

Türkiye'nin Tarımsal Mikoflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz

Şeminur TOPAL, Ceyda PEMBEÇİ, Melika BORCAKLI
TÜBİTAK-MAM Gıda Bilimi ve Teknolojisi Araştırma Enstitüsü.
PK:21, 41470. Gebze, Kocaeli-TÜRKİYE

Mehmet BATUM
ORBA Biokimya San. ve Tic. A.Ş. Orhanlı Köyü, Tuzla, İstanbul-TÜRKİYE

Özlem ÇELTİK
GYTE Biyoloji Anabilim Dalı, Çayırova, Gebze, Kocaeli-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 16.02.1998

Özet: Çalışmalarımızda Türkiye'nin tarımsal mikoflorasını yansıtan, kültür koleksiyonumuz küflerinin, primer metabolitlerinden bazı enzim üretim yetenekleri belirlenerek endüstri açısından da önemlerinin ortaya konulmasına çalışılmıştır. Özgün ekolojik mikofloramızı yansıtan bu küflerin proteaz, amilaz, lipaz, ksilanaz, β -glukanaz, selüloz, pektinaz enzimlerini üretebilme yeteneği açısından yapılacak kalitatif tarama çalışması ile potansiyellerin belirlenerek, ileride endüstriyel üretime veya değişik birçok bilimsel araştırma çalışmalarına baz oluşturması amaçlanmıştır. Bu çerçevede lipaz ve proteaz üretim yeteneğinin incelenmesinde "Derin Kültürle Opasite Kapasitesi", amilazda ise "Difüzyon Tekniği ile Zon Kontrolü" kullanılmıştır. Toplam 1558 küf kültüründe amilaz, proteaz ve lipaz taraması yapılmıştır. Buna göre pozitif sonuç verenler: amilaz için 645 (%41), proteaz için 1078 (%69) ve lipaz için 591 (%46)'dir. Diğer enzim tarama çalışmaları halen devam etmektedir ve bulguları ayrı bir makalede özetlenecektir. Hazırlanacak özel bir katalogta küf gruplarına göre, bu bulgulara ilişkin sistematik değerlendirmelere de ayrıntılı olarak yer verilecektir.

Anahtar Sözcükler: Mikoflora, küfler, primer metabolitler, enzimler, proteaz, amilaz, lipaz.

Investigation of Selected Industrially Important Enzymatic Activities of Turkish Agricultural Mycoflora-I: Amylase, Lipase, Protease

Abstract: In this context, fungi being a rich source in from metabolites point of view, their utilization possibilities in various area are investigated. Primary metabolites of the fungi representing Turkish agricultural mycoflora which belongs to our culture collections are determined and their importance with respect to industry will be evaluated. It is assumed that enzymes such as, protease, amylase, lipase, cellulase, xylanase, β -glucanase, pectinase of these moulds represent a potential source for food industry. In this context, qualitative screening three of these enzymes producing abilities of relevant moulds are carried out. Methods used for enzyme determination cover, "Opacity Capacities in Deep Culture Technique" for lipase and protease, "Clear Zone in Diffusion Technique" for amylase enzymes. Totally 1558 moulds were analyzed for amylase, protease, and lipase activity. According to results; 69% (totaly 1078), 41% (totaly 645), 40% (totaly 618) of our moulds were determined in positive

character for protease, amylase, and lipase producing potentials respectively. Others are being still going on and will be publishing in another manuscript. Results as determined systematically will be given in a special catalog.

Key Words: Mycoflora, moulds, primer metabolites, enzymes, protease, amylase, lipase.

Giriş

Günümüzde azalan doğal kaynaklar nedeniyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için potansiyel olarak görülmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Küfler de, bu mikroorganizma grupları arasında önemli bir yere sahiptir. Küfler; primer metabolitlerinden olan enzimleri ile endüstriyel açıdan önemli bir kaynak olabilmektedirler ve kontrollü koşullar yaratıldığında üretim daha da teşvik edilebilmektedir. Endüstriyel üretimde mikrobiyal kaynaklı enzimlerin ekonomik oluşları, mevsimsel ve potansiyel kısıtlamalara bağlı kalmayışları açısından avantajları uzun zamandır savunulmaktadır.

Filamentli küfler, saprofit veya patojen türleriyle önemli zararlara neden olabilmeleri yanında geri kazanımlı ekosistemde çok etkin rollere de sahiptirler. Primer metabolizma ürünleri hem anabolik, hem de katabolik biyokimyasal reaksiyonları kapsamaktadır. Burada; DNA, proteinler v.b. makromoleküller temel olup, ara ürünler ve enerji sentezi birarada gerçekleşmektedir. Sekonder metabolitlerin üretim mekanizması ile bir tek kimyasal yapı grubu sentezlenemez, bu bakımdan herbiri farklı bir metabolik döngünün ürünüdür. Sekonder metabolitler bazı mikrobiyal gruplar, türler ve hatta suşlar ile sınırlı iken; primer metabolizma ürünleri aerop, anaerop, fototrof ve organotrof olma durumları ile etkilenmekle beraber, daha genel ve temel ortak özellikler gösterebilmektedirler (1).

Dünya genelinde mevcut endüstriyel enzim pazarı, 1.4 milyar USD dolayında tutarla egemen iken, yılda %10'un üzerinde pazar açığı artışı ve %4-5 dolayında satış artışı ile en yaygın tüketim alanlarından. Gıda, deterjan ve nişasta endüstrileri, endüstriyel enzim üretiminin %75'ini kullanmaktadır ve proteaz, amilaz, lipaz, selülaz, pektinaz gibi hidrolazlar, en yaygın kullanılan enzim gruplarından. Endüstriyel gelişmenin göstergesi olarak da bu enzimlerin %60'ı rekombinant ürünleridir. Bu da endüstriyel uygulamaların önemi açısından vurgulanmaktadır. Bu alanda her gün yeni potansiyel kaynaklar aranmakta ve gündeme gelmektedir (2).

Küflerin enzim üretim yetenekleri önemli endüstriyel avantajlar sağlamaktadır. Enzim kullanımı açısından gıda endüstrisi, tek başına %50'lik bir paya sahiptir. Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan enzimlerden proteaz; unlu ürünlerde (ekmekçilikte), geleneksel fermente ürünlerde, biranın soğukta olgunlaştırılmasında, peynir endüstrisinde koagülasyon amacıyla, et olgunlaştırmada, balık proteininin çözünürlüğünün arttırılmasında, klinikte (sindirim kolaylaştırıcı olarak, tanıda, v.b.) ve biyokimyada (hücrel materyal saflaştırılmasında, peptid analiz ve sentezinde v.b.) ve biyokimyada (hücrel materyal saflaştırılmasında, peptid analiz ve sentezinde v.b.) (3), amilaz; biracılıkta ve damıtık içki üretiminde, tahıl ürünleri ve çikolata işleme teknolojisinde, lipaz; süt teknolojisinde olmak üzere yaygın olarak kullanımda olup

özellikle mikrobiyal kökenli üretimleri de artmıştır (4). Fungal α -amilazların unlu ürünler endüstrisinde kullanımı yaygın olup, *Aspergillus oryzae*'nin kontrollü fermentasyonu ile üretilmektedir. Yine *A. oryzae* proteaz üreticisi olarak da bildirilmektedir (5). Bu enzimlerden proteaz, lipaz, pektinaz, selülaz, amilaz ve izomeraz; gıdaların özellikle tekstür, görünüş, aroma durumlarını etkilemekte ve işlenmiş ürünlerin besleyici değerleri gibi pek çok özelliklerini de yönlendirmede önem taşımaktadır (6, 7).

Bu çerçevede primer veya sekonder metabolitler açısından mevcut kültürlerimiz değerlendirilmiş ve potansiyel substrat olarak kullanımı yönünde taranmıştır. Esasen kültür koleksiyonlarının temel işlevi, hem mikroorganizmalar açısından uygun bir "stoklama ünitesi" (8, 9, 10) hem de ileriye yönelik pekçok eğitim ve araştırma çalışmaları ile, endüstriyel üretime baz olabilecek "kaynak depolama" dır (20). Çalışmamızda öncelikle mevcut küf kültürlerinin endüstriyel yönden de en önemli yedi enzim (proteaz, amilaz, lipaz, selülaz, ksilanaz, β -glukanaz, pektinaz) açısından taranması, profilin belirlenmesinde başlangıç evresini oluşturmuştur. Bulgularımızın ilk üç enzim açısından taranmasına yönelik olan sonuçlar bu çalışmada özetlenmiştir. Diğer enzim grupları ile ilgili bulgular ayrıca yayınlanacaktır. Çalışmamızla, ileride yapılacak olan pekçok bilimsel ve endüstriyel çalışma için temel teşkil edebilecek verilerin eldesi hedeflenmiştir. Ayrıca bu verilerle özgün mikofloramızın endüstri açısından önemlerinin ortaya konulmasına çalışılmıştır.

Materyal ve Metod

Materyal

Primer metabolitlerinden enzimlerin üretim potansiyelleri açısından, incelenmesi amacıyla TÜBİTAK MAM Gıda Bilimi ve Teknolojileri Araştırma Enstitüsü'nde bulunan genellikle Türkiye'nin tarımsal mikoflorasından oluşturulmuş küf koleksiyonundaki (8, 9, 10) 1558 adet saf küf kültürü taramaya alınmıştır.

Metod

Enzimatik aktivitelerin Belirlenmesi

Kolleksiyonumuzdaki küf kültürleri, primer metabolizma ürünleri olarak, özellikle hidrolitik karakterli bazı enzim üretim potansiyelleri açısından taranmıştır.

Proteaz üretme yeteneklerinin incelenmesi:

Kültürlerin proteolitik aktivitelerinin belirlenebilmesi için özgün bir besiyeri kullanılmıştır. Bunun için %0.1 K_2HPO_4 , %0.05 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, %0.05 KCl, %1.6 agar musluk suyu içinde çözüldürülüp, $121^\circ C$ de 1.5 atm basınç altında 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. $60^\circ C$ 'ye kadar soğuduktan sonra üzerine son konsantrasyonu %4.8 olacak şekilde destile su (dH_2O) ile hazırlanmış ve aynı şartlarda sterilize edilmiş yağsız süttezu çözeltisi aseptik olarak ilave edilmiştir. Bu karışım steril test tüplerine 15'er ml olarak dağıtılıp, dik olarak dondurulmuştur (1).

Kültürün enzim üretim yeteneğini test edebilmek için bu besiyerinin üzerine spor süspansiyonu hazırlanarak eklenmiştir. Spor süspansiyonu; PDA besiyerinde 3 nokta ekimiyle inoküle edilip, geliştirilen saf kültürlerden 1cm çapındaki agar delici ile 2 adet agarlı blok kesilip, 5ml'lik steril destile su içine atılmış ve aseptik koşullarda homojenize edilerek hazırlanmıştır (11).

Hazırlanan besiyerinin üzerine her bir kültür için 0.1 ml spor süspansiyonu inoküle edilerek, 26°C'de 7 güne kadar gelişmeye bırakılmıştır. Test kültürü proteaz enzimi üretebiliyorsa (test pozitif ise), besiyerinde bulunan ve bulanıklığı sağlanan süt kazeinini parçalayarak berraklık meydana getirmektedir. Test negatif ise, kültür kazeini parçalayamadığı için besiyeri bulanıklığını korumaktadır (Şekil 1). Testin değerlendirilmesi; oluşan şeffaflığın derinliğini cetvel yardımı ile ölçmek suretiyle yapılmıştır. Bu ölçümler 3. günden itibaren başlanarak 7. güne kadar sürdürülmüş, değerlendirmede bu iki bulgunun ortalamaları esas alınmıştır (1, 12).

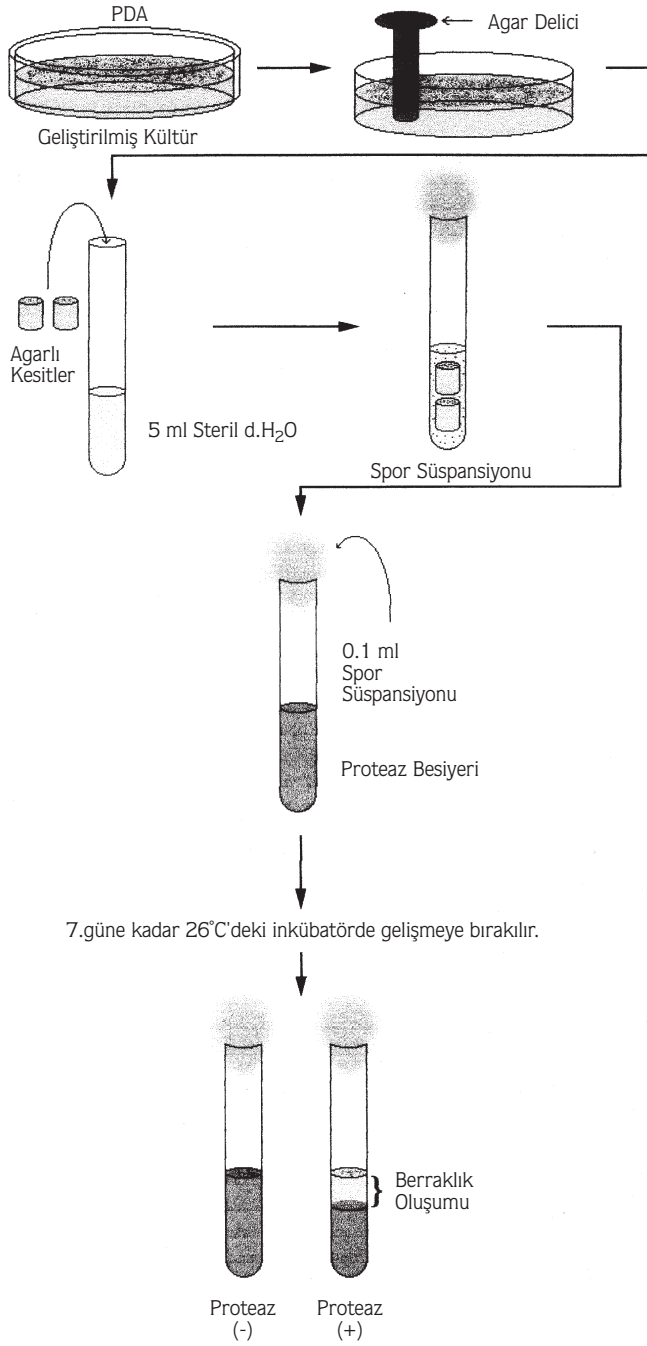
Amilaz üretme yeteneklerinin incelenmesi:

Kültürlerin amilolitik aktivitelerinin belirlenebilmesi için kullanılan özgün amilaz besiyeri; %2 agar, %0.15 bile salt (safra tuzu), %1 çözünebilir nişasta, %0.67'lik yeast nitrogen base (YNB)'den oluşmaktadır. Nişasta d.H₂O içinde kaynatılarak çözündürülmüş, üzerine agar ve safra tuzu eklenerek, 121°C'de 15 dak. otoklavda steril edilmiştir. 50-60°C'ye kadar soğutulduktan sonra, 10 ml filtre sterilizasyonu yapılmış, 10 katı konsantre YNB'den son konsantrasyon %0.67 olacak şekilde eklenip karıştırılmıştır. Petrilere aseptik koşullarda dökülüp katılaşmaya bırakılmıştır. Petride katılaştıran besiyerleri yine aseptik koşullarda steril bistüri veya öze yardımı ile birbirine paralel iki çizgi şeklinde dikey ve yatay olarak çizilmiştir. Bu çizgilerin birbirini kestikleri noktalara 10 µl spor süspansiyonu (yukarıda açıklandığı gibi hazırlanan) inoküle edilmiş ve 26-28°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası alınan petrilere üzerine %0.3'lük iyot püskürtülmüştür (1, 11). Değerlendirmede besiyeri içeriğinde bulunan nişasta ile iyodun reaksiyona girerek mavi renk oluşturması baz alınmıştır. Eğer enzim üretme yeteneği pozitif ise ortamdaki nişasta, enzim varlığında parçalanmış olduğundan kültürün ürettiği alanın etrafı bulanık beyaz renkte, diğer alan mavi renkte kalmaktadır. Eğer amilaz enzimi sentezlenmemişse petrinin tamamı mavi renkte görülmektedir (Şekil 2).

Lipaz üretme yeteneklerinin incelenmesi:

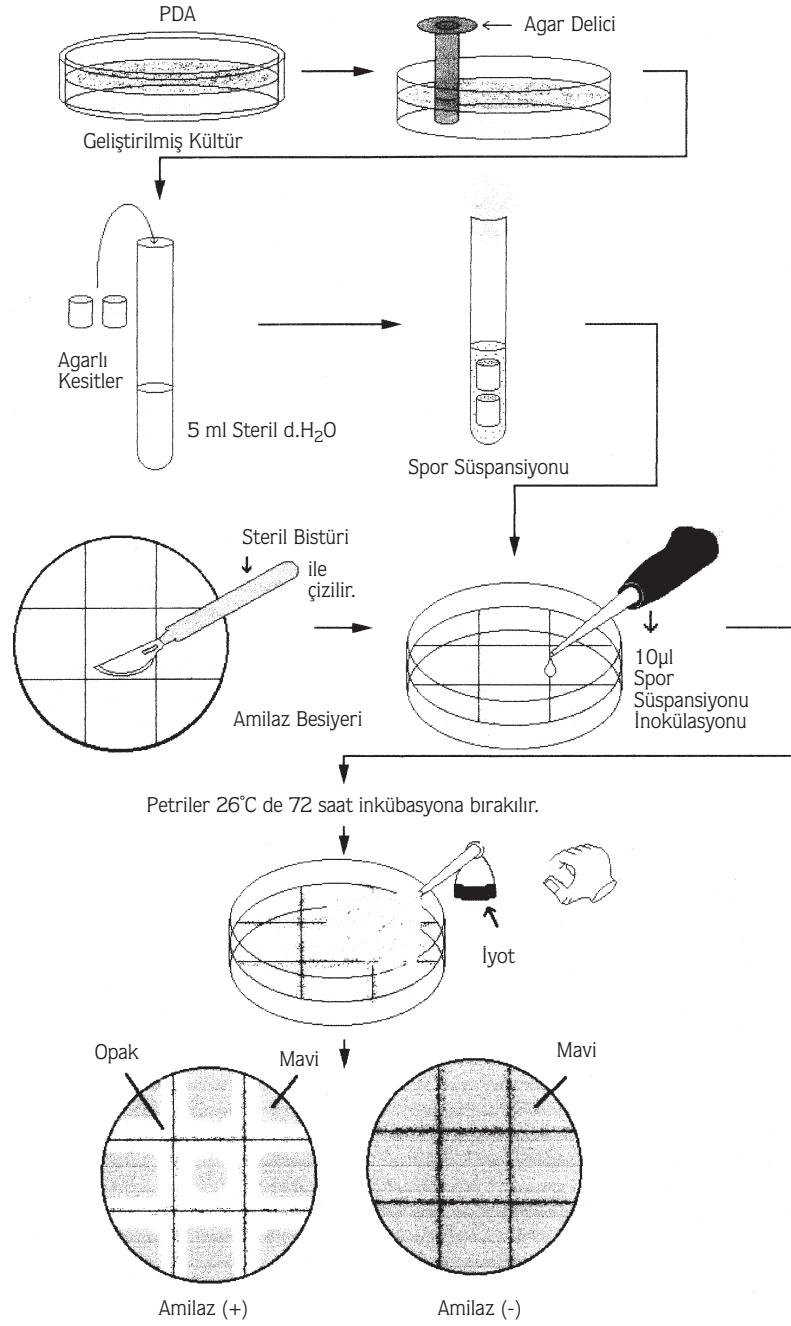
Kültürlerdeki lipolitik aktiviteyi test edebilmek için özgün lipaz besiyeri hazırlanmış; %1 agar, %0.5 pepton, %0.3 maya ekstraktı d.H₂O içinde çözündürülmüştür. 121°C'de 15 dak. otoklavda sterilizasyon yapılarak, 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra, daha önceden filtre sterilizasyonu yapılmış tributirin'den (Sigma) %0.1 oranında eklenmiştir. 8 dak. ultra-torax'da homojenize edilmiş, tüplere aseptik olarak 7 ml dağıtıp dik durumda katılaştırılmıştır.

Malt Agar (MA)'lı petride 30°C'de 7 gün geliştirilmiş test kültürlerinden steril mantar delici ile agarlı parçalar kesilip, hazırlanan besiyerinin üzerine bırakılmıştır. Tekrar 30°C'de 7 güne kadar inkübe edilerek, berraklık durumuna göre değerlendirilmiştir. Sonuçta lipaz (+) ise, besiyerinde bir berraklık meydana gelmekte, lipaz (-) ise besiyerinde hiçbir değişiklik olmamaktadır (Şekil 3). Lipolitik aktivitenin değerlendirilmesi için berraklığın derinliği 3. günden itibaren cetvelle ölçülmüş ve bu işlem 7.güne kadar sürdürülmüştür (1, 12).

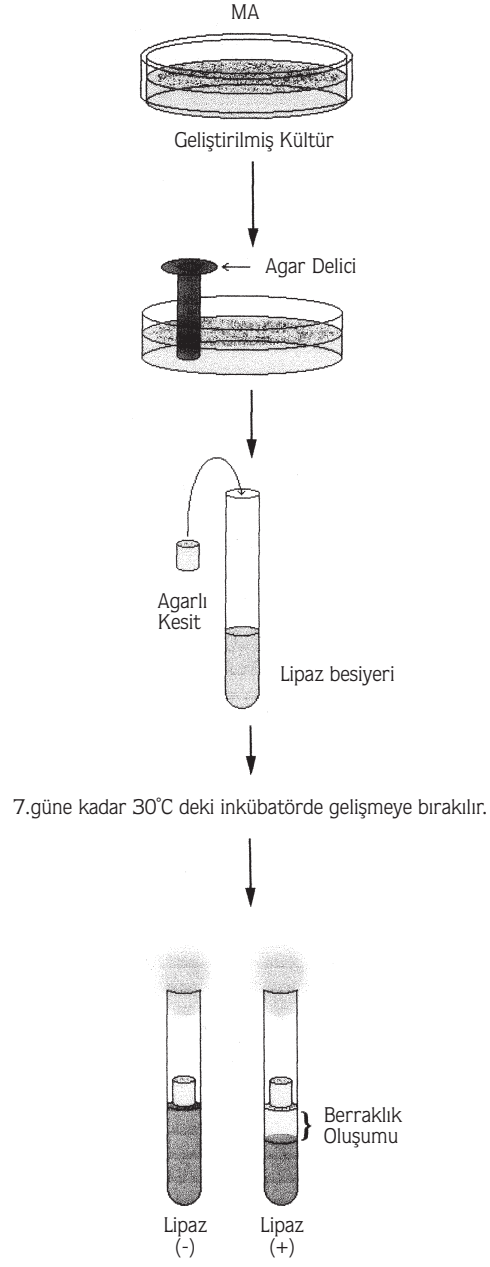


Şekil 1. Proteaz aktivitesinin analiz basamakları.

Türkiye'nin Tarımsal Mikoflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz



Şekil 2. Amilaz aktivitesinin analiz basamakları.



Şekil 3. Lipaz aktivitesinin analiz basamakları.

Bulgular ve Tartışma

Çalışmada proteaz, amilaz ve lipaz aktivitesi açısından 1558 adet kültür ayrı ayrı taranmıştır. Bu taramalar sonucunda, elde edilen sonuçlar değerlendirilerek Tablo 1,2'de verilmiştir.

Tablo 1. Bazı küf kültürlerinde saptanan proteolitik, amilolitik ve lipolitik aktivite sonuçları.

İncelenen Küfler	Adedi	Proteaz (mm)			*Genel Değerlendirme**		
		min	maks	ort***	Proteaz	Amilaz	Lipaz
<i>Acremonium butyri</i>	1	3	3	3	-	-	-
<i>Agrocybe aegerita</i>	2	16	16	16	2(+)	-	-
<i>Alternaria alternata</i>	20	2	17	12	19(+)	3(+)	-
<i>Aspergillus amstelodami</i>	3	0	11	6	1(+)	3(+)	-
<i>A. candidus</i>	12	9	16	12	12(+)	8(+)	10(+)
<i>A. chevalieri</i>	3	14	18	16	2(+)	2(+)	-
<i>A. clavatus</i>	11	18	21	19	11(+)	6(+)	2(+)
<i>A. flavus</i>	8	18	20	19	8(+)	-	8(+)
<i>A. fumigatus</i>	20	9	18	12	19(+)	19(+)	11(+)
<i>A. glaucus</i>	12	0	0	0	-	10(+)	1(+)
<i>A. nidulans</i>	30	5	15	12	26(+)	6(+)	22(+)
<i>A. niger</i>	29	9	30	20	24(+)	22(+)	1(+)
<i>A. niger (carbonarius)</i>	5	20	25	22	3(+)	2(+)	-
<i>A. niger (phoenicis)</i>	12	2	25	16	9(+)	6(+)	-
<i>A. oryzae</i>	6	18	19	19	6(+)	1(+)	6(+)
<i>A. parasiticus</i>	1	17	17	17	1(+)	1(+)	-
<i>A. repens</i>	1	11	11	11	1(+)	-	-
<i>A. sulfureus</i>	2	9	16	13	2(+)	1(+)	1(+)
<i>A. sydowii</i>	22	11	18	14	22(+)	-	16(+)
<i>A. tamari</i>	2	14	20	17	2(+)	2(+)	1(+)
<i>A. terreus</i>	9	9	15	12	4(+)	3(+)	1(+)
<i>A. ustus</i>	4	10	13	11	3(+)	-	3(+)

Tablo 1 (Devam)

<i>A. versicolor</i>	33	6	18	11	24(+)	7(+)	20(+)
<i>A. wentii</i>	2	12	12	12	-	1(+)	-
<i>Botrytis cinerea</i>	3	6	13	10	1(+)	1(+)	-
<i>Chatemium globosum</i>	1	0	0	0	-	-	-
<i>Chatemium sp.</i>	1	0	0	0	-	-	1(+)
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	7	9	16	10	7(+)	-	-
<i>Cladosporium herbarum</i>	24	4	17	10	23(+)	-	1(+)
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	10	2	19	8	6(+)	1(+)	-
<i>Cladosporium resinae</i>	8	7	18	14	8(+)	2(+)	-
<i>Cladosporium shaerospermum</i>	46	0	14	7	38(+)	1(+)	3(+)
<i>Chrysonilia sitophila</i>	1	16	16	16	1(+)	-	1(+)
<i>Culvularia geniculata</i>	4	7	18	15	4(+)	-	-
<i>Culvularia lunata</i>	1	0	0	0	-	-	-
<i>Curvularia orechestela</i>	1	20	20	20	1(+)	-	-
<i>Curvularia sp.</i>	1	15	15	15	1(+)	-	-
<i>Doratomyces microsporus</i>	1	15	15	15	1(+)	1(+)	-
<i>Epicoccum purpurascens</i>	4	3	4	4	-	-	-
<i>Fusarium decemcellulare</i>	2	13	17	15	2(+)	-	-
<i>F. equeseti</i>	5	10	13	12	4(+)	-	-
<i>F. moniliforme</i>	9	4	20	14	7(+)	-	-
<i>F. oxysporum</i>	5	1	15	9	3(+)	-	-
<i>F. semitectum</i>	1	10	10	10	1(+)	-	-
<i>F. solani</i>	5	11	18	14	5(+)	-	-
<i>F. sporotrichoides</i>	2	7	10	9	2(+)	-	-
<i>F. tabanicum</i>	1	12	12	12	1(+)	-	-
<i>F. tricintum</i>	2	15	15	15	1(+)	-	-
<i>F. poae</i>	1	10	10	10	1(+)	-	-
<i>Geothricum candidum</i>	2	12	13	13	2(+)	-	-
<i>Monascus ruber</i>	2	7	8	8	2(+)	1(+)	-
<i>Moniliella acetoabutens</i>	2	15	17	16	2(+)	-	-

Türkiye'nin Tarımsal Mikoflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz

Tablo 1 (Devam)

<i>Mucor hiemalis</i>	4	2	14	6	1(+)	2(+)	-
<i>Mucor miechei</i>	1	-	-	-	-	-	1(+)
<i>Mucor pusillus</i>	1	1	1	1	-	1(+)	1(+)
<i>Mucor racemosus</i>	30	0	9	2	1(+)	21(+)	-
<i>Penicillium anotalicum</i>	1	12	12	12	1(+)	-	-
<i>P. aurantiogriseum</i>	151	0	19	7	82(+)	110(+)	133(+)
<i>P. aureum</i>	1	9	9	9	1(+)	1(+)	1(+)
<i>P. bilali</i>	1	6	6	6	1(+)	1(+)	-
<i>P. brevicompactum</i>	42	2	19	13	36(+)	18(+)	38(+)
<i>P. camemberti</i>	3	10	11	11	1(+)	1(+)	-
<i>P. chrysogenum</i>	288	0	21	14	264(+)	47(+)	46(+)
<i>P. citrinum</i>	13	4	23	14	12(+)	1(+)	4(+)
<i>P. claviforme</i>	1	-	-	-	-	-	1(+)
<i>P. commune</i>	109	0	20	4	28(+)	72(+)	73(+)
<i>P. concentricum</i>	3	0	11	4	1(+)	3(+)	1(+)
<i>P. corylophilum</i>	43	10	22	18	43(+)	9(+)	16(+)
<i>P. crustosum</i>	1	13	13	13	1(+)	-	-
<i>P. cyaneum</i>	1	11	11	11	1(+)	1(+)	1(+)
<i>P. decumbens</i>	2	0	9	15	2(+)	1(+)	-
<i>P. digitatum</i>	2	6	6	6	-	1(+)	-
<i>P. echinulatum</i>	11	3	22	13	9(+)	11(+)	8(+)
<i>P. expansum</i>	45	0	23	5	15(+)	27(+)	37(+)
<i>P. frequentans</i>	10	2	17	10	6(+)	6(+)	1(+)
<i>P. funiculosum</i>	5	0	15	5	2(+)	5(+)	1(+)
<i>P. glabrum</i>	1	11	11	11	1(+)	-	-
<i>P. granulatum</i>	11	0	7	3	4(+)	8(+)	7(+)
<i>P. griseofulvum</i>	36	0	22	16	35(+)	5(+)	5(+)
<i>P. griseroseum</i>	3	3	7	5	2(+)	-	-
<i>P. hirsutum</i>	103	0	20	7	59(+)	76(+)	88(+)
<i>P. implicatum</i>	1	0	0	0	-	1(+)	-

Tablo 1 (Devam)

<i>P. italicum</i>	9	0	14	6	3(+)	6(+)	1(+)
<i>P. janthinellum</i>	1	8	8	8	1(+)	1(+)	1(+)
<i>P. jensenii</i>	1	13	13	13	1(+)	(-)	-
<i>P. liliaceum</i>	1	18	18	18	1(+)	1(+)	1(+)
<i>P. lividum</i>	15	12	16	14	14(+)	1(+)	-
<i>P. megasporum</i>	15	6	9	8	1(+)	2(+)	1(+)
<i>P. miczynskii</i>	4	0	10	5	2(+)	3(+)	-
<i>P. nalgiovense</i>	16	2	0	11	15(+)	4(+)	6(+)
<i>P. notatum</i>	1	6	6	6	1(+)	1(+)	1(+)
<i>P. ochraceum</i>	3	7	14	10	3(+)	2(+)	2(+)
<i>P. olsonii</i>	3	6	23	15	2(+)	2(+)	-
<i>P. oxacilum</i>	1	11	11	11	1(+)	1(+)	1(+)
<i>P. paraherquei</i>	6	2	18	12	5(+)	1(+)	-
<i>P. puberulum</i>	1	10	10	10	1(+)	(-)	1(+)
<i>P. roqueforti</i>	8	0	14	8	7(+)	3(+)	4(+)
<i>P. rubidurum</i>	1	14	14	14	1(+)	-	-
<i>P. rugulosum</i>	9	3	17	6	4(+)	8(+)	1(+)
<i>P. spinulosum</i>	2	0	15	8	1(+)	2(+)	1(+)
<i>P. steckii</i>	3	2	11	8	2(+)	2(+)	-
<i>P. sublateritium</i>	1	11	11	11	1(+)	1(+)	1(+)
<i>P. thomii</i>	4	14	17	16	3(+)	2(+)	1(+)
<i>P. variable</i>	4	4	14	5	2(+)	2(+)	1(+)
<i>P. verrucosum</i>	43	0	18	7	19(+)	29(+)	9(+)
<i>P. viridicatum</i>	7	3	12	8	4(+)	6(+)	4(+)
<i>P. waksmanii</i>	2	0	15	8	1(+)	2(+)	1(+)
<i>Paecilomyces fulvus</i>	5	12	16	14	5(+)	2(+)	-
<i>Paecilomyces variotti</i>	5	0	0	0	-	5(+)	-
<i>Papularia sp.</i>	1	0	0	0	-	-	-
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1	16	16	16	1(+)	-	1(+)
<i>Phialophora fastigata</i>	2	6	7	7	2(+)	-	-

Türkiye'nin Tarımsal Mikoflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz

Tablo 1 (Devam)

<i>Phoma glomerata</i>	5	0	7	3	1(+)	1(+)	-
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1	16	16	16	1(+)	-	-
<i>Pleurotus sp. florida</i>	1	16	16	16	1(+)	-	-
<i>Rhizomucor miechei</i>	2	-	-	-	-	-	2(+)
<i>Rhizopus oryzae</i>	1	8	8	8	1(+)	1(+)	-
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	3	17	18	18	2(+)	1(+)	-
<i>Scopulariopsis candida</i>	4	10	15	12	4(+)	2(+)	2(+)
<i>Scopulariopsis fusca</i>	1	6	6	6	-	-	-
<i>Sporendonema sp.</i>	1	8	8	8	1(+)	-	-
<i>Stemphyllum lanuginosum</i>	3	8	14	11	2(+)	3(+)	-
<i>Stropharia ferri</i>	1	18	18	18	1(+)	-	-
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	1	16	16	16	1(+)	-	-
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	3	10	10	10	2(+)	-	1(+)
<i>Trichoderma harzianum</i>	7	8	19	14	7(+)	7(+)	6(+)
<i>Trichoderma viride</i>	1	19	19	19	1(+)	1(+)	1(+)
<i>Ulacladium chartarum</i>	18	4	19	14	15(+)	1(+)	-
<i>Verticillium sp.</i>	2	7	9	8	2(+)	1(+)	-
TOPLAM	1558				1078(+)	645(+)	591(+)

(*) 7 günlük berraklık derinliğine ilişkin ölçümler.

(**) İncelenen kültürlerin ilgili enzime göre baz alınan ölçüm değerlerinden daha yüksek aktivite gösterenlerinin toplamı (adet).

(***) Bu ortalama değer, türler bazında 7. gün ölçüm sonuçlarının aynı türden incelenen küf adedine oranlanması sonucu elde edilmiştir.

Proteaz aktivitesi için birçok kaynaktan elde ettiğimiz bilgilerden yola çıkarak Tablo 1'deki sonuçlar, referans alınan *Penicillium roqueforti*'nin sonuçlarıyla karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir (3, 13, 14). Değerlendirmede 3. ve 7. günlük berraklık derinliği ölçümlerinin ortalaması 4 mm ve üzerinde olanlar, enzim üretme yetenekleri bakımından pozitif sayılmıştır. Buna göre, proteaz taramalarında incelenen küflerin %69'u pozitif sonuç vermiştir. Kendi arasında en fazla proteolitik aktivite gösteren kültürler *Alternaria alternata*, *Aspergillus*

candidus, *A. clavatus*, *A. oryzae*, *A. saydowii*, *A. versicolor*, *Cladosporium cladosporoides*, *C. herbarum*, *C. resinae*, *Curvularia geniculata*, *Fusarium solani*, *Geothricum candidum*, *Monascus ruber*, *Moniliella acetoabutens*, *Penicillium chrysogenum*, *P. corylophyllum*, *P. griseofulvum*, *P. lividum*, *P. nalgiovense*, *P. paraherquei*, *P. roqueforti*, *Paecilomyces fulvus*, *Scopulariopsis candida*, *Trichoderma* spp., *Verticillium* sp.'dir. Yedinci günlük berraklık derinliği ortalaması en yüksek olan suş ise *A. niger* (*carbonarius*)'dir. Hiç proteolitik aktivite göstermeyen suşlar; *Aspergillus glaucus*, *A. wentii*, *Chatemium* spp., *Curvularia lunata*, *Epicoccum purpuracens*, *Penicillium implicatum*, *Paecilomyces variotti*, *Papularia* sp., *Scopulariopsis fusca*'dır. Yine Tablo 1, amilolitik aktivite açısından kalitatif olarak incelendiğinde; küflerin %41'i pozitif sonuç vermiştir. En fazla amilolitik aktivite gösterenler *Aspergillus amstelodami*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. tamari*, *Mucor pusillus*, *M. racemosus*, *P. aurantiogriseum*, *P. granulatum*, *P. hirsutum*, *P. rugulosum*, *P. viridicatum*, *Paecilomyces variotti*, *Stemphyllum lanuginosum*, *Trichoderma* spp.'dir.

Lipaz için 1558 tarama yapılmış, 7. günlük ölçüm sonuçlarının ortalamaları 20 mm olarak bulunduğundan bu değer baz alınmış, 20 mm ve üzeri olanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Buna göre 618 adet küf pozitif sonuç vermiştir. Mevcut suşlar içinde *A. candidus*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *Chatemium* sp., *Mucor pusillus*, *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. cyaneum*, *P. expansum*, *P. hirsutum*, *P. janthinellum*, *P. liliaceum*, *P. notatum*, *P. puberulum*, *P. sublateralium*, *Phanerocheta chrysosporium* ve *Trichoderma* spp. en fazla lipolitik aktivite gösterenlerdir. Bu enzim aktivite değerleri kültürlerin mevcut durumları itibarıyla gösterdikleri özellikler olup, çoğu zaman beklentilerle uyum gösterirken, zaman zaman da sapma belirlenmiştir.

Chranowska ve ark.'ın yaptığı benzer bir çalışmada (13), *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* ve *Mucor* spp.'lerinin birçok türünde proteolitik aktivite taramaları yapılmış, özellikle *Penicillium* türlerinin asit proteaz açısından zengin, alkali ve nötral proteaz açısından zayıf kaynaklar olduğu bildirilmiştir. Farklı 10 *Penicillium* türüyle yapılan bu çalışmada, glukozu karbon kaynağı, kazeini de azot kaynağı olarak kullanan ekstraselüler proteaz üreticisi bu türlerin, üretim durumları 3 grupta değerlendirilmiştir. Buna göre ≤ 35 U/ml (ünite/ml) olanlar düşük, 50-60 U/ml olanlar orta, ≥ 80 U/ml olanlar yüksek aktivite olarak ifade edilmiştir. Değerlendirmede, reaksiyon koşullarında optik dansite'nin 0.1 birim artışı ünite olarak bildirilmiştir. Sonuçta *P. piscaricum*, *P. cyclopium*, *P. candidum*, *P. camemberti* en aktif türler olarak belirlenmiş ve maksimum aktivite 5-6 günlük kültürlerde 83-135 U/ml olarak saptanmıştır.

Mikrobiyal kaynaklı enzim üretimi hayvansal kaynaklara göre çok daha ekonomik olduğundan tercih edilmektedir. *P. roqueforti*, *P. caserilum*, *Mucor miechi*, *M. pusillus*, *Endothia parasitica* proteaz üretimi için FDA tarafından GRAS (kullanımı güvenli) olarak kabul edilen başlıca küflerdir (15). Endüstriyel proteaz üretiminde birçok araştırmacının değerlendirmesi sonucunda *Aspergillus* sp.'lerinin de kullanıldığı bildirilmiştir. Lipaz için *A. niger*, *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., ksilanaz, amilaz ve selülaz için *Aspergillus* ve *Trichoderma* spp., glukoz için ise *Penicillium* ve *Trichoderma* başlıca kaynak küfler olarak verilmiştir (16, 17, 18).

Endüstriyel gereksinimler yeni lipaz kaynaklarını belirlemek üzere, değişik lipolitik mikroorganizmaların incelenmesi çalışmalarını da zorunlu kılmaktadır. Örneğin *P. citrinum*'un

lipaz üretebilme yeteneğinin (U/ml), protoplastının klonlanarak yapılan rejenerasyon çalışması sonucu, 3 kat arttığı saptanmıştır. Bu kültürün seçilmiş ve modifiye edilmiş suşunda 72 saatte 3.78-10.83, 96 saatte ise 3.81-11.16 U/ml arasında değişen bir lipolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bunların orjinal kapasiteleri ise 72 saatte 2.66 U/ml, 96 saatte 3.50 U/ml olarak ölçülmüştür (19).

Mikrobiyal lipaz ekstraselüler karakterli olup, bu enzimi üretme yeteneğinde olan küf cinsleri yaygın bir dağılım göstermektedir. Küflerden üretilen lipaz preparasyonları ticari açıdan da çok önem taşımaktadır. *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Candida cylindracea*, *Geothricum candidum*, *Mucor* sp., *Penicillium* sp. ve *Rhizopus* sp. lipolitik aktivite gösteren başlıca cins ve türlerden olup (12), bulgularımızla da paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak yaptığımız çalışma, Türkiye'de küf profilini belirlemek yanında, ileriye yönelik pek çok araştırma için enzimatik potansiyel belirlemeleri açısından da baz teşkil edecektir. Saptanan enzim üretme potansiyelleri ile de küflerimizin endüstriyel öneme sahip olanları gruplanmış olacak ve pek çok araştırma açısından veri tabanı oluşturacaktır. Yine bu endüstriyel üretim yeteneklerinin geliştirilmesine yönelik çeşitli mutasyon çalışmalarına da hizmet verebilecektir. Çalışmanın ikinci kısmında yapılan diğer bazı endüstriyel enzimler açısından potansiyel belirleme bulguları ayrıca yayına hazırlanacaktır. Bulgularımız, hazırlamakta olduğumuz katalog ile de tüm küf türlerine göre yapılan belirlemeleri daha ayrıntılı olarak içerecek şekilde verilecektir.

Teşekkür

Çalışmamızda enzim üretme yeteneklerinin belirlenmesi aşamasında bilimsel katkılarını, kimyasal madde desteğini esirgemeyen ORBA Biyokimya A.Ş.'inin teknik ekibine; analizlerindeki katkılarından dolayı Enstitümüz teknisyenlerinden İbrahim Kelebek, Ender Gözüm, Arzu Tanlası, Nabi Uygun, Zeliha Karabulut, Melahat Pak'a, teşekkürü bir borç biliriz.

Kaynaklar

1. Paterson, R.R.M. and Bridge, P.D. Biochemical Techniques for Filamentous Fungi. Wallingford, US., IMI Technical Handbooks: No:1, International Mycological Institute (CAB International), 125p, 1994.
2. Cowan, D., Industrial enzyme technology. TIBTECH, 14; 177-178, 1996.
3. Loffler, A., Proteolytic enzymes: source and applications. Food technology, 40(1); 63-70, 1986.
4. James, J., and Simpson, B.K., Applications of enzymes in food processing. Critical reviews in food science and nutrition, 36(5): 437-463, 1996.
5. Dubois, K.D., Enzymes in baking 3. Products. Research department technical bulletin, 2(12): 1-10, 1980.
6. Preist, G.F., Enzymes, extracellular. Encyclopedia of Microbiology. London, Academic press, Inc. Ltd., 2: 81-93, 1992.

7. Harlander, S., Food biotechnology. Encyclopedia of Microbiology. London, Academic press, Inc. Ltd., 2: 191-207, 1992.
8. Topal, Ş., Küf koleksiyonlarının oluşturulması ve korunumu. Gıda, 14(6): 371-380, 1989.
9. Topal, Ş., Establishment and preservation of mould culture collection of Turkey. Culture collections to Improve the quality of life (Ed's: Samson, R.A., Stalpers, J.A., van der Mei, D., and Stouthamer, A.H.), Proceedings of the eight International congress of culture collections, Ponsen & Looyen, Wageningen. 426-427, 1996.
10. Topal, Ş., Türkiye'nin dominant mikofarasıyla kültür koleksiyon merkezinin oluşturulması. 10. Kültür Koleksiyonları Endüstriyel Mikrobiyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Mersin, 25-27 Eylül, KÜKEM Dergisi, 20(3): 19-20, 1997. KÜKEM Dergisi, 21(1): 69-88, 1998.
11. Campenhout, L., Moutmicroflora: Kwantificeren Isoleren en Karakteriseren Van Schimmels. Ph. D. Thesis, Katolieke Universiteit, Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Leuven, 1995.
12. Lima, N., Teixeira, J.A., and Mota, M., Deep agar-diffusion test for preliminary screening of lipolytic activity of fungi. Journal of Microbiological Methods, 14: 193-200, 1991.
13. Charanowska, J., Kolaczowska, M., and Polanowski, A., Production of extracellular proteolytic enzymes by various species of *Penicillium*. Enzyme Microbial Technology, 15: 140-143, 1993.
14. Durand-Poussereau, N., and Fevre, M., Characterization of protease deficient strain of *P. roqueforti* generated by heterologous plasmid integration: potential use for protein production. Journal of Biotechnology, 51: 97-105, 1996.
15. Topal, Ş., Mikrobiyolojik yolla renin üretimi. TÜBİTAK MAM Beslenme ve Gıda Teknolojisi Bölümü, Yayın No:63, 96s, Aralık, 1982.
16. West, I.S., Enzymes in the food processing industry. Chemistry in Britain, December; 1220-1222, 1988.
17. Topal, Ş., Enzimler, mikrobiyolojik yolla enzim üretimi ve bu teknolojiye reninin yeri. Gıda, 10(1): 25-37, 1985.
18. Liaw, E.T., and Penner, M.H., Substrate-Velocity Relationships for the *Trichoderma viride* cellulase-catalyzed hydrolysis of cellulose. Applied & Environmental Microbiology, Aug; 2311-2318, 1990.
19. Maliszewska, I.H., and Zboinska, E.M., *Penicillium citrinum* protoplasts: preparation, regeneration and lipolytic activity of regenerants. Acta Biotechnology, 16(2-3): 193-198, 1996.
20. Samson, R.A., Stalpers, J.A., Van Der Mei, D., and Stouthamer, A.H. (Ed's), Culture Collections to improve the quality of life (Centraalbureau voor schimmel cultures, Bearn, The Netherlands & WFCC). Proceedings of the 8th international congress for culture collections, Ponsen & Looyen, Wageningen, The Netherlands, 1996.