

T.C
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

84068

TÜRKİYE’NİN DOMİNANT MİKROFLORASINDAN
BAZI *DEUTEROMYCETES* CİNSLERİNİN
PROTEAZ VE AMİLAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ

Özlem ÇELTİK
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanları

I.Danışman: Prof.Dr. İ.Yavuz SEZEN
II.Danışman: Prof.Dr. Şeminur TOPAL

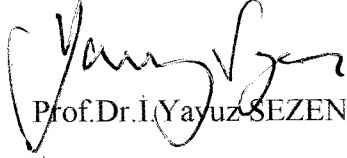
T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

GEBZE
1999

Bu tez çalışması, G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 02.06.1999 tarih ve 99/13-3 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından BİYOLOJİ Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE:


Prof. Dr. İ. Yayuz SEZEN

(Tez Danışmanı)

ÜYE:


Prof. Dr. Şeminur TOPAL

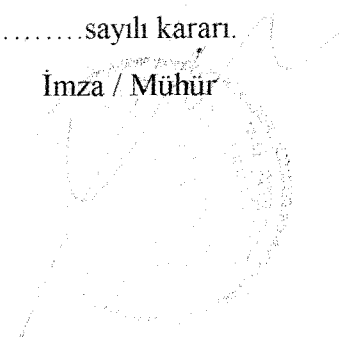
ÜYE:


Yrd. Doç. Dr. Aziz TANRISEVEN

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.....tarih ve sayılı kararı.

İmza / Mühür



ÖZET

Bu çalışmada, endüstriyel alanda yoğun olarak kullanılan ve büyük öneme sahip amilaz ve proteaz enzimlerinin, bazı küfler tarafından üretilme yetenekleri araştırıldı. Bu amaçla incelenen *Deuteromycetes* grubuna ait 208 adet küf kültürünün, özgün besiyerleri kullanılarak her iki enzimi üretme yetenekleri kalitatif olarak belirlenmiştir. Bu küf kültürleri, TÜBİTAK-MAM GBTAE’de oluşturulan “Türkiye’nin Dominant Mikoflora Kültür Koleksiyonu” na ait suşlar olup, konuyla ilgili projenin bir alt çalışmasını kapsamaktadır.

Yapılan deneyler sonucunda; incelenen test kültürlerinde genel değerlendirme ile amilaz enzimi üretme yeteneği %25, proteaz enzimi üretme yeteneği %74 olarak bulunmuştur. Ayrıca amilaz enzimi üretme yeteneği bakımından en verimli türlerin; *Paecilomyces variotti*, *Trichoderma harzianum* ve *Trichoderma viride*, proteaz enzimi üretme yeteneği bakımından en verimli türlerin ise; *Curvularia orechstela*, *Scopulariopsis brevicaulis* ve *Trichoderma viride* türlerine ait suşların olduğu görülmüştür.

ABSTRACT

In this study, production ability of amylase and protease enzymes which are highly used in industrial area and have big importance, have been researched by using some moulds. For this aim, 208 mould cultures which belong to *Deoteromycetes* species, have been examined. At the industry by using special culture medium the production ability of both enzymes have been determined qualitatively.

These mould cultures are the strains of “Culture Collection Establish by Dominant Mycoflora of Turkey” which is constituted at TUBİTAK-MRC FSTRI, and it comprises substudy of the subject related project.

As a result of the experiments; at the test cultures that have been researched, amylase enzyme production ability is 25% and protease enzyme production ability is evaluated as 74%. Among the species that are the most productive at amylase enzyme production are *Paecilomyces variotti*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* , the species that are the most productive at protease enzyme production are *Curvularia orechstela*, *Scopulariopsis brevicaulis* and *Trichoderma viride* strains.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen fakültemiz Biyoloji Bölümü Bölüm Başkanı Sayın Prof.Dr. Abdülkadir AKÇİN'e ve Biyoloji Bölümü öğretim üyesi değerli hocam ve aynı zamanda tez danışmanım Sayın Prof.Dr. İ. Yavuz SEZEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin gerek deneysel aşamasında ve gerekse yazım aşamasında sonsuz bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bana her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan, bu çalışma döneminde TÜBİTAK-MAM, GBTAЕ'nün Araştırma Başuzmanı ve "Türkiye'de Küf Koleksiyonu Oluşturulması" isimli projenin yürütücüsü olan ve halen Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof.Dr. Şeminur TOPAL'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımın deneysel kısmını gerçekleştirdiğim, başta TÜBİTAK-MAM Gıda Bilimi ve Teknolojisi Araştırma Enstitüsü değerli çalışanları olmak üzere; ihtiyacım olan her anda bana destek ve yardımcı olan ve sonsuz hoşgörü gösteren Mikrobiyoloji Laboratuvarında görevli olan çok değerli arkadaşlarım Ceyda PEMBEÇİ, Arzu TANLASI ve İbrahim KELEBEK'e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında bana sonsuz anlayışla yardımcı olan başta Tuba YILDIRIM, Mine GÜL ve Mehmet TUNÇ olmak üzere GYTE Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlilerine, ayrıca literatür çevirilerinde çok büyük yardımını gördüğüm değerli arkadaşım Arş.Gör. Orhan ÇÖMLEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin gerçekleştirilmesi esnasında olduğu kadar hayatımın her anında bana sevgi ve desteklerini esirgemeyen çok değerli babam, annem ve kardeşlerime en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	ix
ÇİZELGELER	x
1.GİRİŞ	1
2.LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1.GENEL BİLGİLER	4
2.1.1.ENZİMLER	4
2.1.2.ENZİMLERİN İSİMLENDİRİLMESİ VE SINIFLANDIRILMASI	4
2.2.ENDÜSTRİYEL ENZİMLER VE KAYNAKLARI	6
2.2.1.ENDÜSTRİYEL ENZİM ÜRETİMİNDE MİKROBİYAL KAYNAKLARIN AVANTAJLARI	8
2.2.2.AKTİVİTELERİ ARAŞTIRILACAK ENZİMLER	8
2.2.2.1.AMİLAZLAR	8
2.2.2.2.PROTEAZLAR	9
2.3.ENZİMLERİN ENDÜSTRİYEL KULLANIMLARI	11
2.3.1.DETERJAN ENDÜSTRİSİNDE	12
2.3.2.GIDA ENDÜSTRİSİNDE	13
2.3.3.TEKSTİL VE DERİ ENDÜSTRİSİNDE	14
2.3.4.TIBBİ VE FARMASÖTİK ENDÜSTRİSİNDE	14
3.MATERYAL VE METOT	16
3.1.MATERYAL	16
3.1.1.KÜF KÜLTÜRLERİ	16
3.2.METOT	19
3.2.1.KÜF KÜLTÜRLERİNDE ENZİMATİK	

AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ	19
3.2.2.SPOR SÜSPANSİYONUNUN HAZIRLANMASI	19
3.2.3.AMİLAZ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ	19
3.2.3.1.ORTAMIN BİLEŞENLERİ	20
3.2.3.2.AMİLAZ ENZİM ÜRETİM AKTİVİTESİNİN SAPTANMASI	20
3.2.4.PROTEAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ	21
3.2.4.1.PROTEAZ ÜRETİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ İÇİN KULLANILAN ÖZGÜN ORTAMIN HAZIRLANMASI	21
3.2.4.2.PROTEAZ ÜRETİM AKTİVİTESİNİN SAPTANMASI	21
4.BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4.1.AMİLAZ VE PROTEAZ ENZİM AKTİVİTESİ TEST SONUÇLARI	23
4.2.AMİLAZ ENZİM AKTİVİTESİ SONUÇLARININ GENEL DEĞERLENDİRMESİ	27
4.3.PROTEAZ ENZİM AKTİVİTESİ SONUÇLARININ GENEL DEĞERLENDİRMESİ	29
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

GYTE	Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu
GBTAE	Gıda Bilimleri ve Teknolojisi Araştırma Enstitüsü
MAM	Marmara Araştırma Merkezi
MRC	Marmara Research Center
FSTRI	Food Science and Technology Research Institute
atm.	Atmosfer Basıncı
C	Karbon
E.C.	Euro Code
g	Gram
H	Hidrojen
l	Litre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
Mn	Mangan
N	Azot
O	Oksijen
°C	Derece Santigrat
PDA	Potato Dextrose Agar
pH	Ortamdaki hidrojen iyonu konsantrasyonunun negatif logaritması
sp.	Species (Tür)
spp.	Subspecies (Alt Tür)
YNB	Yeast Nitrogen Base
Zn	Çinko

ŞEKİLLER

Sekil

Sayfa

4.1 .Mevcut Küflerin Proteaz Enzimi Üretme Yeteneklerinin Genel Değerlendirmesi	33
4.2 .Çeşitli <i>Deuteromycetes</i> Cins ve Türlerinde Proteaz Enzim Üretme Yeteneğinin İrdelenmesi	35
4.2a <i>Alternaria alternata</i> Türüne Ait Suşlar	35
4.2b <i>Cladosporium cladosporoides</i> Türüne Ait Suşlar	35
4.2c <i>C.herbarum</i> Türüne Ait Suşlar	35
4.2d <i>C.macrocarpum</i> Türüne Ait Suşlar	35
4.2e. <i>C.sphaerospermum</i> Türüne Ait Suşlar	35
4.2f. <i>C.resinae</i> Türüne Ait Suşlar	36
4.2g <i>Curvularia geniculata</i> Türüne Ait Suşlar	36
4.2h <i>Epicoccum purpurascens</i> Türüne Ait Suşlar	36
4.2i. <i>Mucor hiemalis</i> Türüne Ait Suşlar	36
4.2j. <i>M.racemosus</i> Türüne Ait Suşlar	36
4.2k. <i>Paecilomyces fulvus</i> Türüne Ait Suşlar	36
4.2l. <i>Phialophora fastigata</i> Türüne Ait Suşlar	36
4.2m <i>Phoma glomerata</i> Türüne Ait Suşlar	36
4.2n. <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> Türüne Ait Suşlar	37
4.2p <i>S.candida</i> Türüne Ait Suşlar	37
4.2r. <i>Stemphylium lanigunosum</i> Türüne Ait Suşlar	37
4.2s. <i>Syncephalastrum racemosum</i> Türüne Ait Suşlar	37
4.2t. <i>Trichoderma harzianum</i> Türüne Ait Suşlar	37
4.2u <i>Ulaclodium chartarum</i> Türüne Ait Suşlar	37
4.2v. <i>Verticillium sp.</i> Türüne Ait Suşlar	37

ÇİZELGELER

Cizelge

Sayfa

3.1.Kullanılan Küflerin Alfabetik Sıralamasına Göre Suş Numaraları	16
4.1.İncelenen Küf Kültürlerinin Amilaz ve Proteaz Enzimleri Üretimi Açısından Genel Değerlendirmesi	23
4.2.İncelenen Küf Kültürlerinin Amilaz Enzim Aktivitesi Bulguları Açısından Genel Değerlendirmesi	28
4.3. İncelenen Küf Kültürlerinin Proteaz Enzim Aktivitesi Bulguları Açısından Genel Değerlendirmesi	30

1.GİRİŞ

Bilimin ve teknolojinin gelişmesiyle, günümüzde endüstriyel üretimde kullanılan birçok maddenin, azalan ve tükenmekte olan doğal kaynaklardan üretilmesinin yerini, mikroorganizmalar yoluyla üretilenlerin alması, giderek önem kazanmış ve vazgeçilmez bir hal almıştır. Bu mikroorganizmalar arasında küfler de büyük önem taşımaktadır. Doğal çevrede yaygın olarak bulunabilen küfler, ekosistemde yararlanılır nitelikli ürünler üretebildiklerinden, endüstriyel uygulamalarda kaynak olma özelliğini kazanmıştır. Küfler, primer ve sekonder olarak adlandırılan bazı metabolik ürünler üretirler. Primer metabolizma ürünleri, enzim ve DNA üretimi gibi büyüme ve gelişmeye ait ürünleri kapsar. Bu ürünlerin meydana gelebilmesi için birbiriyle ilişkili bir seri anabolizma ve katabolizma reaksiyonları gerçekleşir. Küflerin özellikle primer metabolitlerinden olan enzimler açısından endüstriyel boyutlu önemli bir kaynak oluşturması birçok avantaj sağlamaktadır.

Çeşitli enzimlerin, organik asitlerin, amino asitlerin, antibiyotiklerin üretiminde sıkça kullanılan küfler, bunlara ilave olarak ökaryotik organizmalarda protein salgılanması ve genetik çalışmalar için de yararlı kaynaklardır. Sekonder metabolizma ürünleri ise, mikotoksin sentezlerini içerir ve sağlık sorunları yaratması nedeniyle önem taşıyan ürünlerdir (Paterson and Bridge, 1994).

Endüstriyel gelişmeler, enzimlerin birçok alanda ve çeşitli şekillerde kullanılmasını arttırmıştır. Gıda (bira, peynir, et ürünleri, şarap, meyva suyu, ekmek vb), tekstil, deterjan, deri, kuru temizleme, farmasötik ve kağıt endüstrileri gibi sektörler enzimlerin sıkça kullanılabildiği alanlar olarak sayılabilmektedir. Bunlara ilaveten tıpta kimyasal ve klinik analizlerde de enzimler kullanılmaktadır (Beckhorn,1967; Dağışan,1997; Erarslan,1997; Kazan,1997).

Biyolojik kökenli, protein yapısına sahip özel katalizörler olarak tanımlanan enzimler, tüm canlı hücreler tarafından üretilirler. Enzimlerin protein yapısında olmalarının yanında, bazıları da protein olmayan prostetik gruplara sahiptirler. Buna

rağmen bir çoğunun sentezi ve yapısal tanımlaması oldukça karmaşıktır (Beckhorn,1967).

Enzim alanında yapılan ilk çalışmalar 1760-1825 yılları arasında olup sindirim enzimleri ile ilgilidir. 1833 yılında şekeri parçalayan aktif madde kısmen izole edilmiş ve bu maddeye “diastaz” adı verilmiştir ki bu enzim şu anda amilaz olarak bilinmektedir. 1878 yılında Kuhne bu aktif maddelere genel tanımla ferment adını vermiştir (Kazan,1997).

1874 yılında, Danimarka’lı kimyacı Christian Hansen, peynir yapımında kullanılan kurutulmuş dana işkembesinden, ilk defa “Chymosin” adı verilen enzimi izole etmiştir. Bu buluş bu günkü modern enzim teknolojisinin başlangıcını oluşturmaktadır (Dağışan,1997).

Enzimlerin endüstriyel amaçla ilk kez kullanımı, 1894 yılında Dr. Jhokichi Takamine’nin koji üretimi amacıyla *Aspergillius oryzae*’den bir enzim preparatı elde etmesiyle başlamıştır (Emek,1997). Aynı yıl Dr. Takamine tarafından “Process of Making Diastatic Enzyme” adlı patent alınmıştır (Beckhorn,1967). Takamine 1896 yılında, buğday kepeğinde, *Aspergillius oryzae*’den hidrolitik bir enzim olan, ‘Takadiastase’i üretmiş ve bu işlem, mikrobiyal enzim teknolojisinin başlangıcı olarak kabul edilmiştir. Ayrıca; pankreatik enzim üreten Otto Rhöm ve proteolitik enzimleri biracılıkta kullanan Leo Walterstein, ilk endüstriyel enzim uygulayıcıları arasında sayılabilir(Beckhorn,1967; Barbesgaard,1977; Shear,1981; Topal,1982).

Günümüzde endüstriyel enzimler; peynir, ekmek, meyve suyu, hayvan yemi gibi değişik ürünlerin üretiminde; vizkozitenin düşürülmesi, ekstraksiyon ve verimin arttırılması, ürün fonksiyonunun değiştirilmesi, lezzet artışının sağlanması, tüketilen gıda maddesinden vücudun daha kolay yararlanabilmesinin sağlanması amaçlarıyla yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bu gün için bilinen yaklaşık 25000 çeşit enzim vardır. Bunlardan yaklaşık 2500 tanesi “International Union of Biochemistry” (Uluslararası Biyokimya Birliği) tarafından kabul edilmiş durumdadır. Fakat bu sayıya rağmen, endüstriyel olarak üretilen ve kullanılan enzim sayısı yaklaşık 30 civarındadır. (Dağışan,1997)

Bu tez çalışmasında; önemli endüstriyel enzimlerden olan proteaz ve amilazın, bazı küfler tarafından üretilme yetenekleri araştırılmıştır. Yapılan bu çalışma, TÜBİTAK-MAM Gıda Bilimi ve Teknolojisi Araştırma Enstitüsü'nce yürütülen “Türkiye'nin Tarımsal Mikoflorasını Oluşturan Küflerin Endüstriyel Öneme Sahip Metabolik Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Küf Koleksiyonu Merkezi Kurulması” adlı projenin bir parçasını oluşturmaktadır. İlgili genel proje kapsamında, Türkiye'nin çeşitli bölgelerindeki tarımsal ürünlerinden izole edilerek tanımlanmış ve “Küf Koleksiyonu” oluşturma amacıyla muhafazaya alınmış, dolayısıyla Türkiye'nin dominant mikoflorasını yansıtan 2014 saf küf kültürünün, endüstriyel öneme sahip olabilecek bazı metabolik aktivitelerinin belirlenmesi de yer almaktadır. Belirlenen bu özellikleriyle, mevcut mikofloranın endüstriyel alandaki üretim potansiyellerinin belirlenip biyoteknoloji alanında endüstriyel üretim çalışmalarına bir katkı sağlaması amaçlanmıştır. Bu amaçla, mevcut saf küf kültürlerinin tamamı endüstriyel açıdan önemli 6 enzim (proteaz, amilaz, lipaz, selüloz, ksilanaz ve β -glukanaz) yönünden taramaya alınmış olup (Topal, 1998) çalışmalar tamamlanmış ve ilgili tüm değerlendirmeler sonuçlandırılarak halen basımda olan bir “Küf Koleksiyon Katologu” hazırlanmış ve basıma verilmiştir.

Bu tez çalışmasında ise; mevcut saf kültürlerden *Deuteromycetes* grubuna ait 208 adet küf kültürünün, proteaz ve amilaz enzimlerini üretme yetenekleri özgün besiyerleri kullanılarak kalitatif olarak incelenmiş ve endüstriyel önemleri açısından değerlendirmesine çalışılmıştır.

2.LİTERATÜR ÖZETİ

2.1.Genel Bilgiler

2.1.1. Enzimler

“Canlı hücreler tarafından sentezlenen protein yapısındaki biyolojik aktiviteye sahip katalizörler” olarak tanımlanan enzimler (Kazan,1997), hücre içinde madde değişimi, parçalanmaları ve biyosentezlerinden sorumludur (Topal,1982). Diğer bir deyişle enzimler, yaşam sisteminin biyolojik işlevlerinde, milyonlarca kimyasal reaksiyonun gerçekleşmesini sağlarlar. Böylece canlı sistemlerinin var oluşuna temel oluşturan tüm biyokimyasal yolların reaksiyonlarında düzenleyicisi ve katalizörü olarak rol alırlar (Borriss,1987). Enzimler, değişik reaksiyonlarda görev alan diğer katalizörlere göre, reaksiyonları çok daha hızlı, özgün, daha az enerji harcayarak ve düşük ısıda gerçekleştirebilmektedir .Tüm bu olayların oluşumunda meydana gelen reaksiyonlar sırasında, reaksiyona iştirak eden maddeler “substrat” olarak adlandırılırlar ve herbir enzim kendine özgü belirli bir substratı seçer (Kazan,1997).

2.1.2.Enzimlerin İsimlendirilmesi ve Sınıflandırılması

Enzimlerle ilk olarak geçen yüzyılda yoğun şekilde çalışılmaya başlandığında, kimyasal yapıları net olarak bilinmediğinden ve katalizledikleri reaksiyonlar tanımlanamadığından enzimler; sistematik olmayan biçimde gelişigüzel isimlendirilmiştir. O dönemde az sayıda enzim bilindiğinden, bu tür isimlendirme pek karışıklık yaratmazken, 1950’li yıllara gelindiğinde, birkaç yüz değişik enzim bulunmuş olduğundan terminoloji karmakarışık bir hal almıştı. Bunun üzerine 1953’te Hoffmann-Ostenhoff ve 1958’de Dixon-Webb bu karmaşaya bir son vermek için girişimde bulunmuşlar, Uluslararası Biyokimya Birliği’nin himayesinde bu gün de geçerli olan terminolojinin temelini oluşturmuşlardır (Borriss,1987).

Enzimler, kullandıkları substrat ve katalizledikleri reaksiyon tipine göre adlandırılırlar. Genellikle etkilediği substratın sonuna -az eki ilave edilerek adlandırma enzimler için bir kural haline gelmiştir, ancak proteolitik enzimler bu adlandırmanın dışındadır ve sonuna -in eki ilave edilerek adlandırılırlar. Papain ve tripsin bunun örnekleridir (Dinçkaya,1997).

Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından 1964 yılında bir Enzim Komisyonu oluşturulmuş ve bu komisyon tarafından 1978 yılında yeniden gözden geçirilerek bu günkü durumunu alan bir enzim sınıflandırma sistemi kabul edilmiştir. Bu sisteme göre enzimler 6 sınıfa ayrılmışlardır:

1.Oksidoredüktazlar: Bu gruptaki enzimler redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimler olarak bilinirler. Diğer bir deyişle; bir substrattan diğerine H_2O molekülü veya bir elektron transferini gerçekleştirirler. Glukozoksidaz ve katalaz enzimleri bu gruba örnek olarak gösterilebilir.

2.Transferazlar: Fonksiyonel bir grubun bir vericiden bir alıcıya transferini gerçekleştiren enzimler bu grubun üyeleridirler.

3.Hidrolazlar: C-O, C-N, C-C ve fosforik anhidrit gibi bazı bağların hidrolizini katalizleyen enzimler hidrolazlar olarak isimlendirilirler. α -amilaz, glukoamilaz, sellulaz, dekstranaz, pullulanaz, invertaz, laktaz, proteaz ve pektinaz hidrolazlar sınıfına ait enzimlerden bazılarıdır.

4.Liyazlar: Bu gruba dahil olan enzimler, C-C, C-O, ve C-N arasındaki bağları hidroliz ve oksidasyondan daha farklı bir yolla kırarlar veya bu atomlar arasına bir çift bağ ilave ederler.

5.İzomerazlar: Bir molekül içerisinde meydana gelen yapısal değişiklikleri katalizleyen enzimler izomerazlar olarak adlandırılırlar. Glukozizomeraz enzimi bu gruba örnek olarak verilebilir.

6.Ligazlar: Bu gruptaki enzimler C-O, C-S, C-N ve C-C atomları arasında bir bağ oluşumu sağlayarak, iki molekülün sentetik olarak bağlanmasını katalizlerler. Bu gruptaki enzimler “sentetazlar” olarak da isimlendirilirler (Borriss,1987; Dinçkaya,1997; Kazan,1997; Pamir,1985)

Bu enzimler içerisinde endüstriyel alanda en fazla kullanılanlar 3. Grup olan hidrolazlar ve özellikle de mikrobiyal kökenlileridir. Bu enzimler karmaşık ko-faktörler olmaksızın da etkindirler. Bu enzimlerin çoğu ekstrasellular yapıda olup diğer bir deyişle mikroorganizmalar tarafından hücre dışına salgılanırlar ve suda çözünebildiğinden kolay saflaştırılabilirler (Blain,1975; Borriss,1987).

Ekstrasellular enzimler, ortamda bulunan organik maddeleri parçalayarak hücreden bağımsız olarak görev yaparlar. İntrasellular enzimler ise, sitoplazmada dağınık halde bulunan ribozomlarda sentezlenirler Bütün intrasellular enzimler; düşük moleküler ağırlıklı substratlar üzerinde etkilidirler. İntrasellular enzimler, diğer bir deyişle, hücre metabolizması için önemli rollere sahiptirler (Topal,1985).

Eksoenzimler, polimerleri, molekülün bir ucundan saldırarak bir ve ya iki monomerik üniteyi ard arda yok etmek şekliyle etkilerler. Endoenzimler ise, polimerlerin iç kısımlarına saldırarak eksoenzimlere göre daha büyük molekül parçacıklarını serbest bırakırlar (Kruger ve ark.,1991).

2.2. Endüstriyel Enzimler ve Kaynakları

Endüstriyel enzimler; bitkisel (malt diastaz, papain, bromelin, fisin), hayvansal (pankreatik enzimler, pepsin, katalaz, rennin) ve mikrobiyal (amilaz, proteaz, lipaz, pektinaz, invertaz, glukoz oksidaz, sellulaz, amiloglukozidaz) olmak üzere başlıca üç önemli kaynaktan elde edilirler (Beckhorn,1967).

Bitkilesel kökenli endüstriyel enzimler, toksik olmayan incir, enginar vb. yenilebilir bitkilerden üretilirler. Bu kategorideki en önemli enzimlerin örnekleri; arpa maltından elde edilen ve biracılıkta kullanılan amilaz, et tenderlendirmesi ile biranın

stabilizasyonunda kullanılan papaya meyvasından elde edilen papain'dir. Bitkisel kaynakların mevsimlere ve bölgelere göre göre kısıtlı oluşu en önemli dezavantajdır. (Beckhorn,1967; Noordervliet and Toet,1987; Telefoncu, 1997a).

Hayvansal kaynaklı enzimlerin kullanımı, çok eskilere dayanmakta olup, peynir yapımında kullanılan ve buzağı işkembesinden elde edilen rennet bu alanda verilebilecek başlıca örnektir. Geviş getiren hayvanların işkembesi, pankreas, tiroid bezi, domuz midesi ve tavuk yumurtasının akı önemli hayvansal enzim kaynaklarıdır. Hayvansal kökenli enzimlerin potansiyel kaynağı; insanların, etinden yararlandığı bu hayvanlara olan talepleriyle sınırlıdır. (Topal,1982; Noordervliet and Toet,1987)

Mikroorganizmalar ise, enzimlerin kısıtlı olmayan en önemli kaynaklarıdır. Mikrobiyal enzimler, kaynak mikroorganizmaların kontrollü fermentasyonları sonucu üretilirler. *Bacillus* türlerinden amilaz, proteaz, pullulanaz, katalaz, ksilenaz enzimleri; *Aspergillus niger*'den sellulaz, amilaz, pektinaz, proteaz; ve çeşitli mayalardan invertaz, laktaz, α -galaktosidaz enzimlerinin üretimi, önemli örneklerdendir. Kaynak mikroorganizmalar patojen ve toksijenik olmamalıdır, biyolojik stabilite göstermelidir ve mutasyona dayanıklı olmalıdır (Noordervliet and Toet,1987).

Bu enzimler, elde edildikleri kaynağa göre “fungal” ya da “bakteriyel” enzimler olarak isimlendirilmektedirler. Bakteriyel enzimler, bakterilerin kontrollü fermentasyonları ile üretilen enzimlerdir. Bu üretimde de özellikle *Bacillus* türleri kaynak mikroorganizma olarak kullanılmaktadır. *Bacillus amyloliquefaciens* ve *B. licheniformis* ticari α -amilazın kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bunun dışında; yine aynı mikroorganizmalardan ticari olarak proteaz enzimleri de üretilmektedir (Ketchum,1988). Fungal enzimler, özellikle *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* ve *Aspergillus* türlerinden üretilen ve endüstriyel uygulamalarda sıkça kullanılan enzimlerdir (Blain,1975).

2.2.1. Endüstriyel Enzim Üretiminde Mikrobiyal Kaynakların Avantajları

Mikroorganizmaların enzim üretiminde kullanılması, başta kaynak kısıtı olamaması gibi özellikler bakımından hayvansal ve bitkisel kaynaklarının kullanımına oranla daha avantajlıdır. Enzim kaynağı olarak hayvan ve bitkilerin kullanılması durumunda bu kaynakların yetişmesi için uzun süreler gerekirken, kaynak olarak mikroorganizma kullanıldığında bu süre 1,5 ila 10 güne kadar kısalmaktadır. Yüksek organizmalar için bu döngü iki hafta ile yıllar arasında değişebilir. Mikrobiyal üretimde verimlilik ve ürün kalitesinin geliştirme çalışmaları için kısa zaman ve küçük alanlar yeterli olabilmektedir (Frost and Moss,1987). Mikroorganizmalar kültür ortamında nispeten kolay kontrol edilebilirler, uygun suş seçimi ile de istenilen enzimi standart kalitede ve bol olarak elde etmek mümkündür.

2.2.2. Aktiviteleri Araştırılacak Enzimler

Tezin konusunu oluşturan başlıca iki enzim genel bilgi açısından incelenmiştir.

2.2.2.1.Amilazlar

Amilazlar, nişasta ve glikojen moleküllerini hidrolizleyen ekstrasellular enzimlerdir (Emek,1997). Yüksek bitkilerce üretilen nişasta, iki farklı fraksiyondan meydana gelir; amiloz ve amilopektin. Amiloz genellikle α -1,4 bağlarından oluşan linear bir polisakkarittir ve bazı α -1,6 bağlanma noktalarına sahiptir. Amilopektin ise yüksek bağlanma noktalarına sahip, ağaç benzeri bir yapıdadır. Glikojen hayvansal orijinli α -glukanlardır ve yapısı amilopektinden çok daha fazla dallanma gösteren bir formdadır. Amilazlar, nişasta endüstrisinde dekstrin, glukoz ve maltoz şurubu üretiminde kullanılır. Ekmekçilikte ise mayanın yanında yardımcı enzim vazifesi görürler (Telefoncu, 1997a).

Amilazlar nişastaya etki mekanizmaları ve oluşturdukları ürünler göz önünde bulundurularak üç grup altında toplanmışlardır; α -, β - ve glukamilazlar.

α -amilaz:

α -amilazlar (α -1,4 glukan 4-glukanhidrolaz, E.C 3.2.1.1); amiloz, amilopektin ve polisakkaridlerin α -1,4 glikosidik bağlarını hidrolizleyen enzimlerdir (Zemân and McCrea,1985; Whitaker,1972a). α -Amilazın çeşitli mikroorganizmalardan izole edildiği bilinmekte olup; *Bacillus subtilis*, *B.macerans*, *Aspergillus oryzae*, *A.candidus*, *A.niger*, bu mikroorganizmaların başlıcalarıdır (Tagaki ve ark., 1971).

β -amilaz:

Sadece yüksek bitkiler tarafından üretilen β -amilazlar (α -1,4 D glukan glukohidrolaz, E.C 3.2.1.2); nişasta molekülünün α -1,4 bağlarını hidrolizleyerek maltoz oluşturan bir eksoenzimdir. Dallanma noktalarındaki α -1,6 bağlarına etki etmez (Whitaker,1972a; Underkofler,1976; Vihinen and Mantsala, 1989).

Glukoamilaz:

Glukoamilazlar (α -1,4 glukan glukohidrolaz, EC 3.2.1.3); substrat zincirinden glukoz ünitelerini hidrolize eden eksoenzimlerdir (Whitaker,1972a;Underkofler,1976; Vihinen and Mantsala, 1989). Bu enzimin özelliği α -glukanların 1,6 1,4 ve bazen de 1,3 glikosidik bağlarını hidrolizleyebilmesi, substrattan β -d-glukoz üretmesidir (Vihinen and Mantsala, 1989).

2.2.2.2.Proteazlar

Proteazlar, diğer adıyla peptid hidrolazlar proteinlerin peptid bağlarını hidrolizleyen enzimler olarak tanımlanırlar. Proteazların, proteinlerin küçük moleküllü peptidlere ve amino asitlere hidrolizinde çok önemli rol oynadığı bilinmektedir. Hartley tarafından 1960'da dört grup altında toplanan proteazlar, etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmışlardır. Buna göre; serin proteazlar, sülfidril (thiol) proteazlar, metal içeren proteazlar ve asit proteazlar olarak isimlendirilmişlerdir (Whiteker,1972b; Cohen,1977; Löffler,1986;).

Serin Proteazlar:

Serin proteazlar; kemotripsin ve tripsin, elastaz, thrombin, subtilisin proteazları içine alır ve endopeptidazlar grubundandır. Bunlar doğal alkali ortamda aktivite

göstermektedirler (pH 8-11) (Whitaker,1972b; Frost and Moss,1987). Serin proteazlar çeşitli mikroorganizmalardan izole edilmekte olup; *Aspergillus oryzae*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Penicillium cyaneofulvum*, *Alternaria tenuissima*, *Saccharomyces cerevisiae* bunlardan bazılarıdır (Reed and Underkofler, 1966; Matsubara and Feder, 1971).

Sülfidril Proteazlar:

Bu gruptaki enzimler, proteinlerin peptid bağlarını hidrolizleme ve sülfidril yapılarıyla da inhibisyon yapma özelliğine sahiptirler. Bu enzimler arasında bitkisel kökenli papain, fisin ve bromelin sayılabilir. Ancak günümüzde bitki genleriyle transforme edilmiş mikroorganizmaların fermentasyonu, ya da doku kültürleriyle de üretilmektedir. Bu enzimler katalizledikleri reaksiyonlarda SH gruplarını kullanırlar ve nötral pH'de aktivite gösterirler. (Whitaker,1972b; Frost and Moss,1987)

Metalloproteazlar:

Bu gruba ait olan proteolitik enzimlerin aktif bölgelerinde metal iyon bağları bulunur. Karboksipeptidaz A ve B, glisin-glisin dipeptidaz ve lösin aminopeptidaz Zn^{+2} ye ihtiyaç gösterirken; prolidaz ve iminopeptidaz ise Mn^{+2} ye ihtiyaç duyar. Nötral pH'de yüksek aktivite gösterirler ve küfler ve bakterilerden yaygın olarak üretilmektedirler (Whitaker,1972b). Mikroorganizmalardan; *Bacillus subtilis*, *Streptomyces griseus*, *Aspergillus oryzae*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Pseudomonas aeruginosa*'dan metalloproteazlar üretilmektedir (Reed and Underkofler,1966; Matsubara and Feder,1971).

Asit Proteazlar:

Bu gruptaki enzimler, düşük pH'larda (pH 2.0-5.0) yüksek aktivite göstermektedirler. Geviş getiren hayvanların mide enzimleri bu gruba dahil olmakla birlikte, küflerden de yaygın olarak üretilmektedirler. Katalitik mekanizmalarında özellikle aspartik asidin karboksil grubunu kullanırlar. Bu grupta en fazla dikkat çeken ve çalışılan enzim pepsindir. Rennin de ticari uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Whitaker,1972b; Frost and Moss,1987). Pepsinin; *Aspergillus niger*, *A. awamori*, *A. fumigatus*, *Penicillium notatum*, *Rhizopus chinensis*, *R. oligosporus*, *Paecilomyces variotii*, *Mucor pusillus* ve *Alternaria tenuissima*'dan, renninin ise; *Mucor pusillus* ve

Endothia parasitica'dan izole edildiği bildirilmektedir (Matsubara and Feder, 1971). Yine başka bir kaynakta, *Trichoderma viride*'nin sellulaz'a ilave olarak proteazların da bir kaynağı olduğu bildirilmiştir (Shear,1981). Ayrıca, *Rhizopus* türleri de asit proteaz kaynağı olarak gösterilmiştir (Blain,1975).

2.3.Enzimlerin Endüstriyel Kullanımları

Enzimler uzun zamandır endüstriyel amaçlarla kullanılmaktadır. Bu kapsamda Underkofler 1954'te, fungal amilolitik enzimlerin üretimi ve uygulamaları hakkında bilgi vermiştir. Hoogerheide ise; 1954'te amilolitik olmayan bakteriyel ve fungal enzimlerin kullanımını bildirmiştir. Idson 1959 yılında enzimlerin klinik uygulamalarını tanımlamıştır. Ayrıca yine Underkofler ve Charles 1960'da ve Whitaker 1961'de amilolitik enzimlerin endüstride ve medikal alandaki uygulamalarını araştırmışlardır. Whitaker aynı yayınında fungus ve bakterilerin bir kısmıyla proteaz enzimlerinden olan endüstriyel üretimlerin bir listesini de vermiştir (Davies, 1963).

Enzimlerin endüstriyel alanda kullanımları, gün geçtikçe önem kazanmış ve artan bir biçimde kullanılmıştır. Endüstriyel enzimlerin dünya pazarındaki yeri 1965'lerde birkaç milyon dolar iken, 1986 yılında bu rakam 400 milyon dolara ulaşmıştır. Günümüzde ise bunun birkaç katı daha fazla arttığı ifade edilmektedir (Dinçkaya,1997).

Enzimlerin en önemli uygulamaları; yaklaşık %30-35'i ile deterjan endüstrisinde proteazların, % 20-25 pay ile nişasta endüstrisinde amilaz, amiloglukosidaz ve glukozizomerazların kullanımlarıdır. Bundan başka % 20 oranla süt ve süt ürünleri endüstrisinde, yaklaşık % 1-1,5 arasındaki bir payla da bira, meyva suyu ve şarap üretimi, unlu mamuller, tekstil, kağıt, deri ve yem sanayiinde kullanılmaktadır (Dinçkaya,1997). Pekçok kaynakta belirtildiği üzere endüstriyel alanda enzimlerin birçok uygulama alanı bulunmaktadır. Bunları; deterjanlar, gıda, tekstil ve deri ve farmasötik endüstrileri olmak üzere başlıca dört grup altında toplamak mümkündür (Löffler,1986; Noordervliet and Toet,1987)

Deterjan endüstrisinde kullanılan özellikle alkali proteazlar, deterjan formülasyonundaki diğer kimyasal katkılara ihtiyacı minimuma indirmektedir. Gıda endüstrisinde enzimlerin kullanımları, onların tanımlanmalarından çok önce başlamıştır. Bu enzimlerin klasik olarak gıda endüstrisinde kullanıldığı alanlar ekmek, alkol üretimi, peynir ve şarap yapımıdır. Tekstil ve deri endüstrisinde enzimler genel olarak istenilmeyen maddelerin ortamdan uzaklaştırılması için kullanılırlar ancak bu işlemin sonundaki son ürün enzim içermez. Medikal alanda kullanımları son derece önemli olan enzimler, gıdaların vücuttaki sindirimine yardımcı olacak şekilde veya tedavide kullanılmaktadırlar (Noordervliet and Toet,1987).

2.3.1. Deterjan Endüstrisinde;

Deterjanlarda enzim, ilk defa 1913 yılında Alman kimyacı Otto Röhm tarafından kullanılmıştır. Ancak bu amaçla kullanılan tripsin, kimotripsin gibi enzimler etkinliklerini gösterebilmek için sodyum karbonat varlığına ihtiyaç duymaktadır. Günümüzde ise deterjanların yüksek pH aralığında, bu enzimlerin etkinlikleri tartışılmaktadır. Bu güne kadar pekçok konuda çalışmalar yapılmış ve birtakım optimal koşulların belirlenmesinden sonra bu gün kullanılmakta olan ve hertip deterjanlarda kullanılmak için formüllendirilmiş proteazlar üretilmeye başlanmıştır. Bunlara ilave olarak α -amilazlar, sellulazlar ve lipazlar da deterjanlara katılmaktadır (Telefoncu, 1997a).

Deterjanlarda bulunan proteaz enzimleri, çamaşırlardaki protein lekelerini daha küçük oligopeptidlere parçalayarak diğer katkı maddelerinin de yardımıyla çözünür hale gelmesini sağlamaktadırlar. Ayrıca alkalın proteazlar kan, çimen ve diğer suda çözünebilen biyolojik lekelerin temizleme ajanları olarak etkilidirler (Batum,1997; Ketchum,1988; Telefoncu, 1997a).

2.3.2. Gıda Endüstrisinde;

Enzimlerin gıda endüstrisinde kullanımları, katkı maddelerinin üretimi ve yapısal iyileştirmeleri amaçlıdır. Yüksek fruktoz içeren mısır şurubu üretilmesi, bira ve ekmek üretimi, düşük laktozlu süt üretimi, etin yumuşatılması gibi işlemlerde enzimler sıkça kullanılmaktadır (Topal,1982; 1985; Peppler and Reed,1987; Telefoncu,1997a).

Süt endüstrisinde genellikle peynir oluşumu ve olgunlaştırılması ve atık ürün olan peyniraltı suyunun değerlendirilmesinde kullanılan, proteaz enzimleridir (Reed and Underkofler, 1966; Peppler and Reed,1987). Peynir yapımında kullanılan ve bir asit proteaz olan mikrobiyal rennin özellikle *Mucor miehei*, *M.pusillus* ve *Endothia parasitica*'dan elde edilmektedir (Bothast and Smiley,1978; Topal,1982; 1985;). Rennin, kazein misellerinden, koruyucu polipeptidleri hidrolize ederek sütü pıhtılaştırır, serbest kalan kazein mevcut kalsiyum iyonlarıyla etkileşerek bir pıhtı şekillenir ve bu peynir yapımında ana olaydır (Blain,1975; Topal,1982).

Şarap ve meyve suyu endüstrisinde kullanılan enzimler, verimin artırılması, filtrasyonun kolaylaştırılması, stabilite ve berraklığın sağlanması, acılığın giderilmesi gibi farklı uygulama alanlarına sahiptir. Pektinaz, sellulaz ve amilaz enzimleri bu amaçla kullanılırlar. Ayrıca biralara soğuk saklanabilmesi için proteaz enzimleri kullanılmaktadır (Bothast and Smiley,1978; Peppler and Reed,1987).

Ekmek sanayiinde, ekmek kalitesinin artırılması, bayatlamamanın geciktirilmesi gibi amaçlar için enzimler kullanılmaktadır. Bu amaçla bakteriyel ve fungal enzimlerden α - ve β - amilazlar, amiloglukozidazlar ve proteazlar kullanılmaktadır (Valjakka ve ark.,1994). Proteaz enzimleri, unun gluten proteinlerinin özelliklerinin değiştirilmesinde kullanılmaktadırlar. Fungal proteazlar, kraker ve bisküvi yapımında ve ekmeğin kalitesinin arttırılmasında kullanılırlar (Blain,1975; Atlas,1984).

Etin yumuşatılması ve gevrekleştirilmesinde çok uzun yıllardan beri papain, fisin ve bromelain gibi bitkisel kaynaklı proteazlar kullanılmaktadır. Bu enzimler bağ doku ve kas proteinlerini parçalarlar. Böylece etin yüzeyinde ve nispeten de iç kısımlarında

bir gevreklik meydana gelmektedir. Bu da etin lezzetini arttırmaya yardımcı olur (Reed and Underkofler,1966; Bothast and Smiley,1978;).

2.3.3. Tekstil ve Deri Endüstrisinde;

Deri endüstrisinde alkali proteazlar,albumin ve globulin gibi enzimler, proteinlerin ortamdan uzaklaştırılması için kullanılırlar.

Tekstil fabrikalarında ise özellikle pamuk ipliği ile çalışan firmalarda öncelikle ipliğin “nişasta pastası” denilen madde ile muamele edilmesi gerekmektedir. Bu işlem sayesinde ipliğin yüzeyi düzeltilir ve gerilmelere karşı dayanıklı hale getirilir. Ancak, dokuma yapıldıktan sonrada bu nişastanın yüzeyden uzaklaştırılması gerekmektedir ki; bu amaçla da amilaz enzimleri kullanılmaktadır. Proteazlar ise, büyük moleküllü protein artıklarını giderici ve ipek liflerinin serbestleştirilmesi işleminde kullanılırlar (Atlas,1984; Telefoncu,1997a).

2.3.4. Tıbbi ve Farmasötik Alanlarda;

Mikrobiyal enzimler, teşhis amaçlı laboratuvar analizlerinde ve tedavi amaçlı uygulamalarda kullanılmaktadırlar. Sindirimi arttırıcı olarak kullanılmaları yaygın olup, bu amaçla kullanılan enzimler, sellüloz, laktaz, lipaz, invertaz, α -amilaz ve proteazlardır.

Bazı enzimler ise, klinikte tedavi için kullanılırlar. Örneğin; Bromelain’in ödem ve travmada etkili olduğu, Tripsin’in bazı terepötik etkileri bulunduğu ve bazı proteazların trombotik emilimlere yardımcı olduğu rapor edilmiştir (Noordervliet and Toet, 1987; Peppler and Reed,1987; Telefoncu,1997b).

Yapılan bu tez çalışmasında da, endüstriyel uygulamalarda çok önemli yeri bulunan ve sıkça kullanılan amilaz ve proteaz enzimlerinin, TÜBİTAK-MAM GBTAE’de yürütülen projenin bir alt çalışması olarak kolleksiyon halinde korunmuş ve Türkiye Mikoflorasından olan bazı *Deuteromycetes* cinsi küf kültürleri tarafından

üretileme yetenekleri kalitatif olarak belirlenmeye ve endüstriyel önemleri ortaya konulmaya çalışıldı. Böylece TÜBİTAK-MAM’da oluşturulmuş bir küf kültür koleksiyonunun (Topal, 1998), ileride bir ticari potansiyel olabilmesi olanaklarının araştırılması çalışmasına katkıda bulunabilmek amaçlanmıştır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Küf Kùltürleri

Bu araştırmada *Deuteromycetes* grubuna ait 19 cins ve 30 türe ait toplam 208 adet saf küf kùltürü kullanılmıştır. Bu küfler; TÜBİTAK-MAM Gıda Bilimi ve Teknoloji Araştırma Enstitüsünce oluşturulan “Türkiye’nin Dominant Mikoflora Koleksiyonu”ndan sağlanmıştır ve yürütölmekte olan bir projenin alt çalışması olarak incelemeye alınmıştır. Bu küflerin koleksiyonda kayıtlı olan suş numaralarını da içeren sıralı listesi Çizelge:3.1.’de gösterilmiştir.

Çizelge:3.1 Kullanılan Küflerin Alfabetik Sıralamasına Göre Suş Numaraları

<u>KÜF ADI</u>	<u>SUŞ NO (MAM/(MRC))</u>
<i>Alternaria alternata</i>	1800a15, 1887a4, 1898a4, 1262d2, 1270a13 38c11, 1801a12, 1004a4, 515c1, 1796a23, 141d1, 1889a24, 1795a21, 1270d, 1434a42, 1813a21, 1800a12, 970a1, 366c4, 1741a42
<i>Botrytis cinerea</i>	1779a23
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1758a33, 110a13, 1759a22, 1913a42, 313c31,1059a12

Çizelge:3.1 (Devam)

<i>Cladosporium herbarum</i>	1061d5,1647a4, 1682a1,999a3, 129e7, 1792a23, 1800a16, 1159a3,568e2,1751a22, 1668a32, 1001a11, 1747a2, 569a12, 32c2, 1321a4, 1060d4, 141e1, 1794a41, 142a23, 1160a2, 1758a42, 1744a33, 932a32
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	970a2,1798a22, 144c13, 932a31, 1204d3, 1660a1, 1272a4, 1907a2
<i>Cladosporium resinae</i>	1693a1, 83a22, 83a24, 145c22, 944d1, 131a13, 1285d5, 1746a23
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	33c11,1009a3, 1796a25, 1059a32, 1795a22 88c32, 1252d4, 982a11, 1757a32, 131a11 1143a42, 1813a22, 1896a11, 317b23, 92c26,1888a31, 1749a33, 4453, 1754a31, 1895a2, 569d6, 1573a32, 84b23, 115d5, 298e4,1760a12, 1816a42, 1797a24, 1010a1, 1770a31, 1919d1, 568d5, 32e4, 1815a4, 1135a32, 328b12, 932a21, 1818a32, 1791a3, 1287a32, 1885a32, 1225a2, 1799a11, 1779a11, 1668a31
<i>Curvularia geniculata</i>	115d6, 1894a11, 115f2, 115d7
<i>Curvularia lunata</i>	88b22
<i>Curvularia orechstela</i>	328c21
<i>Doratomyces microsporus</i>	94c22
<i>Epicoccum purpurascens</i>	1682a4, 154a4, 960a12

Çizelge:3.1 (Devam)

<i>Monascus ruber</i>	38c1
<i>Moniliella acetoabutens</i>	23d
<i>Mucor hiemalis</i>	88e3, 89d, 88f2
<i>Mucor racemosus</i>	4381, 2343, 3191, 2884, 231, 382, 861 2684, 4681, 1973, 94a14, 2941, 2464, 1871 2095, 2793, 3571, 3074, 2257, 1793, 2583 2193, 3283, 4554, 3844, 3472, 7121, 3395
<i>Paecilomyces fulvus</i>	1886a2, 1903a35, 1884a22, 1891a14, 1817a34
<i>Paecilomyces variotti</i>	1775d3, 1026d3, 1741a13, 1694d6
<i>Papularia sp.</i>	1341d5
<i>Phialophora fastigata</i>	242a12, 1272a1
<i>Phoma glomerata</i>	1812a31, 1741a23, 1022a11, 298e7, 957a21
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	143b22, 982a12
<i>Scopulariopsis candida</i>	110b21, 941d3, 132b21
<i>Sporendonema sp.</i>	1641a4
<i>Stemphyllum lanigunosum</i>	1270a12, 1693a3, 1682a21
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	1054a1, 140b21
<i>Trichoderma harzianum</i>	567e5, 567d2, 1620d2, 1373d3, 1041d1
<i>Trichoderma viride</i>	1897a2

Çizelge:3.1 (Devam)

<i>Ulaclodium chartarum</i>	144f1, 1218a11, 1799a22, 33d1, 1285d3 1141d2, 1743a41, 7103, 1159d7, 1791a11 145a35, 1647a3, 1892a12, 569f6, 1204d4 135d42, 1001a21
<i>Verticillium sp.</i>	129b13, 130b42

3.2. Metot**3.2.1. Küf Kültürlerinde Enzimatik Aktivitenin Belirlenmesi**

Küf izolatlarının enzimatik aktivitelerinin belirlenebilmesi için, öncelikle spor süspansiyonu hazırlanmıştır

3.2.2. Spor Süspansiyonunun Hazırlanması

Enzim aktivitesi belirlenecek olan küf kültürünün bir spor süspansiyonunun hazırlanması gerekmektedir. Bunun için, petri içerisinde PDA (Potato Dextrose Agar) besiyerinde geliştirilmiş ve sporlanması için yaklaşık 7-10 gün 26-28⁰C'de inkübe edilmiş küf kültürlerinden; bir agar delici vasıtasıyla steril şartlarda 4 agar dilimi kesilmiş ve yine steril koşullarda, içerisinde 5ml distile su bulunan steril deney tüpleri içerisine aseptik olarak aktarılıp bir vortex yardımıyla hazırlanan spor süspansiyonu homojenize edilmiştir (Campenhout,1995).

3.2.3. Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi

PDA ortamında üretilip, süspansiyonu hazırlanan küf kültürleri özgün bir besi ortamına aktarılmaktadır (Paterson and Bridge,1994; Campenhout,1995)

3.2.3.1.Ortamın Bileşenleri

Küf kültürlerinin amilaz enzim aktivitelerinin tanımlanabilmeleri için kullanılan özgün ortamın bileşenleri; %1 çözünebilir nişasta, %2 agar, %0.15 bile salt (safra tuzu) ve %0.67 Yeast Nitrogen Base (YNB)'den oluşmaktadır. Bu besi ortamının hazırlanabilmesi için; çözünebilir nişasta, distile su içerisinde tamamen çözündürülüp şeffaflaşınca kadar kaynatıldıktan sonra, üzerine agar ve bile salt ilave edilip, 121°C'de, 1 atm basınç altında otoklavda 15 dakika steril edilmiştir. Hazırlanan besi ortamı yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra, daha önceden 10 katı konsantre olarak hazırlanmış ve filtre sterilizasyon yöntemi ile steril edilmiş 10 ml YNB çözeltisi, final konsantrasyonu %0.67 olacak şekilde ortama ilave edilerek, aseptik koşullarda petri kutularına dökülmüştür. Petride kullanılmaya hazır hale gelen besiyeri, yine aseptik koşullarda steril bir bistüri yardımıyla, yüzeyinde, yatay ve dikey paralel ikişer çizgi oluşturacak biçimde çizilmiştir (Campenhout,1995). Hazırlanan besi ortamının yüzeyinde oluşturulan çizgilerin birbirlerini kestikleri noktaların herbirine 10µl olacak şekilde spor süspansiyonu aseptik koşullarda inokule edilmiş ve 72 saat 26-28°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.3.2.Amilaz Enzim Üretim Aktivitesinin Saptanması

İnkübasyonun sonunda; ortamda bulunan nişasta, küf kültürünün amilaz enzimi üretmesi durumunda kullanılarak tüketilecektir. Bu durum nişasta indikatörü olarak kullanılan iyot ile test edilebilir. Bu amaçla petri yüzeyinde dilüe bir iyot çözeltisi ile muamelesi yapılmıştır.

İnkübasyonun sonunda petrilerin üzerine aşağıda formülasyonu verilen iyot çözeltisi püskürtülmüştür.

Iyot.....1g
 KI.....2g
 Distile su.....300ml

İyot ile muameleden sonra, nişastanın parçalanmadığı bölgeler mavi-lacivert renkte boyanırken, amilaz enzimi üreten kültürlerce, üremenin olduğu bölgeler ve etrafındaki ortamda, nişasta kullanılmış olacağından boyanmamış beyaz bölgeler meydana gelecektir. Eğer kültür enzimi üretmiyorsa; tüm bölgeler mavi renkte boyanacaktır. Böylece kültürün amilaz üretim yeteneğinde olup olmadığı saptanmıştır (Campenhout,1995; Paterson and Bridge,1994).

3.2.4. Proteaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Küflerin proteaz enzim aktivitelerinin belirlenebilmesi için, yine özgün besiyerleri kullanılmıştır (Topal,1998)

3.2.4.1. Proteaz Üretim Aktivitesinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Özgün Ortamın Hazırlanması

Küf kültürlerinin proteaz enzim aktivitelerini belirlemek amacıyla kullanılan özgün besi ortamının bileşimi; %0.1 K_2HPO_4 , %0.05 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, %0.05 KCl, %1.6 agar ve %13'lük yağsız süt tozu çözeltisinden oluşmaktadır.

Süt tozu çözeltisi hariç, diğer tüm bileşenler musluk suyunda karıştırılıp, çözündürüldükten sonra, $121^{\circ}C$ ve 1 atm basınç altında 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Bu steril karışım yaklaşık $50^{\circ}C$ 'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine son konsantrasyonu % 4.3 olacak şekilde destile su ile hazırlanmış ve $121^{\circ}C$ 'de otoklavda sterilize edilmiş %13'lük yağsız süt tozu çözeltisi, aseptik koşullarda ilave edilmiştir. Hazırlanan besi ortamı, steril test tüplerine herbirine 15ml olacak şekilde aseptik olarak dağıtılmış ve dik olarak dondurulmuştur (Topal,1998).

3.2.4.2. Proteaz Enzim Üretim Aktivitesinin Saptanması

Küf kültürlerinin proteaz enzimi üretim yeteneğinin saptanabilmesi için öncelikle 3.2.2.' de verilen yöntemle spor süspansiyonları hazırlanmış, daha sonra, homojenize halde bulunan spor süspansiyonundan 100µl alınarak, hazırlanan özel besiyeri içeren

tüplere aseptik koşullarda inokule edilmiş ve tüplerin dik olarak 26°C de 7. güne kadar inkübasyonu ile gelişmeler izlenmiştir.

Eğer kültür proteaz enzimini üretebiliyorsa; süt tozunda bulunan kazein, enzim tarafından parçalanacak ve tüp içerisinde derinlemesine doğru şeffaf bir bölge oluşacaktır. Kültür tarafından enzim üretimi söz konusu değilse, herhangi bir değişiklik meydana gelmeyecektir. Dolayısıyla testin değerlendirmesi, oluşan bu şeffaflık derinliğinin, inkübasyonun 3. ve 7. günlerinde bir cetvel yardımıyla ölçülmesi sonucu yapılmıştır (Topal,1998).



4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Amilaz ve Proteaz Enzim Aktivitesi Test Sonuçları

Bölüm 3.2’de verilen yöntemlere göre incelenen toplam 208 adet *Deuteromycetes* cins ve türlerinde, amilaz ve proteaz enzim üretebilme yetenekleri araştırılmıştır.

Her iki enzim üretim yeteneği açısından incelenen küf kültürlerine göre saptanan sonuçlar Çizelge 4.1 ve 4.2’de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 4.1: İncelenen küf kültürlerinin amilaz ve proteaz enzimleri üretimi açısından test sonuçları

Suş No. MAM/ (MRC)	Test Edilen Küf İzolatları	Protez enzim aktivitesi bakımından berraklık zonu derinliği (mm)			genel değerlendirme	
		3.Gün	7.Gün	3-7.Gün Ort.	proteaz *	amilaz *
1800a15	<i>Alternaria alternata</i>	0	2	1	-	-
1887a4	<i>Alternaria alternata</i>	2	14	8	+	-
1898a4	<i>Alternaria alternata</i>	1	7	4	+	-
1262d2	<i>Alternaria alternata</i>	4	13	9	+	-
1270a13	<i>Alternaria alternata</i>	2	11	7	+	-
38c11	<i>Alternaria alternata</i>	2	10	6	+	-
1801a12	<i>Alternaria alternata</i>	2	9	6	+	-
1004a4	<i>Alternaria alternata</i>	1	15	8	+	-
515c1	<i>Alternaria alternata</i>	6	17	12	+	-
1796a23	<i>Alternaria alternata</i>	2	15	9	+	-
141d1	<i>Alternaria alternata</i>	5	13	9	+	-
1889a24	<i>Alternaria alternata</i>	3	14	9	+	-
1795a21	<i>Alternaria alternata</i>	1	13	7	+	-
1270d	<i>Alternaria alternata</i>	1	10	6	+	+
1434a42	<i>Alternaria alternata</i>	1	10	6	+	-
1813a21	<i>Alternaria alternata</i>	3	11	7	+	-
1800a12	<i>Alternaria alternata</i>	2	14	8	+	-
970a1	<i>Alternaria alternata</i>	5	14	10	+	-
366c4	<i>Alternaria alternata</i>	5	14	10	+	+
1741a42	<i>Alternaria alternata</i>	5	11	8	+	+
1779a23	<i>Botrytis cinerea</i>	3	13	8	+	+
1758a33	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6	10	8	+	-
110a13	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3	16	10	+	-

Çizelge: 4.1. (Devam)

1759a22	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	5	9	7	+	-
1913a42	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6	9	8	+	-
1059a12	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6	9	8	+	-
313c31	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	4	9	7	+	-
1061d5	<i>Cladosporium herbarum</i>	4	9	7	+	-
1647a4	<i>Cladosporium herbarum</i>	2	9	6	+	-
1682a1	<i>Cladosporium herbarum</i>	5	9	7	+	-
999a3	<i>Cladosporium herbarum</i>	0	4	2	-	-
129 e7	<i>Cladosporium herbarum</i>	1	11	6	+	-
1792a23	<i>Cladosporium herbarum</i>	4	8	6	+	-
1800a16	<i>Cladosporium herbarum</i>	5	9	7	+	-
1159a3	<i>Cladosporium herbarum</i>	4	8	6	+	-
568 e2	<i>Cladosporium herbarum</i>	7	17	12	+	-
1751a22	<i>Cladosporium herbarum</i>	2	11	7	+	-
1668a32	<i>Cladosporium herbarum</i>	4	10	7	+	-
1001a11	<i>Cladosporium herbarum</i>	4	9	7	+	-
1747a2	<i>Cladosporium herbarum</i>	5	10	8	+	-
569a12	<i>Cladosporium herbarum</i>	5	8	7	+	-
32c2	<i>Cladosporium herbarum</i>	4	8	6	+	-
1321a4	<i>Cladosporium herbarum</i>	4	9	7	+	-
1060d4	<i>Cladosporium herbarum</i>	6	11	9	+	-
141 e1	<i>Cladosporium herbarum</i>	5	11	8	+	-
1794a41	<i>Cladosporium herbarum</i>	4	10	7	+	-
142a23	<i>Cladosporium herbarum</i>	7	12	10	+	-
1160a2	<i>Cladosporium herbarum</i>	5	8	7	+	-
1758a42	<i>Cladosporium herbarum</i>	6	12	9	+	-
1744a33	<i>Cladosporium herbarum</i>	2	8	5	+	-
932a32	<i>Cladosporium herbarum</i>	6	8	7	+	-
970a2	<i>Cladosporium macrocarpum</i>	7	19	13	+	-
1798a22	<i>Cladosporium macrocarpum</i>	4	10	7	+	-
144c13	<i>Cladosporium macrocarpum</i>	1	3	2	-	-
932a31	<i>Cladosporium macrocarpum</i>	4	7	6	+	-
1204d3	<i>Cladosporium macrocarpum</i>	1	3	2	-	+
1660a1	<i>Cladosporium macrocarpum</i>	0	5	3	-	-
1272a4	<i>Cladosporium macrocarpum</i>	3	11	7	+	-
1907a2	<i>Cladosporium macrocarpum</i>	0	2	1	-	-
1693a1	<i>Cladosporium resinae</i>	2	7	5	+	-
83a22	<i>Cladosporium resinae</i>	1	15	8	+	-
83a24	<i>Cladosporium resinae</i>	3	15	9	+	-
145c22	<i>Cladosporium resinae</i>	1	12	7	+	-
944d1	<i>Cladosporium resinae</i>	3	18	11	+	+
131a13	<i>Cladosporium resinae</i>	0	10	5	+	-
1285d5	<i>Cladosporium resinae</i>	3	16	10	+	-
1746a23	<i>Cladosporium resinae</i>	3	17	10	+	+
33c11	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	5	10	8	+	-
1009a3	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0	0	0	-	-
1796a25	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	4	7	6	+	-
1059a32	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	5	10	8	+	-
1795a22	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	3	5	4	+	-
88c32	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	2	5	4	+	-
1252d4	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	1	9	5	+	-
982a11	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	3	7	5	+	-
1757a32	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	4	8	6	+	-

Çizelge: 4.1. (Devam)

131a11	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	3	5	4	+	-
1143a42	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	2	7	5	+	-
1813a22	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0	2	1	-	-
1896a11	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	6	10	8	+	-
317b23	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	4	9	7	+	-
92c26	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0	4	2	-	-
1888a31	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	3	7	5	+	-
1749a33	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	5	9	7	+	-
4453	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	2	7	5	+	-
1754a31	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	4	6	5	+	-
1895a2	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	5	10	8	+	-
569d6	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	4	7	6	+	-
1573a32	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	3	9	6	+	-
84b23	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	2	7	5	+	-
115d5	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	3	6	5	+	-
298 e4	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	3	8	6	+	-
1760a12	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	5	9	7	+	-
1816a42	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	2	5	4	+	-
1797a24	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	4	10	7	+	-
1010a1	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	3	7	5	+	-
1770a31	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0	4	2	-	-
1919d1	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	3	11	7	+	-
568d5	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	3	7	5	+	-
32 e4	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	2	5	4	+	-
1815a4	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	3	4	4	+	-
1135a32	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0	0	0	-	-
328b12	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	4	7	6	+	-
932a21	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	3	10	7	+	-
1818a32	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	4	7	6	+	-
1791a3	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	2	7	5	+	-
1287a32	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0	1	1	-	-
1885a32	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	3	14	9	+	-
1225a12	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0	6	3	-	-
1799a11	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	4	10	7	+	-
1779a11	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	2	6	4	+	-
1668a31	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	4	9	7	+	-
115d6	<i>Curvularia geniculata</i>	1	18	10	+	-
1894a11	<i>Curvularia geniculata</i>	5	18	12	+	-
115f2	<i>Curvularia geniculata</i>	3	18	11	+	-
115d7	<i>Curvularia geniculata</i>	2	7	5	+	-
88b22	<i>Curvularia lunata</i>	0	0	0	-	-
328c21	<i>Curvularia orechstela</i>	4	20	12	+	-
94c22	<i>Doratomyces microsporus</i>	2	15	9	+	+
1682a4	<i>Epicoccum purpurascens</i>	1	6	4	+	-
154a4	<i>Epicoccum purpurascens</i>	0	4	2	-	-
960a12	<i>Epicoccum purpurascens</i>	0	3	2	-	-
38c1	<i>Monascus ruber</i>	0	8	4	+	-
23d	<i>Moniliella acetoabutens</i>	5	17	11	+	-
88 e3	<i>Mucor hiemalis</i>	1	2	2	-	-
89d	<i>Mucor hiemalis</i>	7	14	11	+	+
88f2	<i>Mucor hiemalis</i>	2	2	2	-	+
4381	<i>Mucor racemosus</i>	0	3	2	-	+
2343	<i>Mucor racemosus</i>	0	2	1	-	+

Çizelge: 4.1. (Devam)

3191	<i>Mucor racemosus</i>	0	2	1	-	+
2884	<i>Mucor racemosus</i>	0	2	1	-	+
231	<i>Mucor racemosus</i>	0	1	1	-	-
382	<i>Mucor racemosus</i>	0	2	1	-	+
861	<i>Mucor racemosus</i>	0	3	2	-	+
2684	<i>Mucor racemosus</i>	0	2	1	-	+
4681	<i>Mucor racemosus</i>	0	3	2	-	+
1973	<i>Mucor racemosus</i>	0	2	1	-	+
94a14	<i>Mucor racemosus</i>	0	4	2	-	+
2941	<i>Mucor racemosus</i>	0	0	0	-	-
2464	<i>Mucor racemosus</i>	0	2	1	-	-
1871	<i>Mucor racemosus</i>	0	2	1	-	+
2095	<i>Mucor racemosus</i>	0	1	1	-	+
2793	<i>Mucor racemosus</i>	0	1	1	-	+
3571	<i>Mucor racemosus</i>	0	3	2	-	+
3074	<i>Mucor racemosus</i>	0	2	1	-	+
2257	<i>Mucor racemosus</i>	0	3	2	-	-
1793	<i>Mucor racemosus</i>	0	2	1	-	-
2583	<i>Mucor racemosus</i>	0	2	1	-	+
2193	<i>Mucor racemosus</i>	0	2	1	-	+
3283	<i>Mucor racemosus</i>	0	2	1	-	+
4554	<i>Mucor racemosus</i>	0	2	1	-	+
3844	<i>Mucor racemosus</i>	0	2	1	-	+
3472	<i>Mucor racemosus</i>	0	2	1	-	-
7121	<i>Mucor racemosus</i>	0	1	1	-	-
3395	<i>Mucor racemosus</i>	0	3	2	-	+
1886a2	<i>Paecilomyces fulvus</i>	4	16	10	+	+
1903a35	<i>Paecilomyces fulvus</i>	2	12	7	+	-
1884a22	<i>Paecilomyces fulvus</i>	5	16	11	+	-
1891a14	<i>Paecilomyces fulvus</i>	4	13	9	+	-
1817a34	<i>Paecilomyces fulvus</i>	3	12	8	+	+
1775d3	<i>Paecilomyces variotii</i>	0	0	0	-	+
1026d3	<i>Paecilomyces variotii</i>	0	0	0	-	+
1741a13	<i>Paecilomyces variotii</i>	0	0	0	-	+
1694d6	<i>Paecilomyces variotii</i>	0	0	0	-	+
1341d5	<i>Papularia sp.</i>	0	0	0	-	-
242a12	<i>Phialophora fastigiata</i>	2	7	5	+	-
1272a1	<i>Phialophora fastigiata</i>	1	6	4	+	-
1812a31	<i>Phoma glomerata Corda</i>	1	2	2	-	-
1741a23	<i>Phoma glomerata Corda,</i>	0	2	1	-	+
1022a11	<i>Phoma glomerata Corda,</i>	0	7	4	+	-
298 e7	<i>Phoma glomerata Corda,</i>	0	2	1	-	-
957a21	<i>Phoma glomerata Corda,</i>	0	0	0	-	-
143b22	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	6	17	12	+	-
982a12	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	5	18	12	+	+
110b21	<i>Scopulariopsis candida</i>	4	10	7	+	+
941d3	<i>Scopulariopsis candida</i>	4	15	10	+	-
132b21	<i>Scopulariopsis candida</i>	4	12	8	+	-
1641a4	<i>Sporendonema sp.</i>	1	8	5	+	-
1270a12	<i>Stemphylium lanuginosum</i>	3	8	6	+	+
1693a3	<i>Stemphylium lanuginosum</i>	3	13	8	+	+
1682a21	<i>Stemphylium lanuginosum</i>	3	14	9	+	+
1054a1	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	2	10	6	+	-

Çizelge: 4.1. (Devam)

140b21	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	2	10	6	+	-
567 e5	<i>Trichoderma harzianum</i>	2	8	5	+	+
567 d2	<i>Trichoderma harzianum</i>	3	8	6	+	+
1620d2	<i>Trichoderma harzianum</i>	5	17	11	+	+
1373d3	<i>Trichoderma harzianum</i>	4	19	12	+	+
1041d1	<i>Trichoderma harzianum</i>	5	19	12	+	+
1897a2	<i>Trichoderma viride</i>	5	19	12	+	+
144f1	<i>Ulocladium chartarum</i>	2	14	8	+	-
1218a11	<i>Ulocladium chartarum</i>	4	17	11	+	-
1799a22	<i>Ulocladium chartarum</i>	1	19	10	+	-
33d1	<i>Ulocladium chartarum</i>	3	12	8	+	-
1285d3	<i>Ulocladium chartarum</i>	3	15	9	+	-
1141d2	<i>Ulocladium chartarum</i>	1	12	7	+	-
1743a41	<i>Ulocladium chartarum</i>	4	14	9	+	-
7103	<i>Ulocladium chartarum</i>	1	12	7	+	+
1159d7	<i>Ulocladium chartarum</i>	0	10	5	+	-
1791a11	<i>Ulocladium chartarum</i>	1	15	8	+	-
145a35	<i>Ulocladium chartarum</i>	2	12	7	+	-
1647a3	<i>Ulocladium chartarum</i>	0	7	4	+	-
1892a12	<i>Ulocladium chartarum</i>	0	13	7	+	-
569f6	<i>Ulocladium chartarum</i>	3	13	8	+	-
1204d4	<i>Ulocladium chartarum</i>	2	13	8	+	-
135d42	<i>Ulocladium chartarum</i>	0	4	2	-	-
1001a21	<i>Ulocladium chartarum</i>	2	11	7	+	-
129b13	<i>Verticillium sp.</i>	0	7	4	+	+
130b42	<i>Verticillium sp.</i>	0	9	5	+	-

*: 3. ve 7. Gütün şeffaf zonun derinlik değerleri ortalamaları 4mm ve üzerinde olanlar proteaz (+) olarak değerlendirilmiştir.

**: Amilaz için inkübasyonu takiben iyotla muamele sonucu berraklık zonu verenler (+), mavi rengi koruyanlar (-) olarak değerlendirilmiştir.

4.2. Amilaz Enzim Aktivitesi Sonuçlarının Genel Değerlendirmesi

Küf kültürlerinin amilaz enzim aktivitesi yönünden incelenmesiyle elde edilen sonuçlara ait genel değerlendirme, Çizelge 4.2’de verilmiştir. Çizelge 4.2’ye göre; incelenen küf kültürlerinden 52 adedi (% 25) amilaz enzimi üretme yeteneğine sahip olduğundan pozitif (+) olarak değerlendirilmiş, 156 küf örneğinin (%75) amilaz enzimi üretme yeteneğine sahip olmadığı görülmüştür. Ancak amilaz üretme yeteneği yönünden şüpheli olarak görülen 48 örnek de (+/-) olarak değerlendirilmiş olmakla birlikte genelde, amilaz üretmeyenler grubuna dahil edilerek (-) olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.2: İncelenen küf kültürlerinin amilaz enzim aktivitesi bulguları açısından genel değerlendirilmesi

İncelenen Küfler	Adedi	Amilaz değerlendirmesinin de zon genişliği	Amilaz (+) suş sayısı	Amilaz(-) suş sayısı
<i>Alternaria alternata</i>	20	8(-),9(+/-),3(+)	3	17
<i>Botrytis cinera</i>	1	1(+)	1	0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6	3(-),3(+/-)	0	6
<i>Cladosporium herbarum</i>	24	15(-),9(+/-)	0	24
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	8	5(-),2(+/-),1(+)	1	7
<i>Cladosporium resinae</i>	8	4(-),2(+/-),2(+)	2	6
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	45	42(-),3(+/-)	0	45
<i>Curvularia geniculata</i>	4	1(-),3(+/-)	0	4
<i>Curvularia lunata</i>	1	1(-)	0	1
<i>Curvularia orechstela</i>	1	1(-)	0	1
<i>Doratomyces microsporus</i>	1	1(+)	1	0
<i>Epicoccum purpurascens</i>	3	3(-)	0	3
<i>Monascus ruber</i>	1	1(-)	0	1
<i>Moniliella acetoabutens</i>	1	1(-)	0	1
<i>Mucor hiemalis</i>	3	1(-),2(+)	2	1
<i>Mucor racemosus</i>	28	3(-),4(+/-),21(+)	21	7
<i>Paecilomyces fulvus</i>	5	1(-),2(+/-),2(+)	2	3
<i>Paecilomyces variotti</i>	4	4(++)	4	0
<i>Papularia sp.</i>	1	1(-)	0	1
<i>Phialophora fastigata</i>	2	1(-),1(+/-)	0	2
<i>Phoma glomerata</i>	5	4(-),1(+)	1	4
<i>Scopulariopsis brevicalis</i>	2	2(+)	2	0
<i>Scopulariopsis candida</i>	3	1(-),1(+/-),1(+)	1	2
<i>Sporendonema sp.</i>	1	1(-)	0	1
<i>Stemphylium lanuginosum</i>	3	3(+)	3	0
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	2	2(-)	0	2
<i>Trichoderma harzianum</i>	5	5(++)	5	0
<i>Trichoderma viride</i>	1	1(++)	1	0
<i>Ulaclodium chartarum</i>	17	8(-),8(+/-),1(+)	1	16
<i>Verticillium sp.</i>	2	1(+/-),1(+)	1	1
TOPLAM	208		52	156

Sonuçlar türler düzeyinde değerlendirildiğinde; en fazla amilaz üreten gruplar (değerlendirmede zon genişliği dikkate alındığında), *Paecilomyces variotti*, *Trichoderma harzianum* ve *Trichoderma viride* olmuştur. Ayrıca; *Paecilomyces variotti*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Stemphylium lanuginosum*, *Trichoderma harzianum* türlerine ait tüm suşlarda amilaz pozitif özellik göstermiştir. *Cladosporium* cinsine ait tüm türlerde ise, amilaz enzim üretme yeteneği en az olarak saptanmıştır.

4.3. Proteaz Enzim Aktivitesi Sonuçlarının Genel Değerlendirilmesi

Küf kültürlerinin proteolitik enzim aktivitesi yönünden test edilmesi yoluyla elde edilen sonuçlar, genel değerlendirme ile Çizelge 4.3.'de bildirilmiştir.

Çizelge 4.3'e göre; proteaz enzim aktivitesini belirlemek için inkübasyonun 3. ve 7. günlerinde, test tüplerinde meydana gelen berraklık zonu derinliğinin, milimetrik olarak ölçümü ve bu iki ölçüm sonuçlarının aritmetik ortalamaları alınarak, şeffaflık derinliği 4 mm ve üzeri olan kültürler (+) olarak, 4 mm'den küçük olanlar ise, (-) olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmede kabul edilen 4mm'lik sınır değer; *Penicillium roqueforti*'ye ait sonuçlar referans alınarak belirlenmiştir (Topal, 1998).

Buna göre, incelenen tüm küf kültürlerinden 151 tanesi (yaklaşık %74'ü) pozitif (+) olarak değerlendirilirken, 57 kültürün (yaklaşık % 26'sı) proteazı hiç üretmediği ya da çok az ürettiği görülerek negatif (-) olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar türler bazında değerlendirildiğinde; *Curvularia orechstela*, *Scopulariopsis brevicaulis* ve *Trichoderma viride* türlerinin enzimi en yüksek değerde üreten kültürler oldukları görülmüştür. Bunun yanında *Moniliella acetoabutens*, *Trichoderma* ve *Ulaclodium* cinslerindeki türlerin enzim üretme yeteneklerinin oldukça iyi olduğu gözlenmiştir. Ayrıca; *Cladosporium cladosporoides*, *C.resinae*, *Curvularia geniculata*, *Paecilomyces fulvus*, *Phialophora fastigata*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *S.candida*, *Stemphylium laniginosum*, *Trichoderma harzianum* türlerine ait tüm suşlarda proteaz pozitif özellik göstermiştir.

Çizelge 4.3: İncelenen küf kültürlerinin proteaz enzim aktivitesi bulguları açısından genel değerlendirmesi

İncelenen Küfler	Adedi	Berraklık zonu derinliği (mm)			Proteaz	
		Minimum*	Maksimum*	Ortalama**	(+) suş sayısı	(-) suş sayısı
<i>Alternaria alternata</i>	20	2	17	8	19	1
<i>Botrytis cinera</i>	1	13	13	8	1	0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6	9	16	8	6	0
<i>Cladosporium herbarum</i>	24	4	17	7	23	1
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	8	2	19	5	4	4
<i>Cladosporium resinae</i>	8	7	18	8	8	0
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	45	0	14	5	38	7
<i>Curvularia geniculata</i>	4	7	18	10	4	0
<i>Curvularia lunata</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Curvularia orechstela</i>	1	20	20	12	1	0
<i>Doratomyces microsporus</i>	1	15	15	9	1	0
<i>Epicoccum purpurascens</i>	3	3	5	3	0	3
<i>Monascus ruber</i>	1	8	8	4	1	0
<i>Moniliella acetoabutens</i>	1	17	17	11	1	0
<i>Mucor hiemalis</i>	3	2	14	5	1	2
<i>Mucor racemosus</i>	28	0	4	1	0	28
<i>Paecilomyces fulvus</i>	5	12	16	9	5	0
<i>Paecilomyces variotti</i>	4	0	0	0	0	4
<i>Papularia sp.</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Phialophora fastigata</i>	2	6	7	5	2	0
<i>Phoma glomerata</i>	5	0	7	2	1	4
<i>Scopulariopsis brevicalis</i>	2	17	18	12	2	0
<i>Scopulariopsis candida</i>	3	10	15	8	3	0
<i>Sporendonema sp.</i>	1	8	8	5	1	0
<i>Stemphylium lanuginosum</i>	3	8	14	8	3	0
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	2	10	10	6	2	0
<i>Trichoderma harzianum</i>	5	8	19	9	5	0
<i>Trichoderma viride</i>	1	19	19	12	1	0
<i>Ulaclodium chartarum</i>	17	4	19	7	16	1
<i>Verticillium sp.</i>	2	7	9	5	2	0
TOPLAM	208				151	57

*: 7. Günlük değerlendirmeye göre minimum ve maksimum berraklık derinlikleridir.

**: 3. ve 7. Günü berraklık derinliği ortalamalarıdır.

MAM Küf Koleksiyonunda mevcut küflerin endüstriyel üretim potansiyellerini ortaya koymak amacıyla yapılan projenin bir alt proje çalışması çerçevesinde; *Deuretomycetes* grubunun proteaz ve amilaz üretim yetenekleri bu tez çalışmasının kapsamında ele alınmıştır.

Esasen, selektif ortamlar ve özgün yöntemler kullanılarak birçok küfün bazı enzimler açısından üretici karakterde olup olmadığının incelenmesi mümkün olabilecektir. Bu olay ayrıca küflerin genetik farklılıklarının da ortaya konmasını kolaylaştırmaktadır (Hankin and Anagnostakis,1975). Aynı araştırmacılar, yaptıkları çalışmada değişik gruplardan bazı küf kültürlerinin proteaz ve amilaz enzimi üretme yeteneklerini kalitatif olarak belirlemeye çalışmışlardır. Yapılan çalışmada *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium* ve *Trichoderma* gruplarıyla çalışılmıştır. Bu bakımdan bizim çalışmamızla önemli ölçüde kıyaslanabilir özelliktedir.

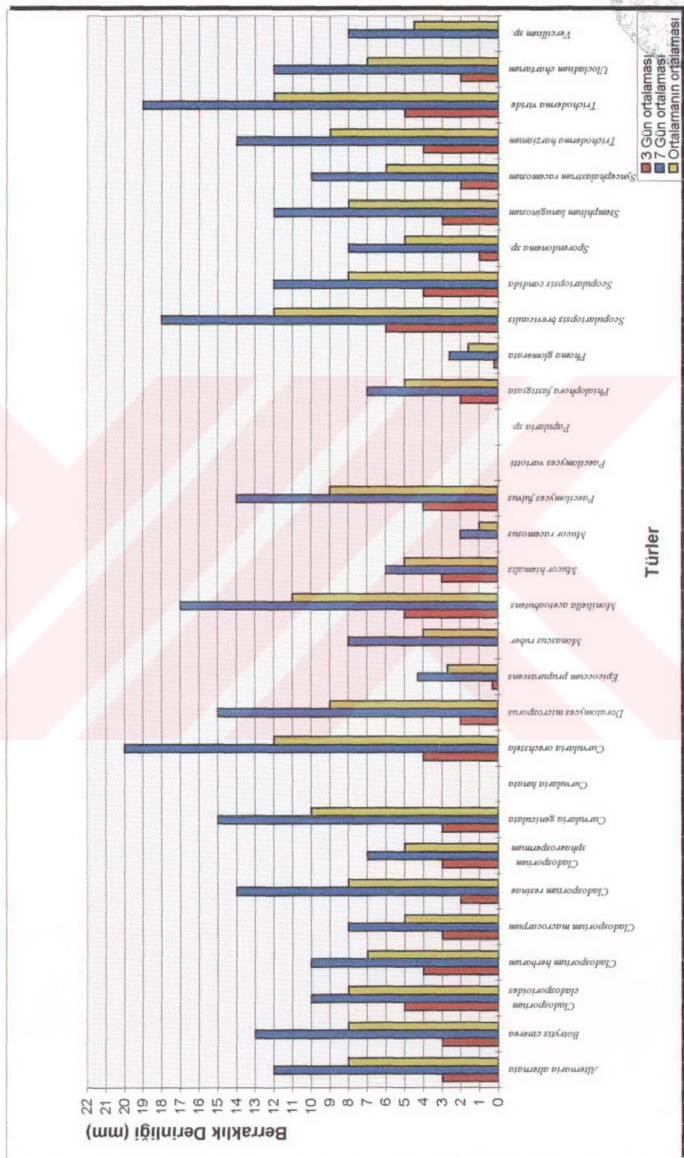
“4.Bulgular ve Tartışma” bölümünde belirtildiği üzere; proteaz enzim üretme yeteneği, 3. ve 7. günlerde saptanan ölçüm sonuçları kaydedilerek her iki ölçümün aritmetik ortalaması alınmak suretiyle bulunmuştur. Ancak Çizelge 4.1’e göre; üçüncü gün sonuçları baz alındığında, enzim üretimi en fazla olan suşlar 7mm’lik difüzyon oluşumu ile 568e2 ve 142a23 *Cladosporium herbarum*, 970a2 *C.macrocarpum*, 89d *Mucor hiemalis* olurken, bazı suşların 3.gün sonunda hiç enzim üretmedikleri gözlenmiştir. Bunlar; 1800a15 *Alternaria alternata*, 999a3 *Cladosporium herbarum*, 1660a1 ve 1907a2 *C.macrocarpum*, 131a13 *C.resinae*, 1009a3, 1813a22, 92c26, 1770a31, 1135a32, 1287a32 ve 1225a12 *C.sphaerospermum*, 88b22 *Curvularia lunata*, 154a4 ve 960a12 *Epicoccum purpurascens*, 38c1 *Monascus ruber*, *Mucor racemosus* grubuna ait tüm izolatlar, *Paecilomyces variotii* grubunun tümü, 1341d5 *Papularia sp.*, 1741a23, 1022a11, 298e7 ve 957a21 *Phoma glomerata*, 1159d7, 1647a3, 1892a12 ve 135d42 *Ulaculodium chartarum*, 129b13 ve 130b42 *Verticillium sp.* dir.

Aynı çizelgeden, yedinci gün sonuçları kendi arasında değerlendirildiğinde, enzim üretimi en fazla olan izolat 20 mm difüzyon derinliği ile 328c21 *Curvularia orechstela*’dır. 7. günün sonunda hiç enzim üretmeyen suşlar ise; 1009a3 ve 1135a32 suş nolu *Cladosporium sphaerospermum*, 88b22 suş nolu *Curvularia lunata*, 2941

suş nolu *Mucor racemosus*, *Paecilomyces variotii* türlerinin tüm suşları, 1341d5 suş nolu *Papularia sp.*, 957a21 suş nolu *Phoma glomerata*'dır.

3 ve 7.gün sonuçlarının ortalamaları gözönünde bulundurulduğunda ise, enzimi genel olarak en fazla üreten suşlar numaralarına göre; 328c21 *Curvularia orechstela* olmuştur. *Paecilomyces variotii*, *Papularia sp.*, 1009a3 ve 1135a32 *Cladosporium sphaerospermum*, 88b22 *Curvularia lunata*, 2941 nolu *Mucor racemosus* suşlarının ise proteaz enzimini hiç üretmedikleri saptanmıştır. Bu genel değerlendirmeye göre mevcut küf kültürleri proteaz enzimi üretme kabiliyetinde olan izolatların oranı % 74 olarak belirlenmiştir. Geriye kalan %26'lık kısmın ise enzimi hiç üretmediği ya da kaydadeğer bir sonuç vermediği belirlenmiştir. Mevcut küf kültürlerinin proteaz enzimi üretme yetenekleri bakımından toplu olarak genel değerlendirmesi şekil 4.1'de verilmiştir.

Amilaz enzimi üretme yetenekleri bakımından da değerlendirildiğinde; mevcut küflerin % 25'i pozitif (+) olarak tesbit edilmiştir. Enzimi üretme bakımından şüpheli olarak görülen ve enzimi hiç üretmeyen kültürler negatif (-) olarak değerlendirilmiştir.



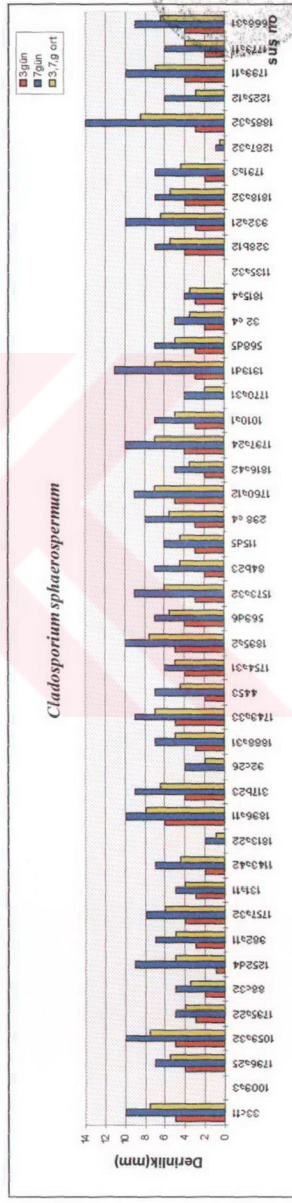
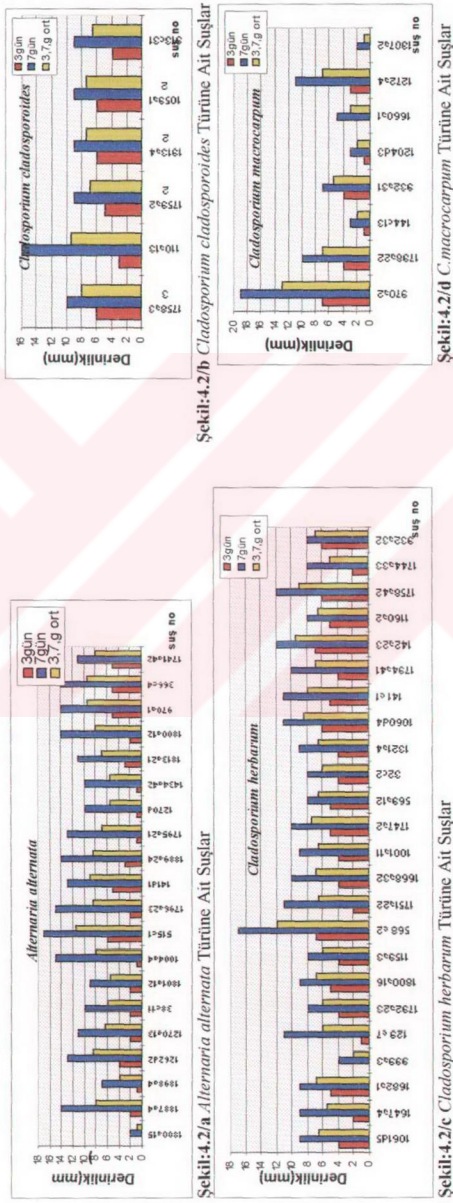
Dominant cins ve türler kendi aralarında ve her iki enzimatik aktivite yetenekleri açısından değerlendirildiğinde ortaya çıkan tablo; proteaz enzimi üretme yeteneği açısından grafikler halinde Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Amilaz enzimi üretme yetenekleri ise; bir grafiklendirmeye gidilmeden türler düzeyinde değerlendirilip tartışılmıştır.

Alternaria alternata türünde mevcut 20 suş incelenmiştir. Bu türde amilaz enzimi üretme yeteneği genel olarak negatif bulunmuş, ancak 1270d, 366c4 ve 1741a14 suşları pozitif özellikte değerlendirilmiştir. Proteaz enzimi üretme yeteneği bakımından ise; tüm suşlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Yalnızca 1800a15 suşu enzimi çok az ürettiği için negatif olarak kabul edilmiştir. Bu cinse ait proteaz aktivite sonuçlarının irdelenmesi Şekil 4.2/a'da verilmiştir. Şekil 4.2/a'ya göre; *A.alternata* suşlarının genel olarak 7.günde aktif proteaz üreticileri oldukları, ancak 3.günde bile pek çoğunun referans sınır değer olan 4mm'nin üstünde berraklık derinliği verdikleri saptanmıştır. Matsubara and Feder (1971), *Alternaria* cinsinden *A.temuissuma*'nın kültür ortamında en az üç farklı proteazın üretildiğini ve bunlardan birinin optimum pH'sı 2.8 olan bir asit proteaz olduğunu, ancak *A.temuissuma*'nın alkali proteazları da ürettiğini bildirmişlerdir.

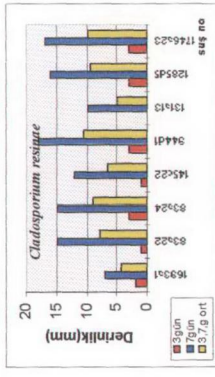
Çizelge:4.1'e göre; *Cladosporium cladosporoides* türünde mevcut hiçbir suşun amilaz enzimini üretmediği görülmüştür. Proteaz enzimi bakımından ise; tüm izolatların üretken olduğu görülmüş ve hepsi pozitif (+) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.2/b). 110a13 nolu suşun en üretken suş olduğu gözlenmiştir.

Çizelge:4.1' den yapılan incelemede; *Cladosporium herbarum* türünden 24 farklı suşun amilaz enzimi üretme yeteneği, tümünde negatif olarak saptanmıştır. Proteaz enzimi üretebilme yeteneklerine bakıldığında ise; tüm izolatların pozitif olduğu yalnızca 999a3 suşunun proteazı üretmediği gözlenmiştir (Şekil 4.2/c).

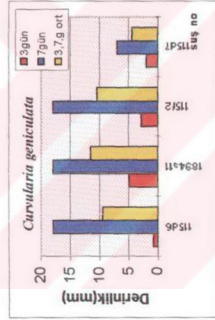
Şekil: 4.2.Çeşitli Deuteromycetes Cins ve Türlerinde Proteaz Enzim Üretme Yeteneğinin İrdelenmesi



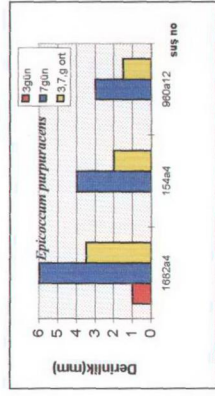
Şekil:4.2 (Devam)



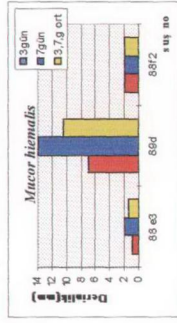
Şekil:4.2/f *C.resinae* Türüne Ait Süşlar



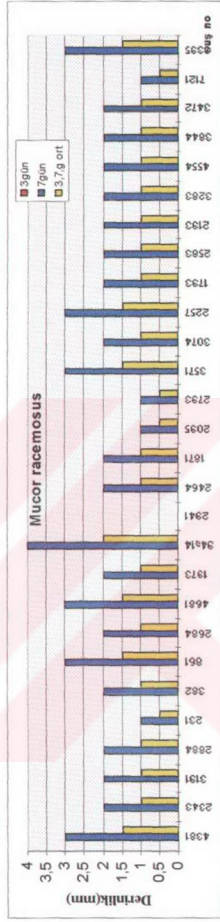
Şekil:4.2/g *Curvularia geniculata* Türüne Ait Süşlar



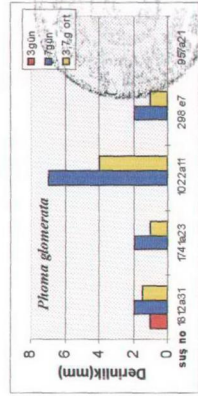
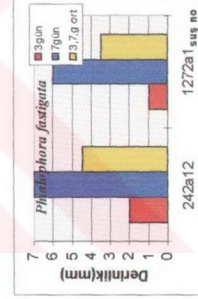
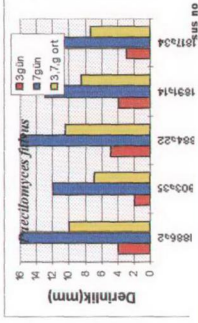
Şekil:4.2/h *Epicoccum purpurascens* Türüne Ait Süşlar



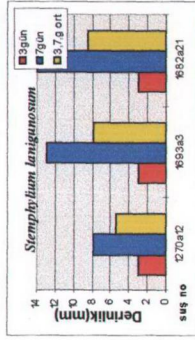
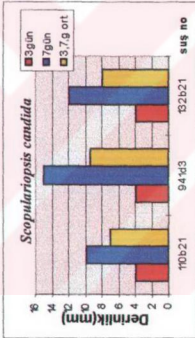
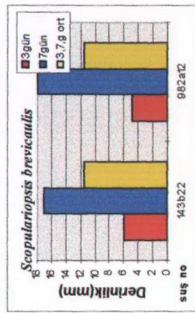
Şekil:4.2/i *Mucor hiemalis* Türüne Ait Süşlar



Şekil:4.2/j *Mucor racemosus* Türüne Ait Süşlar



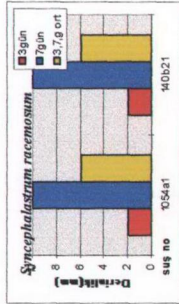
Şekil:4.2 (Devam)



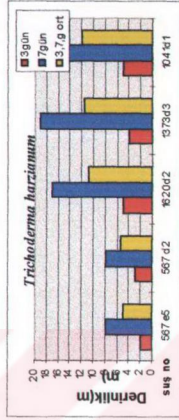
Şekil:4.2/a Scopulariopsis brevicaulis Türüne Ait Suşlar

Şekil:4.2/b S.candida Türüne Ait Suşlar

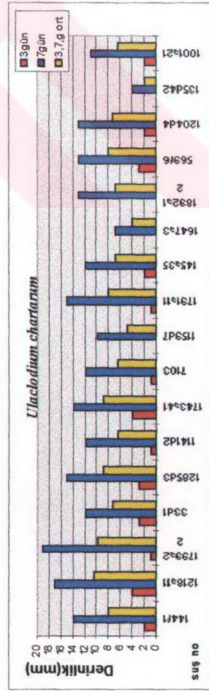
Şekil:4.2/r Stenphylium lanuginosum Türüne Ait Suşlar



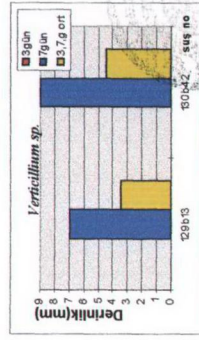
Şekil:4.2/s Syncephalastrum racemosum Türüne Ait Suşlar



Şekil:4.2/t Trichoderma harzianum Türüne Ait Suşlar



Şekil:4.2/u Ulocladum chararum Türüne Ait Suşlar



Şekil:4.2/v Verticillium sp. Türüne Ait Suşlar

Cladosporium macrocarpum türüne ait mevcut 8 izolat amilaz enzimi üretme yetenekleri bakımından incelendiğinde 1204d3 suş nolu izolatının pozitif sonuç verdiği; bunun dışındaki tüm suşların negatif olduğu görülmüştür (Çizelge:4.1, 4.2). Çizelge:4.3'e göre proteaz enzimi üretme yetenekleri incelendiğinde ise; 4 suşun negatif, 4 suşun da pozitif olduğu görülmüştür. (Şekil 4.2/d). Aynı türe ait suşlarda enzim üretimi bakımından bu oranda bir farklılığın olması, farklı genetik özelliklerinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre; *Cladosporium resinae* türünde mevcut 8 küf suşunun amilaz enzimi üretme yeteneği; yalnızca 944d1 ve 1746a23 suşlarında pozitif, diğer suşlarda negatif olarak tesbit edilmiştir. Proteaz enzimi üretme yeteneklerinde ise; mevcut izolatların tümünde pozitif değerleri verdiği görülmüştür (Şekil 4.2/f).

Çizelge:4.1 ve 4.2'deki bulgulara göre; *Cladosporium sphaerospermum* türüne ait 45 izolatın amilaz enzimi üretme yetenekleri bakımından incelendiğinde; tüm suşların negatif özellikte olduğu belirlenmiştir. Proteaz enzimi üretim yeteneği açısından bu türde; 1009a3, 1813a22, 92c26, 1770a31, 1135a32, 1287a32 ve 1225a12 no'lu suşların negatif, diğerlerinin pozitif oldukları saptanmıştır (Şekil 4.2/e).

Hankin and Anagnostakis (1975) yaptıkları çalışmada, *Cladosporium* türlerinde amilaz üretimini negatif ve proteaz üretimini pozitif olarak tesbit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise; *Cladosporium* grubuna ait kültürlerde kısmen değişken durumlar olmasına rağmen, benzer sonuçlar elde edildiği de görülmüştür. Bu cinse ait mevcut beş türü kendi arasında değerlendirdiğimizde ise; *Cladosporium resinae* grubu proteaz enzimi üretim yeteneği açısından en verimli tür olarak gösterilebilir. Amilaz enzimi üretim yeteneği açısından ise; mevcut beş türün de çok verimsiz oldukları gözlenmiştir.

Curvularia geniculata türünde mevcut 4 izolatın tümünün amilaz enzimi üretme kabiliyeti açısından negatif, proteaz enzimi üretme açısından da pozitif değerler verdiği ve özellikle üç suşun da oldukça yüksek verimlilikte olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2/g).

Epicoccum purpurascens'te mevcut 3 suşun amilaz enzimini üretme yeteneği negatif, proteaz enzimi üretme yeteneği ise, 1682a4 nolu suşunda pozitif, diğer ikisinde ise negatif olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2/h).

Üç izolatu bulunan *Mucor hiemalis*' te amilaz üretme yeteneği; 88e3 nolu suşunda negatif, diğer iki suşta pozitif olarak bulunmuştur. Proteaz üretme yeteneği ise; 88e3 nolu suşunda pozitif, diğerlerinde negatiftir (Şekil 4.2/i).

Mucor racemosus grubunda mevcut 28 suş amilaz enzimi üretme yetenekleri bakımından değerlendirildiğinde; 7 izolatın negatif sonuç verdiği (231, 2941, 2464, 2257, 1793, 3472, 7121 nolu suşlar) diğer izolatların ise; pozitif olduğu saptanmıştır. Proteaz enzimi üretme yetenekleri değerlendirildiğinde ise; mevcut tüm *M.racemosus* suşlarının negatif (derinlik<4mm) olduğu görülmüştür (Şekil:4.2/j).

Hankin and Antagonistakis (1975) yaptıkları benzer çalışmada *Mucor* türlerine ait kültürlerin proteaz enzimi üretme yeteneklerinin pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Yine başka bir kaynakta da *Mucor spp*'nin proteaz üretimi bakımından pozitif olduğu bildirilmiştir (Topal, 1985). Aynı zamanda her iki kaynakta olduğu gibi pek çok çalışmada da, *Mucor* proteazlarının, asit proteazlar grubundan olduğu ve pH 3-3.5 arasında aktivite gösterdiği belirtilmektedir. *Mucor hiemalis*'ten elde edilen bir asit proteazın optimum pH'sı 3-3.5 olarak rapor edilmiştir. Ayrıca enzimin miselyuma gevşek bağlarla bağlanmış olduğu ve 0.5M NaCl ile bu bağların ayrılabilceği de ifade edilmiştir (Matsubara and Feder, 1971).

Çalışmamızda *Mucor racemosus*'a ait suşların tümünde proteaz aktivitesinin negatif olarak belirlenmesi, kullanılan besi ortamının ve ya inkübasyon sıcaklığının asit proteaz üretimini belirlemeye uygun olmayabileceğini düşündürmektedir.

Paecilomyces fulvus türünden 5 suşun amilaz enzimi üretme yetenekleri, 1886a2 ve 1817a34 izolatlarında pozitif, diğerlerinde negatif olarak bulunmuştur. Proteaz enzimi üretme yetenekleri ise; tümünde pozitif olarak belirlenmiştir (Şekil:4.2/k). Ancak *Paecilomyces fulvus*'ta amilazı negatif olarak bildirilen 3 suştan 2 tanesinin durumunun aslında şüpheli değerlendirilebilen özellikte olduğu dikkat çekicidir.

Vihinen and Mantsala (1989), *Paecilomyces sp*'e ait α -amilazın, büyüme sıcaklığının 30°C, optimum pH'nın 4.0 ve optimum sıcaklığının da 45°C olduğun koşullarda üretilebildiğini bildirmişlerdir.

Çizelge:4.1., 4.2. ve 4.3.'e göre; *Paecilomyces variotii* cinsine ait 3 farklı suş amilaz enzimi üretme yeteneği bakımından incelendiğinde, tümünün pozitif olduğu; proteaz enzimleri açısından da hepsinin negatif olduğu belirlenmiştir. *Paecilomyces variotii*'nin, çeşitli kaynaklarda asit proteaz ürettiği ayrıca; bu küften asit proteazın, Sawada tarafından 1964 yılında kristal formda elde edildiği Vihinen and Mantsala tarafından bildirilmiştir. Enzimin pH 3-6 arasında ve 40°C'de stabil olduğu da bildirilmiştir. Ayrıca yapılan farklı bir çalışmada; *Paecilomyces sp*'nin amilaz enzimi üretimi için büyüme sıcaklığı 30°C, optimum pH 4.0, optimum büyüme sıcaklığı 45°C, pH stabilitesinin 4.0-9.0 olduğu da aynı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir.

Phialophora fastigiata türüne ait iki suşun, amilaz enzimi üretimi bakımından negatif, proteaz enzimi üretimi bakımından ise pozitif olduğu gözlenmiştir (Şekil: 4.2/l).

Phoma glomerata türüne ait 5 izolattan 1741a23 nolu suş amilaz enzimi üretme yeteneği bakımından pozitif olarak değerlendirilmiş, diğerlerinde negatif sonuç saptanmıştır. Proteaz enzimi açısından ise, 1022a11 nolu suşun pozitif, diğerlerinin negatif olduğu belirlenmiştir (Şekil: 4.2/m).

Scopulariopsis brevicaulis türüne ait iki suşun amilaz enzimi üretme yeteneği 982a12 nolu suşunda pozitif, 143b22 nolu suşunda ise negatif olarak belirlenmiştir. Proteaz enzimi üretme yeteneği dikkate alındığında ise; her iki suşun da pozitif karakterde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2/n).

Scopulariopsis candida türüne ait 3 suşun amilaz enzimi üretme yetenekleri incelendiğinde; 110b21 nolu suşunun pozitif, diğerlerinin negatif olduğu saptanmıştır. Proteaz enzimi üretim yeteneği dikkate alındığında ise; her üçüde pozitif değerler vermiştir (Şekil: 4.2/p). Miyake ve ark., *Scopulariopsis brevicaulis*'in proteaz enzimi ürettiğini bildirmişlerdir. Ancak bu enzim sınıflandırılamamıştır (Davies,1963).

Stemphylium lanigunosum türüne ait 3 suşun amilaz ve proteaz enzimleri üretme yetenekleri tümünde pozitif olarak belirlenmiştir (Şekil: 4.2/r).

Syncephalastrum racemosum türünün iki suşu amilaz enzimi üretme yeteneğinin, her ikisinde de negatif, proteaz enzimi üretme yeteneğinin ise; her ikisinin de pozitif karakterde olduğu görülmüştür (Şekil: 4.2/s).

Trichoderma harzianum'a ait 5 suşun amilaz ve proteaz enzimlerini üretme yeteneklerinin pozitif olduğu belirlenmiştir (Şekil: 4.2/t).

Hankin and Anagnostakis (1975) yaptıkları çalışmada *Trichoderma viride* için üretim yeteneğinin proteaz negatif, amilaz pozitif olarak belirlemişlerdir. Çalışmamız ise; *Trichoderma harzianum* ve *T.viride* türlerinin hem amilaz hem de proteaz üretme yetenekleri pozitif olarak tesbit edilmiştir. Shaer (1981) ise; *T.viride*'yi proteazlar için bir ticari üretim kaynağı olarak göstermiştir. Yine aynı kaynakta, *T.viride*'nin ortama chloramphenicol, polymyxin veya neomycin antibiyotikleri ilave edilerek proteaz üretiminin yükseltilebildiği bildirilmiştir.

Trichoderma viride'de amilaz enzimi üretimi için gelişme sıcaklığı 29°C, optimum pH 5.0-5.5 olarak bildirilmiştir (Vihinen and Mantsala, 1989).

Ulaclodium chartarum türüne ait mevcut 17 suşun amilaz enzimi üretme yetenekleri 7103 nolu suşunda pozitif, diğer tüm suşlarda negatif olarak bulunmuştur. Proteaz enzimi üretme yeteneği bakımından incelendiğinde ise; 135d42 nolu suş dışında tümünün pozitif olduğu belirlenmiştir (Şekil:4.2/u).

Verticillium cinsine ait mevcut iki suşun amilaz enzimi üretme yeteneği açısından 129b13 nolu suşun pozitif, diğerinin ise; negatif olduğu tesbit edilmiş, proteaz enzimi üretme yeteneği açısından her iki suşun da pozitif olduğu görülmüştür (Şekil:4.2/v).

Çalışmamızda *Verticillium* cinsine ait türlerin, amilaz üretiminde negatif karakterli olan suşun üretme yeteneği (+/-) durumunda iken; sınırın altında olduğu için

negatif olarak değerlendirilmiştir. Davies (1963)'e göre; *Verticillium coccorum*'un amilaz üretimi açısından maksimum aktivitesini pH 5.9-6.1 aralığında gösterebildiği belirtilmiştir.

Yapılan bir çalışmada; *Cladosporium resinae*, *Monascus kaoliang*, *Mucor rouxianus*, *Paecilomyces variotii* ve *Trichoderma viride*'nin amilaz enzimi olarak glukaoamilaz ürettiklerine dair bilgi verilmektedir (Vihinen and Mantsala ,1989). Yine aynı araştırmacılara göre; pH aralığının enzimin aktifliğinde önemli olduğu belirtilmiştir. Proteaz enziminin optimal aktivitesi için pH aralığı 4-5 olarak bildirilmiştir. Pepsin ya da Tripsin gibi asit proteazların aktivitesi için ise; optimal pH'ın 2.5-3 civarında olması gerektiği de ilave edilmiştir (Davies,1963). Çalışmamızda bazı türlerde, literatürlerden elde edilen bilgilerin aksine proteaz enziminin negatif olarak bulunması yapılan çalışmanın kültürün enzimi üretebilmesi için gerekli pH aralığında değişiklik yapılması gereğini düşündürmektedir. Özellikle asit proteazların birer kaynağı olarak gösterilen küf türlerinin çalışmamızda proteaz üreticisi olarak negatif olarak değerlendirilmiş olması, ilerki çalışmaların bu yönlü devam ettirilmesinin yararlı olabileceğini işaret etmektedir.

Fungal α -amilazların özellikleri, bakteriyel kökenlilerle benzerlikler taşımaktadır. Fungal α -amilazlar, bakteriyel olanlardan daha az termostabil olmakla birlikte daha geniş bir pH aralığına sahiptir. Bu nedenle *Aspergillus* enzimlerinin endüstriyel uygulamalarda uzun bir süredir kullanılmakta olduğu bildirilmektedir. *A.oryzae*'nin Taka-amilaz A enzimi en çok çalışılan enzimdir (Vihinen and Mantsala ,1989).

Topal (1982)'ın bildirdiği üzere; mikrobiyal yolla enzim üretimi, uygun suş seçimi ve mikroorganizmanın optimum gelişme şartları sağlanabildiği sürece, ekonomik bir üretim için en uygun yoldur. Hayvansal ve bitkisel enzim üretiminin kısıtlı olması ve mikrobiyal kaynaklı enzimlerin çok çeşitli olması da ayrı bir avantaj olarak gösterilmektedir. Bunlara ilave olarak, uygun suş ve ortamın doğru seçilmesi, uygun sıcaklık ve pH şartlarının sağlanabilmesi gibi temel faktörlerin de bulunması gerektiği bildirilmiştir.

Kocabiyik (1997)'a göre ise, bu tip endüstriyel öneme sahip enzimlerin doğal olarak çok az miktarlarda üretilmesi halinde ticari olarak üretimini pek mümkün kılmamaktadır. Bunu önlemek amacıyla, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak enzimlerin üretim düzeylerini arttırmak da mümkün olabilmektedir. Endüstriyel öneme sahip enzimlerin koleksiyonda korumaya alınmış küfler tarafından üretilme yeteneklerinin belirlenmesi daha sonraki çalışmalara bir ışık tutması açısından son derece faydalı ve avantajlı görülmektedir. Ayrıca yapılacak genetik mutasyonların, bir ön bilgi olarak küf kültürlerinin amilaz ve proteaz üretme yeteneklerini, kalitatif de olsa birbirleriyle karşılaştırmalı olarak belirlenebilmesi araştırmacılar için büyük avantajlar getireceği de esas alınmıştır.

Böylece elde edilen bilimsel verilerle hem zamandan tasarruf sağlanmış olacak, hem de söz konusu küflerin hangi enzimleri üretebildiklerine ilişkin dökümanlar oluşturularak ilerki çalışmalara ekonomik katkılar sağlayacaktır.

Genetik mutasyonlar kullanılarak yapılacak ilerki çalışmalarda mikroorganizmanın enzim üretme yeteneğinin artırılmasına yönelik bulgularla doğal olarak en verimli mikrobiyal kaynakların seçimi de birlikte yapıldığı takdirde teknolojiye önemli hizmetler sağlanacaktır. Çalışmamız da bu kapsamdaki kazanımlar için bir başlangıç niteliğindedir.

KAYNAKLAR

ATLAS,R.M.; "Industrial Use of Microbial Metabolism"; (in: Basic and Practical Microbiology); Ed: Atlas,R.M.; Chapter 8; 163-164; Universty of Louisuille; Macmillan Publishing Company; New York; 1984

BARBESGAARD,P.; "Industrial Enzymes Produced by Members of the Genus *Aspergillus*"; (in:Genetics of Physiology of *Aspergillus*); Ed's: Smith J.E., and Pateman J.A.; The British Mycological Society Symposium Series No:1; 391-404; Academic Press, London, 1977.

BATUM,M.; "Enzimlerin Tekstil, Deterjan ve Dericilik Sektöründeki Uygulamaları"; Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar; Lisans Üstü Yaz Okulu Ders Notları; XV. Bölüm; 293-300; TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Grubu; 1997

BECKHORN,E.J.; "Production of Microbial Enzymes"; (in: Microbial Technology); Ed: Peppler, H.J.; Chapter 15; 366-380; Universal Foods Corporation/ Wisconsin; 1967.

BLAIN,J.A.; "Industrial Enzyme Production"; (in:The Filamentous; Fungi Vol 1: Industrial Mycology); Ed's: Smith, J.E. and Berry, D.R.; Chapter 10; 193-211; Edward Arnold, London; 1975

BORRISS,R.; "Biology of Enzymes"; (in:Biotechnology); Ed's: Rehm,H.J. and Reed,G.; Vol 7a, Enzyme Technology; Vol Ed:Kennedy J.F.; Chapter 2; Verlag Chemie, Weinheim; 1987

BOTHAST,R.J. and SMİLEY,K.L.; “Metabolites of Fungi Used in Food Processing” (in: Food and Beverage Mycology); Ed: Beuchat,L.R.; Chapter 13; 368-396; Avi Publishing Company Inc.; 1978

CAMPENHOUT,L.V.; “Moutmicroflora: Kwantificeren, Isoleren en Karakteriseren Van Schimmels”; PhD Thesis; 62-63; Katholieke Universiteit Leuven; 1995.

COHEN,B.L.; “The Proteases of *Aspergilli*”; (in: Genetics and Physiology of *Aspergillus*); The British Mycological Society Symposium Series No:1; Ed:Smith, J.E. and Pateman, J.A.; 281-292; Academic Press, London; 1977

DAĞAŞAN,L.; “Enzimlerin Gıda ve Hayvan Yemi Üretimindeki Uygulamaları”; Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar; Lisans Üstü Yaz Okulu Ders Notları; XIV. Bölüm; 284-292; TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Grubu; 1997

DAVIES.R.; “Microbial Extracellular Enzymes, Their Uses and Some Factors Affecting Their Formation”; (in:Biochemistry of Industrial Micro-organisms); Ed's: Rainbow, C. and Rose, A.H.; Chapter: 4; Academic Press New York; 1963

DİNÇKAYA,E.; “Enzimolojiye Genel Bakış”; Enzimoloji; Lisansüstü Yaz Okulu ders notları; I.Bölüm; Ed: Azmi Telefoncu; Kuşadası-Aydın/Türkiye; Eylül 1997.

EMEK,D.; “Mutant *bacillus licheniformis* 'ten Alfa amilaz eldesi”;GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü; Yüksek Lisans Tezi; Gebze 1997

ERARSLAN,A.; “Enzimlerin Stabilizasyonu”; Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar; Lisans Üstü Yaz Okulu Ders Notları; VII. Bölüm; 186-228; TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Grubu; 1997

FROST,G.M. and MOSS,D.A.; “Production of Enzymes by Fermentation” (in: Biotechnology); Vol 7a Enzyme Technology; Vol Ed: Kennedy,J.F.; Chapter 3; 68-211; Ed’s: Rehm,H.J. and Reed,G.; Verlag Chemie, Weinheim; 1987

HANKIN,L. and ANAGNOSTAKIS,S.L.; “The Use of Solid Media For Detection of Enzyme Production by Fungi”; Mycologia; 67; 597-607; 1975.

KAZAN,D.; “Enzimlerin Sınıflandırılması ve Kimyası”; Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar; Lisans Üstü Yaz Okulu Ders Notları; II. Bölüm; 13-45; TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Grubu; 1997

KETCHUM,P.A.; “Food and Industrial Microbiology”; (in:Microbiology Concepts and Applications); Chapter:29; 713-714; 1988.

KOCABIYIK,S.; “Endüstriyel Enzimlerin Gen Teknolojisi ile Üretimi”; Enzimoloji; Lisansüstü Yaz Okulu Ders Notları; 8.Bölüm; 177-192; Ed: Azmi Telefoncu; Kuşadası-Aydın-Türkiye; Eylül 1997.

KRUGER,J.E.; MACGREGOR,A.W. and MARCHYLO,B.A.; “Endogenous Cereal Enzymes”; (in: Food Enzymology); Vol:2; Chapter17; 1-46; Ed: Fox, P.F.; Elsevier, London; 1991

LÖFFLER,A.; “Proteolytic Enzymes: Sources and Applications”; Food Technology; 40(1); 63-70; 1986.

MATSUBARA,H. and FEDER,J.; “Other Bacterial, Mold, and Yeast Proteases”; (in: The Enzymes); Ed: Boyer, P.D.; Vol 5.; 3rd ed.; Chapter:20; 721-795; Academic Press /New York; 1971.

NOORDERVLIET,P.F. and TOET,D.A.; “Safety in Enzyme Technology”; (in:Biotechnology); Volume 7a Enzyme Technology; Vol Ed: Kennedy, J.F.;

Chapter 14; 712-741; Ed's: Rehm, H.J. and Reed, G.; Verlag Chemie, Weinheim; 1987

PAMİR, M.H.; "Teknikte Kullanılan Mikroorganizmalarda Bulunan Enzimler"; Fermantasyon Mikrobiyolojisi; Ankara Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları No:936; Ders Kitabı:267; 7.Bölüm; 192-245; Ankara Ü. Basımevi-Ankara; 1985

PATERSON, R.R.M. and BRIDGE, P.D.; Biochemical Techniques for Filamentous Fungi; International Mycological Institute Technical Handbooks No:1; CAB International; Wallingford, Oxon; 1994

PEPPLER, H.J. and REED, G.; "Enzymes Food and Feed Processing"; (in: Biotechnology); Volume 7a Enzyme Technology; Chapter 11; 549-603; Ed's: Rehm, H.J. and Reed, G.; Weinheim, Verlag Chemie; 1987

REED, G. and UNDERKOFER, L.A.; "Proteolytic Enzymes"; (in: Enzymes and Food Processing); Chapter:7; 109-123; Academic Press; New York; 1966.

SHEAR, C.L.; "Industrial Uses of Fungi"; (in: Smith's Introduction to Industrial Mycology); 7th Ed.; Chapter 15; 347-361; Edward Arnold Publ.Ltd., London; 1981.

TAGAKI, T.; TODA, H. and ISEMURA, T.; "Bacterial and Mold Amylases"; (in: The Enzymes); Volume 5.; 3rd ed.; Ed: Boyer, P.D.; Chapter:8; 235-271; Academic Press New York; 1971.

TELEFONCU, A.; "Enzimlerin Endüstriyel Uygulamaları"; Enzimoloji; Lisansüstü Yaz Okulu Ders Notları; 10.Bölüm; 249-306; Ed: Telefoncu, A.; Kuşadası-Aydın-Türkiye; 1997a.

TELEFONCU, A.; "Tedavi ve İlaç Tasarımında Enzimler"; Enzimoloji; Lisansüstü Yaz Okulu Ders Notları; 12.Bölüm; 353-386; Ed: Telefoncu, A.; Kuşadası-Aydın/Türkiye; 1997b.

TOPAL,Ş.; “Mikrobiyolojik yolla Renin Üretimi”; TÜBİTAK-MAM Beslenme ve Gıda Teknolojisi Bölümü; yayın No:63; 5-11; Gebze-Kocaeli; 1982.

TOPAL,Ş.; “Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin’in Yeri”; Gıda; 10(1); 25-37; 1985.

TOPAL,Ş.; Türkiye’nin Tarımsal Mikoflorasını Oluşturan Küflerin Endüstriyel Öneme Sahip Metabolik Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Küf Koleksiyonu Merkezi Kurulması; TÜBİTAK-MAM Gıda Bilimi ve Teknolojisi Araştırma Enstitüsü; Proje Sonuç Raporu; Rapor No: 14.1.008; Gebze-Kocaeli; 1998.

UNDERKOFER, L.A.; “Microbial Enzymes”; (in:Industrial Microbiology); Ed’s: Miller, B.M. and Litsky, W.; Chapter: 7; 128-137; Mc Graw-Hill, Book Company; USA; 1976

VALJAKKA, T.T.; PONTE, J.G. and KULP, K.; “Studies on a Raw-Starch Digesting Enzyme. I. Comparison to Fungal and Bacterial and an Emulsifier in White Pan Bread”; Cereal Chemistry; 71(2); 139-144; 1994.

VIHINEN, M. and MANTSALA, P.; “Microbial Amylolytic Enzymes”; Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology; 24(4); 1989.

WHITAKER, J.R.; “The Glycoside Hydrolases”; (in:Principles of Enzymology for the Food Sciences); Chapter 15; 443-450; Marcel Dekker Inc., New York 1972a.

WHITAKER, J.R.; “The Proteolytic Enzymes”; (in:Principles of Enzymology for the Food Sciences); Chapter 19; 515-543; Marcel Dekker Inc., New York; 1972b.

ZEMAN, N.W. and McCREA, J.M.; “Alpha-Amylase Production Using a Recombinant DNA Organism”; Cereal Foods World; 30(1); 777-780; 1985.

ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında İstanbul'da doğdu. 1994 yılında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 1995 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Yüksek Lisans Öğrenimine Başladı. 1996 yılından bu yana aynı okulda Araştırma Görevlisi olarak çalışmalarını sürdürmektedir.



**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**