., 1986, New Myo-Inositol Triphosphoric Acid Isomer. Pat. SW 052950.
- [71] Liu, B., Rafiq, A., Tzeng, Y., Rob A., 1998. The Induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme and Microbial Technology* 22: 415-424.
- [72] Dalal, R.C., 1978. Soil organic phosphorus. *Adv. Agronom.* 29: 83-117.
- [73] Day, P.R., 1996. Genetic modification of plants: significant issues and hurdles to success. *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 651-656.
- [74] Naz, F., Maqbool, A., Abdullamalik, K., 2013. Degradation of legume phytate in soil using fungal phytase. *Pak. J. Bot.* 45(3): 1017-1022.
-