

**Halotolerant Funguslarda Enzim Taranması  
ve  
Tuz Konsantrasyonunun Etkisi**

**Nalan Özcan**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Ağustos 2007**

**Screening of Enzymes in Halotolerant Fungi  
and  
Effect of Salt Concentration**

**Nalan Özcan**

**MASTER OF SCIENCE THESIS**

**Department of Biology**

**August 2007**

**Halotolerant Funguslarda Enzim Taranması ve Tuz Konsantrasyonunun Etkisi**

**Nalan Özcan**

**Eskişehir Osmangazi Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Genel Biyoloji Bilim Dalında**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Olarak Hazırlanmıştır**

**Danışman: Doç. Dr. Semra İLHAN**

**Ağustos 2007**

Nalan ÖZCAN' ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Halotolerant Funguslarda Enzim Taranması ve Tuz Konsantrasyonunun Etkisi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye : Doç. Dr. Semra İLHAN (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Merih KIVANÇ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Cansu FİLİK İŞÇEN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Abdurrahman KARAMANCIOĞLU

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Son yıllarda çok düşük ve yüksek sıcaklık, pH, tuz ve basınç gibi ekstrem ortamlarda yaşayan çeşitli mikroorganizmalara rastlanmıştır, bunlara ekstremofil olarak adlandırılmıştır. Bu mikroorganizmalardan elde edilen ekstreozimlerin (enzimlerin) ekstrem koşullarda kararlı olmaları endüstriyel amaçlı enzim üretiminde tercih edilmelerini sağlamıştır. Bu çalışmada tuzlu topraklardan izole edilen 25 farklı taksona ait 104 mikrofungus izolatu tarafından amilaz, lipaz ve proteaz sentezleme yetenekleri incelenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, en iyi aktivite gösteren izolatlar tarafından bu enzimlerin üretimi üzerine tuz konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır.

Araştırma sonucunda incelenen izolatların büyük bir kısmının proteaz (%80), amilaz (%51) ve lipaz (%41) olmak üzere çeşitli enzimatik aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir. Amilaz üretimi için *P. chrysoeum*; lipaz için *A. versicolor* ve proteaz için *A. niger* en yüksek aktivite gösteren türlerdir.

Enzim üretimi yüksek olan türlerin enzim aktivitesi üzerine tuz konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. %2,5-10 tuz konsantrasyonunda amilaz *P.chrysogenum* (2.10.3); lipaz *A. versicolor* (4.10.1), *P.chrysogenum* (2.10.3) ve *P. aurantiogriseum* (7.5.2); proteaz *A. niger* (6.10.6) ve *A. flavipes* (9.10.8) en iyi sonuç gösteren türlerdir.

Çalışmamızın sonucunda, tuz konsantrasyonunun artmasıyla izolatların enzim üretim yeteneklerinin azaldığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Mikrofungus, ekstremofil, ekstreozim, enzim, amilaz, lipaz ve proteaz

## SUMMARY

In the recent years, various microorganisms which live in extreme circumstances such as pH, salt, pressure, the low and high temperatures have been come across and they have been named as extremophiles. Deterministic nature of extremozym (enzymes) which are being extracted from such microorganisms provided them to be preferred in the industrial orientated enzymes production. In this study amylase, lipase and protease production by 104 microfungi isolates belonging to 25 different taxa, isolated from salty soils has been investigated. Furthermore, the effect of salt concentration on production of such enzymes by the best activity- shown isolates has been researched in this study.

Research results indicate that most of the isolates investigated have various enzymatic activity such as lipase (%41), amylase (%51) and protease (%80). *P. chrysogenum* for amylase production, *A. versicolor* for lipase and *A. niger* for protease production appear to be the highest activity shown types.

The effect of salt concentration on enzymes activity of the species that have high enzyme production has also been studied. The species that show the best results in the %2,5 -10 salt concentration are as follows: amylase *P. chrysogenum* (2.10.3); lipase *A. versicolor* (4.10.1), *P. aurantiogriseum* (7.5.2) and *P. chrysogenum* (2.10.3) and protease *A. niger* (6.10.6) and *A. flavipes* (9.10.8).

Finally, ability of the enzyme production of the microfungi isolates was observed to notably decrease, when the salt concentration increase in the medium.

Keywords: Microfungus, extremophiles, extremozym, halotolerant, enzyme, amylase, lipase and protease.

## TEŞEKKÜR

Bana bu konuda çalışma imkanı sunan ve çalıŐmalarım aşamasında değerli görüşleri ile beni yönlendirip destek olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Semra İLHAN'a;

Her konuda yanımda bulunarak, destek ve yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Cansu FİLİK İŞÇEN'e;

Tez çalıŐmamın her anında yardım ve desteklerini esirgemeyen çok değerli arkadaşlarım Mustafa SAÇKESEN ve Bükay YENİCE GÜRSU'ya;

Hayatımın her anında yanımda olan ve her konuda fedakarlıklarını esirgemeyen değerli aileme;

Ayrıca tez çalıŐmamda gerekli olan sarf malzeme alımı için maddi desteği sağlayan Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Araştırma Merkezine (FBAM)'a;

En içten saygı ve teŐekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET.....</b>	v
<b>SUMMARY.....</b>	vi
<b>TEŞEKKÜR.....</b>	vii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ.....</b>	x
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ.....</b>	xii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....</b>	xiii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	4
2.1 Halofilik Funguslar.....	4
2.2 Enzimler.....	7
2.2.1 Salgılanma şekillerine göre enzimler.....	9
2.2.2 Enzim kaynakları.....	10
2.2.3 Aktivitesi incelenecek enzimler.....	12
2.2.3.1 Amilaz.....	12
2.2.3.2 Lipaz.....	14
2.2.3.3 Proteaz.....	15
2.3 Fungal Enzimlerin Endüstride Kullanım Alanları.....	17
2.3.1 Amilaz enziminin kullanım alanları.....	17
2.3.2 Lipaz enziminin kullanım alanları.....	18
2.3.3 Proteaz enziminin kullanım alanları.....	20
2.4 Enzim Araştırmaları.....	21



## İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
<b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>24</b>
3.1 Materyal.....	24
3.1.1 Enzim aktivitesi belirlenecek fungus izolatları.....	24
3.1.2 Besiyerler.....	25
3.1.3 Çözeltiler.....	27
3.2 Metot.....	28
3.2.1 Spor Süspansiyonunun Hazırlanması .....	28
3.2.2 İzolatların Enzim Aktiviteleri Açısından Taranması.....	28
3.2.2.1 Amilaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	28
3.2.2.2 Lipaz enzim aktivitesinin belirlenmesi .....	30
3.2.2.3 Proteaz enzim aktivitesinin belirlenmesi .....	31
3.2.3 Enzim Aktivitesi Üzerine Tuz Konsantrasyonunun Etkisi .....	33
<b>4. SONUÇLAR.....</b>	<b>34</b>
4.1 İzolatların Enzim Aktivitesi Açısından Taranması.....	34
4.1.1 Amilaz aktivitesi.....	34
4.1.2 Lipaz Aktivitesi.....	39
4.1.3 Proteaz Aktivitesi.....	45
4.1.4 Amilaz Aktivitesi Üzerine Tuz Konsantrasyonun Etkisinin Sonicları.....	55
4.1.5 Lipaz Aktivitesi Üzerine Tuz Konsantrasyonun Etkisinin Sonicları.....	57
4.1.6 Proteaz Aktivitesi Üzerine Tuz Konsantrasyonun Etkisinin Sonicları.....	58
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>60</b>
<b>6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....</b>	<b>68</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Amilaz aktivitesinin analiz basamakları.....	29
3.2 Lipaz aktivitesinin analiz basamakları.....	30
3.3 Proteaz aktivitesinin analiz basamakları.....	32
4.1 Yüksek aktivite gösteren <i>A. parasiticus</i> 'a ait görüntü .....	37
4.2 Düşük aktivite gösteren <i>A. versicolor</i> 'a ait görüntü.....	37
4.3 Aktivite göstermeyen <i>P. implicatum</i> 'a ait görüntü.....	37
4.4 Tüm izolatların amilaz aktivitesi açısından dağılımı.....	38
4.5 <i>Aspergillus</i> genusuna ait izolatların amilaz aktivitesi açısından dağılımı...	38
4.6 <i>Penicillium</i> genusuna ait izolatların amilaz aktivitesi açısından dağılımı...	38
4.7 Genus düzeyinde aktivite gösteren izolatların dağılımı.....	41
4.8 Lipaz aktivitesi gösteren <i>A. flavipes</i> izolatları.....	42
4.9 Lipaz aktivitesi gösteren <i>A. sclerotiorum</i> izolatları.....	42
4.10 Lipaz aktivitesi gösteren <i>A. sydowii</i> izolatları.....	42
4.11 Lipaz aktivitesi gösteren <i>A. versicolor</i> izolatları.....	43
4.12 Lipaz aktivitesi gösteren <i>P. aurantiogriseum</i> izolatları.....	43
4.13 Lipaz aktivitesi gösteren <i>P. chrysogenum</i> izolatları.....	43
4.14 Lipaz aktivitesi gösteren <i>P. corylophylum</i> izolatları.....	44
4.15 Lipaz aktivitesi gösteren <i>P. implicatum</i> izolatları.....	44
4.16 Lipaz aktivitesi gösteren <i>P. waksmanii</i> izolatları.....	44
4.17 Proteaz aktivitesi görüntüsü.....	48
4.18 Aktivite olmayan görüntü.....	48
4.19 Tüm izolatların proteaz aktivitesi açısından dağılımı.....	49
4.20 Genus düzeyinde aktivite gösteren izolatların dağılımı.....	49
4.21 Proteaz aktivitesi gösteren <i>A. flavipes</i> izolatları.....	50

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
4.22	Proteaz aktivitesi gösteren <i>A. sclerotiorum</i> izolatları.....	50
4.23	Proteaz aktivitesi gösteren <i>A. sparsus</i> izolatları.....	50
4.24	Proteaz aktivitesi gösteren <i>A. sydowii</i> izolatları.....	51
4.25	Proteaz aktivitesi gösteren <i>A. versicolor</i> izolatları.....	51
4.26	Proteaz aktivitesi gösteren <i>M.S</i> izolatları.....	51
4.27	Proteaz aktivitesi gösteren <i>P. aurantiogriseum</i> izolatları.....	52
4.28	Proteaz aktivitesi gösteren <i>P. chrysogenum</i> izolatları.....	52
4.29	Proteaz aktivitesi gösteren <i>P. corylophyllum</i> izolatları.....	52
4.30	Proteaz aktivitesi gösteren <i>P. griseofulvum</i> izolatları.....	53
4.31	Proteaz aktivitesi gösteren <i>P. implicatum</i> izolatları.....	53
4.32	Proteaz aktivitesi gösteren <i>P. puberulum</i> izolatları.....	53
4.33	Proteaz aktivitesi gösteren <i>P. waksmanii</i> izolatları.....	53
4.34	Proteaz aktivitesi gösteren <i>S. chartarum</i> izolatları.....	54
4.35	Proteaz aktivitesi gösteren <i>U. atrum</i> izolatları.....	54
4.36	<i>P. aurantiogriseum</i> amilaz aktivitesine tuz konsantrasyonunun etkisinin görüntüsü.....	56
4.37	Proteaz aktivitesi üzerine tuz konsantrasyonu etkisine ilişkin görüntüsü...	59

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<b><u>Çizelge</u></b>		<b><u>Sayfa</u></b>
<b>3.1</b>	Test edilen fungus izolatları.....	24
<b>4.1</b>	Amilaz aktivitesinin tarama sonuçları.....	34
<b>4.2</b>	Lipaz aktivitesinin tarama sonuçları.....	39
<b>4.3</b>	Proteaz aktivitesinin tarama sonuçları.....	45
<b>4.4</b>	Tuz konsantrasyonunun amilaz aktivitesi üzerine etkisi.....	55
<b>4.5</b>	Tuz konsantrasyonunun lipaz aktivitesi üzerine etkisi.....	57
<b>4.6</b>	Tuz konsantrasyonunun proteaz aktivitesi üzerine etkisi.....	58

## **SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b><u>Simgeler</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
Atm.	Atmosfer Basıncı
°C	Derece Santigrat
G	Gram
L	Litre
Mg	Miligram
ml	Mililitre
Mm	Milimetre
pH	Ortamdaki Hidrojen İyonu Konsantrasyonu
Rpm	Dakikadaki devir sayısı

<b><u>Kısaltmalar</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
EC	Enzim Kodu
Et al.	Ve diğerleri
M	Molar
MA	Malt Agar
MEA	Malt Ekstrat Agar
N	Normalite
NaCl	Sodyum Klorür
PDA	Potato Dextrose Agar
Sp.	Species (Tür)
Spp.	Subspecies (Alt Tür)
Vd.	Ve diğerleri
YNB	Yeast Nitrogen Base

## 1. GİRİŞ

Hücrelerde oldukça önemli metabolik görevleri olan enzimler, biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir ve çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere gündelik ve ekonomik hayata girmiştir.

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır. Mikrobiyal yolla enzim üretimi kullanılabilir toprak alanı, iş gücü, iklim, mevsim şartları v.b. birtakım kısıtlayıcı faktörlere bağlı değildir. Uygun strain seçimi ve kullanılan mikroorganizmaların optimum gelişme şartları sağlandığı sürece standart ve ekonomik bir enzim üretimi için en uygun olan kaynaklardır (Underkofler, 1976).

Bu mikrobiyal kaynaklar arasında funguslar önemli bir yere sahiptir. Doğal çevrede yaygın olarak bulunabilen funguslar, ekosistemde yararlıdır nitelikli ürünler üretebildiklerinden, endüstriyel uygulamalarda kaynak olma özelliğini kazanmıştır. Fungusların enzim üretim yetenekleri önemli endüstriyel avantajlar sağlamaktadır. Enzim kullanım açısından gıda endüstrisi, tek başına %50'lik bir paya sahiptir.  $\alpha$ -amilaz,  $\beta$ -amilaz ve glukoamilaz gibi mikrobiyal amilazlar enzimler arasında en önemlileri olup günümüzde biyoteknolojide oldukça büyük önem kazanmışlardır. Mikrobiyal amilazlar uygun preparasyonlarda hazırlandıktan sonra ilaç sanayinde, analitik kimya alanında, nişastanın sakkarofikasyonu, tekstil ve gıda sanayinde, bira sanayi ve damıtma endüstrilerinde, tahıl ürünleri ve çikolata işleme teknolojisinde geniş bir uygulama alanına sahiptir (Eskin et al, 1971; James and Simpson, 1996; Topal vd., 1998). Lipazlar bakteri, maya ve küfleri içeren mikrobiyal flora tarafından bol miktarda üretilmektedir. Lipazlar gıda endüstrisinde, biyomedikal uygulamalarda, biosensörler ve pestisitlerin yapımında, deterjan ve deri sanayinde, çevre yönetiminde,

kozmetik ve parfüm sanayiinde uygulama alanları bulmaktadır. Endüstriyel olarak en yaygın kullanılan lipaz üreticisi mikroorganizmalar *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Pseudomonas spp.* ve *Rhizopus spp.*'dir. Gıda endüstrisinden yaygın olarak kullanılan enzimlerden proteaz; unlu ürünlerde (ekmekçilikte), deterjan ve temizleme sanayinde, biyomedikal uygulamalarda, etlerin olgunlaştırılmasında, balık proteininin çözünürlüğünün artırılmasında, tabaklama sanayinde, klinikte (sindirim kolaylaştırıcı olarak, tanıda v.b.), atık arıtımı ve kimyasal endüstride kullanılmaktadır (Löffler, 1986).

Bütün organizmalar hücresel faaliyetlerini sürdürebilmek için küçük miktarlarda çok çeşitli enzimleri üretmektedir. Günümüze kadar tanımlanmış olan 3000'den fazla enzimin büyük çoğunluğu mezofilik organizmalardan izole edilmektedir. Son yıllarda ortaya çıkan yeni bir terim olan "ekstremozimler" ise ekstrem çevrelerde yaşayan mikroorganizmalarda elde edilen enzimler olarak ifade edilmektedir. Ekstremozimler, ekstrem olarak yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, yüksek tuz, yüksek asit veya alkalın pH'larda yaşayan ve ekstremofiller olarak isimlendirilen mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir.

Ekstremofillerin keşfedilmesi ve bu mikroorganizmalardan elde edilen ekstremozimlerin (enzimlerin) ekstrem koşullarda kararlı olmaları, birçok teknolojik süreçte ekstremofillerin kullanımına yol açmıştır. Ekstremofillerle yapılan çalışmaların büyük bir kısmı ısıya dayanıklı (termostabil) enzimler oluşturur. Hiperhalofillerin enzimleri, yüksek iyonik gücün bulunduğu ortamlarda etkin olmaları yanında termostabil özellikleri nedeniyle endüstriyel amaçlı enzim üretiminde tercih edilmektedir (Margesin and Schinner, 2001).

Halotolerant ve halofilik mikroorganizmalar biyoteknolojinin birçok alanında aktif ve potansiyel uygulamaya sahiptirler. Tuz içeren ve içermeyen ortamlarda büyüeyebilen mikroorganizmalar halotolerant olarak adlandırılmıştır. Büyüeyebilmek için tuz gereksinimi olan mikroorganizmalar ise halofilik mikroorganizmalar olarak adlandırılmaktadır (Margesin and Schinner 2001).

Dünya üzerinde halofilik ve halotolerant organizmaların yaşamlarını sürdürdüğü sınırlı sayıda habitat bulunmaktadır. Ülkemizde bu organizmalara Tuz Gölü, Çamaltı Tuzlası gibi yüksek tuz içeren ortamlarda rastlanmaktadır. Bu tez endüstriyel önemi olan halofilik mikroorganizma grubunun enzim profillerini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Bu çalışmada tuz gölü çevresindeki topraklardan izole edilen mikrofunguslar enzim sentezleme yetenekleri tarafından taranmıştır. Mikrofunguslar 2006 yılında Demirel ve arkadaşları tarafından yürütülen “Türkiye’de bulunan tuzlaların mikrofunguslarının belirlenmesi” çalışması sonucunda izole edilmiştir. Halotolerant olduğu bildirilen 104 mikrofungus izolatu endüstriyel öneme sahip enzimler (amilaz, lipaz ve proteaz) açısından taranmıştır ve en iyi sonuç gösteren mikrofungus izolatlarının enzim üretimi üzerine tuz konsantrasyonunun (%0-15) etkisi araştırılmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. HALOFİLİK FUNGUSLAR

Fungusların yeryüzünde yaygın bir dağılım göstermesi nedeniyle şimdiye kadar izolasyon çalışmalarının yapıldığı bölgeler fiziksel ve kimyasal açıdan oldukça farklılık göstermektedir. Bununla birlikte, yüksek oranda tuz içeren ya da termofilik ortamlar gibi ekstrem koşulların hakim olduğu yerlerin canlı yaşamı için uygun olmadığı düşüncesi, bu tip ortamlarda gelişen ya da canlılığını sürdüren fungus ve diğer canlı gruplarına ait türlerin ortaya çıkarılmasını geçiktirmiştir. Tuzlalardaki hipersalin suların sadece halofilik alg ve bakteri popülasyonlarından oluştuğu ve halofilik funguslardan tamamiyle yoksun olduğu düşünülmekteydi.

Yakın zamana kadar yüksek oranda tuz içeren çevrelerdeki mikrobiyal kommunitenin ağırlıklı olarak Archaeae ve Bacteria türleri ve ökaryotik bir alg türü olan *Dunaliella salina* olduğu düşünülse de, günümüzde bu tip ekstrem çevrelere uyum sağlamış halotolerant ve halofilik fungusların da varlığı ortaya çıkarılmıştır. İsrail'deki Ölü Deniz (Dead Sea), Amerika'daki Büyük Tuz Gölü (Great Salt Lake) gibi yüksek tuz konsantrasyonlarına sahip ekstrem çevrelerin halofilik biyotasına yönelik birkaç çalışmaya rastlanmaktadır. Bu çalışmalarda hipersalin çevrelerdeki fungusların sınırlı sayıda genusa ait olduğu, fakat tahmin edilenden daha yüksek bir çeşitliliğine sahip olduğu görülmektedir. Koyu renkli mayalar meristematik maya benzeri funguslardır ve *Cladosporium* genusuyla ilişkilidirler. En yüksek sıklıkta görülen koyu renkli olmayan funguslar ise genellikle telemorfik safhaya sahip *Aspergillus* ve *Penicillium* genuslarına ait türlerdir. Diğerleri *Wallemia*, *Scopulariopsis* ve *Alternaria*'dır (Ventosa, 2004).

Tuzlalar, mikroorganizmalar için spesifik yaşam koşulları sağlar. Bu alanlar, yüksek konsantrasyonda NaCl ve diğer tuzları içermeleri nedeniyle ekstrem çevrelerdir ve nadir de olsa, su aktivitesi, düşük oksijen konsantrasyonu ve yüksek UV radyasyonda ani değişimler görülebilmektedir. Genellikle en yüksek tuz içeren konsantre deniz suyunda mikrobiyal yaşamın çoğunlukla Archaeae, Bacteria türleri ve ökaryotik bir alg türü olan *Dunaliella salina* olduğu düşünülmekteydi. Diğer ökaryotik mikroorganizmalar genellikle daha düşük tuzluluklarda görülürler ve alg ve

protozoonların farklı türleriyle temsil edilirler. Düşük su aktiviteli ortamlarda gelişebilen kserofilik funguslar sıklıkla yüksek tuz ya da şeker konsantrasyonuna sahip gıdalardan izole edilmesine rağmen, son zamanlara kadar doğal hipersalin çevrelerden izole edilememiş olması ilginçtir. Yüksek konsantrasyonlarda çözünmüş madde varlığında, bilinen gıda kaynaklı kserofilik birkaç fungus türünde gelişmenin öncelikle ortamın su aktivitesiyle belirlendiği, çözünmüş maddenin kimyasal yapısıyla bağlantılı olmadığı görülmektedir. Bu nedenle 1975'in sonlarına kadar halofilik fungus terimi, sadece birkaç kserofilik gıda kaynaklı tür için kullanılmıştır (Buchan et al., 2003). Tuz bataklıkları, tuzlu topraklar ve deniz gibi kısmen tuzlu doğal çevrelerdeki fungusların izolasyonunu tanımlayan sadece birkaç literatüre rastlanmaktadır. Ancak, son zamanlarda sadece ekstrem denebilecek, neredeyse NaCl ile doygunluğa ulaşmış tuzlu doğal çevrelerde bulunan funguslar üzerine çalışmalar başlamıştır (Gunde-Cimerman, et al., 2000; Mandeel, 2002; Grishkan, et al., 2004; Butinar, et al., 2005).

Ekstremofillerin keşfedilmesi ve bu mikroorganizmalardan elde edilen ekstremozimlerin (enzimlerin) ekstrem koşullarda kararlı olmaları, birçok teknolojik süreçte ekstremofillerin kullanımına yol açmıştır. Ekstremofillerle yapılan çalışmaların büyük bir kısmı ısıya dayanıklı (termostabil) enzimler oluşturur. Hiperhalofillerin enzimleri, yüksek iyonik gücün bulunduğu ortamlarda etkin olmaları yanında termostabil özellikleri nedeniyle endüstriyel amaçlı enzim üretiminde tercih edilmektedir (Margesin and Schinner, 2001).

Ekstremofilik mikroorganizmalar; yüksek ve düşük sıcaklıklarda, pH değerlerinde (pH 0-3 veya pH 10-12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-30) yaşamak üzere adapte olmuşlardır (Niehaus et al., 1999). Bu şekilde farklı ekolojik koşullarda yaşayan mikroorganizmalar termofilik, asidofilik, alkalifilik ve halofilik bakteriler şeklinde sınıflandırılmıştır (Zeikus, 1979). Bu koşullarda yaşayan bakterilerden elde edilen enzimler ekstrem pH ve sıcaklık koşullarına dayanıklı oldukları için endüstriyel alanda yoğun olarak kullanılmaya başlanmışlardır. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır.

*Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Wallemia* cinsleri hipersalin çevrelerde gelişme yeteneğinde olan funguslardır (Ventosa, 2004). Bu grubun temsilcileri tarafından biyomoleküllerin üretimi endüstriyel, tıbbi ve biyoteknolojik uygulamalarda oldukça fazla kullanılmaktadır. Halofilik mikroorganizmalar biyoteknolojik olarak birçok uygulama alanında kullanılmaktadır. Bunlar;

1. Besinlerde ve besin endüstrinde (Protein kaynağı olarak *Spirulina spp.* yetiştirilmesi, *Dunaliella spp.* gibi griserol, beta karoten ve proteince yüksek organizmalar kullanımı),
2. Enzimlerin üretiminde (Yüksek tuz konsantrasyonlarında çalışabilen amilaz, lipaz, beta laktamaz ve proteaz enzimlerin eldesinde),
3. İlaç endüstrisinde (Çeşitli antimikrobiyallerin eldesinde),
4. Petrol kazanımında (Halofillerin yüzey aktiviteleri ve ürettikleri bir takım maddelerin özellikleri petrol kazanımda),
5. Çevre biyoteknolojisinde (Tuzlu ya da alkali endüstriyel sularda fosfat giderilmesinde, kirletilmiş hipersalin ortamlarda kontaminant indikatör olarak) (Da Costa et al., 1989).

## 2.2. ENZİMLER

Enzimler; karbon, oksijen, hidrojen ve azottan oluşan, kimyasal tepkimelerde katalizör olarak rol alan, yaşayan mikroorganizmalar (bakteriler, funguslar) tarafından salgılanan protein yapısında moleküllerdir. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü kendisi değişikliğe uğramadan düzenlerler. Hemen hemen her metabolik reaksiyon enzimler yardımıyla kontrol edilip hızlandırılır. Reaksiyonun başlangıç aşamasında enzimin etki ettiği madde substrat olarak adlandırılırken, reaksiyon sonucu miktarında artış görülen ve açığa çıkan madde ise ürün olarak adlandırılır (Bhat, 2000).

Enzimler diğer katalizörlerden farklı olarak üç önemli özelliğe sahiptir:

1. Enzimler hızlı çalışır.
2. Enzimler özgün reaksiyonları katalize ederler: Her enzim ancak belirli bir reaksiyonu seçerek katalize etmektedir. Diğer katalizörlerin çoğunun çeşitli kimyasal reaksiyonlarda görev yapmalarına karşın, enzimler genellikle bir tek spesifik reaksiyonu katalize etmektedir. İleri derecede substrat spesifikliğı, istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu engellemekte ve çevre sorunu da en aza indirgenmektedir.
3. Enzimler biyokimyasal reaksiyonları az enerji ile ve düşük sıcaklıkta katalizlemeyi başarırlar.

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 bulunduğundan terminoloji karmakarışık bir hal almıştır. Bunun üzerine 1953'te Hoffman-Ostenhoff ve 1958'de Dixon-Webb bu karmaşaya bir son vermek için girişimde bulunmuşlar, Uluslar arası Biyokimya Birliğı'nin himayesinde bugün de geçerli olan terminolojinin temelini oluşturmuşlardır (Borris, 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 çeşitli kaynaklardan pek çok enzim izole edilince bunların sınıflandırılmasında da sorunlar çıkmaya başlayınca, konu ile ilgili kuruluşlar enzimleri 6 grup altında toplayarak, daha sistematik bir sınıflama yoluna gitmişlerdir.

Buna göre enzimler;

**1.Oksidoredüktazlar:** Redoks (oksidasyon ve redüksiyon) tepkimelerini katalizleyerek canlılara birçok özellik kazandırılırlar. Enzimlerinin substratları genellikle elektron ve hidrojen donörleridir.

a) Dehidrogenazlar: Elektron kazandırıcı tepkimeleri etkilerler.

b) Oksidazlar: Elektron kaybeden tepkimeleri etkilerler.

c) Redüktazlar: Substratı bir redüktör aracılığıyla indirgeyen enzimlere denir. Örneğin; asetaldehit redüktaz, asetaldehiti alkole redükler.

d) Transhidrogenazlar: Bir molekülden diğerine hidrojen taşıyarak onu redüklerler.

e) Hidroksilazlar: Substratlarına bir hidroksil ya da su molekülü katan enzimlere denir. Örneğin; fenilalanin hidroksilaz bir hidroksil grubunu fenilalanine ekleyerek onu tirozine dönüştürür.

**2.Transferazlar:** Hidrojenin dışında bir atomun veya atom grubunun (metil, karboksil, glikozil, amino, fosfat grupları) bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlarlar.

Dekarboksilazlar: Karboksilik asitlerden CO<sub>2</sub> çıkmasını sağlarlar.

**3.Hidrolazlar:** Bir molekül su sokmak suretiyle ya da su molekülü aracılığıyla moleküllerin yıkılmasını sağlayan enzimlerdir. Ester, peptit, asitanhidrit, C-O, C-C, C-N ve P-N bağlarına etki ederler. Sistematik isimlendirmede daima hidrolaz getirilir, pratik kullanımda ise sadece –az eki getirilir.

a) Esterazlar: Ester bağınyı yıkan enzimlerdir (lipaz, ribonükleaz, fosfataz, pirofosfataz, glikozidaz).

b) Proteazlar: Peptit bağınyı yıkan enzimlerdir (proteinaz).

**4.Liazlar:** C–C, C–O ve C–N arasındaki bağları hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir yolla kırarlar ve bu atomlar arasında çift bağ ilave ederek substratlardan bu grupları ayırırlar. Örneğin; C-C bağı, aldolaz ve dekarboksilazla yıkılır.

**5.İzomerazlar:** Molekül içinde değişiklik yaparak onun uzayda dizilişini değiştiren enzimlerdir. Örneğin; razemaz, epimeraz.

**6.Ligazlar (Sentetazlar):** Enerji kullanarak substrat moleküllerinin birbirine bağlanmasını sağlar. Örneğin; amino asitlerin ve yağ asitlerinin aktifleşmesini sağlarlar.

Bunlar da kendi içlerinde daha alt gruplara ayrılarak EC (EuroCode) harfleri ve 4 rakamla kodlanır. Örneğin; E.C. 3.6.1.3. "ATP fosfohidrolaz" da birinci numara sınıfını, ikinci numara alt sınıfını, üçüncü numara grubunu, dördüncü numara da kendine özgü sıra numarasını verir.

## **2.2.1. Salgılanma Şekillerine Göre Enzimler**

### **2.2.1.1. İntraselüler Enzimler**

İntraselüler enzimler, sitoplazmaya dağılmış olarak bulunan ribozomlarda sentezlenirler. Genelde bu enzimlerin substratları şekerler, aminoasitler, karboksilik asit gibi küçük molekül ağırlığına sahip, hücre zarından geçebilme yeteneği olan moleküllerdir (John, 1987). Hücre metabolizması için önemli rollere sahiptirler.

### **2.2.1.2. Ekstraselüler Enzimler**

Ekstraselüler enzimler, hücre tarafından üretilip dışarıya salgılanır. Ortamda bulunan protein, yağ, karbonhidrat gibi organik maddeleri parçalayarak hücreden bağımsız olarak görev alırlar.

## **2.2.2. Enzim Kaynakları**

Endüstriyel enzimler; bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal olmak üzere 3 önemli kaynaktan elde edilirler (Beckhorn, 1967).

**2.2.2.1. Bitkisel kökenli endüstriyel enzimler;** Toksik olmayan incir, enginar v.b. bitkilerden üretilebilirler. En önemli enzimlerin örneği arpa maltından elde edilen ve biracılıkta kullanılan amilaz'dır. Bitkisel enzimlerden en fazla bilinenleri proteolitik enzim olarak bromelain, fisin, papain olup, tahıllardan elde edilen amilolitik enzimler ve özel turunçgil enzimlerdir. Bitkisel kaynakların mevsimlere ve bölgelere göre kısıtlı oluşu en önemli dezavantajdır (Reed, 1966; Godfrey and Reichelt, 1983).

**2.2.2.2. Hayvansal kökenli endüstriyel enzimler;** Kullanımı çok eskilere dayanmakta olup, peynir yapımında kullanılan ve buzağı iškembesinden elde edilen rennet bu alanda verilebilecek başlıca örneklerdir. Geviş getiren hayvanların iškembesi, pankreas, tiroit bezi, domuz midesi ve tavuk yumurtasının akı önemli hayvansal enzim kaynaklarıdır. Ticari olarak üretilen başlıca hayvansal enzimler pankreatin, pepsin, rennin, tripsin, kimotripsin, katalaz ve lipazdır. Hayvansal kökenli enzimlerin varlığı insanların etinden yararlandığı bu hayvanlara olan talepleriyle sınırlıdır (Topal, 1982; Noorderliet and Toet, 1987).

**2.2.2.3. Mikrobiyal kökenli endüstriyel enzimler;** Kaynak mikroorganizmaların kontrollü fermantasyonları sonucu üretilirler. Mikroorganizmalar, enzimlerin kısıtlı olmayan en önemli kaynaklarıdır. Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman, 1987). Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir. Bu sebeple, endüstride mikrobiyal kökenli enzim kullanımı artmıştır (Demain and Solomon, 1981).

Enzim üretiminde mikroorganizmaların kullanımına yönelik birçok avantaja değinilmiştir. Ancak bir mikroorganizma tarafından üretilen farklı enzimlerin karışımı bazen bir dezavantaj da sayılmaktadır. Tek spesifik enzim gerektiren çoğu endüstriyel çaptaki üretim yöntemlerinde istenilmeyen yan etkilere yol açan düşük miktarda başka enzimlerin de mevcut olması kesinlikle bir dezavantajdır. Bu durumlarda istenilen enzim, zor ve masraflı olan yöntemlerle saflaştırılmaktadır. Diferansiyel deaktivasyon, fraksiyonel çöktürme, kolon kromatografisi gibi enzim saflaştırma yöntemleri büyük ölçüde kullanılır hale gelmiştir. Böylece enzim üreticisi istenilen performans özelliklerine sahip ticari amaçla kullanılan enzimleri elde edebilmektedir (Underkofler, 1976).

➤ Mikrobiyal enzimler;

- süt ürünlerinin üretiminde,
- biracılıkta,
- etlerin işlenmesinde,
- meyve sularının berraklaştırılmasında,
- fruktoz şurubu üretiminde kullanılmalarıyla gıda sektöründe,
- protein ve yağ artıklarını parçalamak üzere deterjan endüstrisinde,
- deri ve dokuma ipliklerinin işlenmesini kolaylaştırarak tekstilde,
- teşhis ve tedavi amacıyla tıpta kullanılmaktadırlar.

Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler, hayatımıza bizim asla fark edemeyeceğimiz derecede girmiş olup çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük, ekonomik ve endüstriyel alanlarda yerlerini almışlardır. Bugün enzimler ekmek, bira, peynir gibi gıdaların yapımında, çeşitli deterjan ve temizlik maddelerinin üretiminde, kağıt ve kumaş endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanıldığı gibi tıpta teşhis ve tedavide de önemli rol oynamaktadır (Daniels, 1992).



### 2.2.3. Aktivitesi İncelenecek Enzimler

#### 2.2.3.1. Amilaz

Amilazlar çok önemli ve en eski endüstriyel enzimlerdir. Bu enzimler nişasta moleküllerini dekstrin gibi çeşitli küçük ürünlere hidroliz edebilirler.

Amilaz enziminin buğday nişastasası üzerinde parçalayıcı bir etkisi olduğu 1811 yılında Kirchoff tarafından belirlenmiştir. Ancak parçalama etkeni amilaz tanımlanamamıştır. Benzer etkinin insan tükürüğü ile elde edilebileceği 1831 yılında Leuch tarafından bulunmuştur. Bernflend ise 1951’de tükürüğün bu özelliğine Berzelius tarafından pityalin adının verildiğinin, 1833’de Payen ve Persoz’un ise malttan nişastayı parçalayan bir maddenin varlığını ortaya çıkardıklarını ve buna da diastaz adını verdiklerini belirtmektedir. Ancak günümüzde tüm nişasta parçalayan enzimler amilazlar olarak bilinmektedir.

Ohlsson’un 1930 yılında malttan elde ettiği parçalayıcı enzimler, anomerik tiplerine göre alfa ( $\alpha$ ) ya da beta ( $\beta$ ) amilazlar olarak adlandırılmışlardır. Mybrach ve Neamuler ise amilazlar için endoamilazlar ve ekzoamilazlar olmak üzere başka bir adlandırma sistemi önermişlerdir. Endoamilazlar nişasta molekülünü içinden rasgele hidroliz ederek çeşitli uzunluklarda dallanmış ya da dallanmamış oligosakkaritlere parçalarlar. Ekzoamilazlar ise molekülün uç kısımlarından kısa zincirler şeklinde hidroliz yapan enzimlerdir. Bugün amilazlar, nişastaya etki mekanizmaları ve oluşturdukları ürünlere bağlı olarak  $\alpha$ -amilaz (EC 3.2.1.1. 1,4- $\alpha$ -D-glukan-glukanhidrolase),  $\beta$ -amilaz (EC 3.2.1.2, 1,4- $\alpha$ -D-glukan maltohidrolaz, sakkoragenik amilaz) ve amiloglikosidaz (EC 3.2.1.3) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır (Gupta et al., 2003).

$\alpha$ -Amilazlar (1,4- $\alpha$ -D-glukan-glukanhidrolase)  $\alpha$ -1,4-glikozit bağlarını hidrolizleyen enzimlerdir (EC 3.2.1.1).  $\alpha$ -Amilaz enziminin endüstriyel üretimine ilk kez Japonya’da 1939 yılında *Bacillus subtilis* kullanılarak başlanmıştır. 1970’lerde ise

*B. subtilis* ve *B. licheniformis*  $\alpha$ -amilaz enzimi üretimi için geniş çapta kullanılmaya başlanmıştır (Sarıkaya, 1995).

Bugün  $\alpha$ -amilaz enzimi üretiminde kullanılan diğer mikroorganizmalar içerisinde *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. candidus* gibi bazı funguslar ile *Pseudomonas*, *Saccharophila* bazı *Clostridium* ve *Bacillus* türleri ve alt türleri sayılabilir. Fungal  $\alpha$ -amilazlar sıcaklığa bakteriyel  $\alpha$ -amilazlara göre daha duyarlı olduğundan üzerinde çalışılan asıl enzim kaynağını daha çok bakteriyel  $\alpha$ -amilazlar oluşturmaktadır.

$\beta$ -amilazlar (alfa-1,4 glukoz maltohidrolaz, EC 3.2.1.2) nişasta molekülünün indirgen olmayan ucundan ardarda gelen maltoz birimlerini uzaklaştıran bir ekzoenzimdir.  $\beta$ -amilazlar bitkisel orijinli olup arpa maltı, buğday, tatlı patates ve soya fasülyesinde çok miktarda bulunurken, ilk kez 1974’ de bakterilerden de izole edilmiştir (Telefoncu, 1993).

Amiloglukozidazlar (glukoamilaz,  $\alpha$ -1,4-glukoz glukozhidrolaz EC 3.2.1.3) substrat zincirinin ucundaki indirgen olmayan kısımdan ardışık şekilde bulunan glukoz birimlerini uzaklaştıran bir ekzoenzimdir. Ürün olarak yalnızca glukoz oluşturması amiloglukozidazı  $\alpha$  ve  $\beta$  amilazlardan ayırır. Yani  $\alpha$ -1,6 bağlarına ne  $\alpha$  ne de  $\beta$ -amilazlar etki edemez iken bu enzim hem  $\alpha$ -1,4 bağlarını etkilemekte hem de yavaş bir hızla olsa da  $\alpha$ -1,6 bağlarını da hidrolize etmektedir (Hamilton et al., 1999).

Amiloglukozidazlar glukoamilaz, maltaz, sakkarojenik amilaz veya  $\gamma$ -amilaz olarak da bilinmektedir. Aynı zamanda glikoproteindir. Bu enzim bakterilerde ve küflerde mevcuttur. *Aspergillus* veya *Rhizopus* türleri tarafından ekstrasellüler olarak üretilir ve endüstriyel olarak glukoz ve mısır şuruplarının üretiminde kullanılır (Mittal, 1992; Telefoncu, 1993).

### 2.2.3.2. Lipaz

Lipazlar (triacilgliserol açilhidrolaz EC 3.1.1.3), trigliseritleri di- ve monogliseritlere, gliserin ve yağ asitlerine hidrolizini; ayrıca belirli şartlar altında ters reaksiyonu yani gliserin ve yağ asitlerinden gliserid oluşumunu gerçekleştiren biyolojik katalizörlerdir. Katalitik potansiyelleri çok yüksektir. Yüksek sıcaklıklarda ve organik ortamlarda yüksek stabilitelerinden dolayı önem kazanmışlardır. Lipazlar bakteri, maya ve küfleri içeren mikrobiyal flora tarafından bol miktarda üretilmektedir. Günümüzde biyoteknolojinin sürekli yeni arayışlar içinde olması mikrobiyal kaynaklı lipaz üretimine hız kazandırmıştır. Araştırmalar bitki, hayvan ve mikrobiyal lipazların bilhassa bakteriyel ve fungal lipazların üzerinde uygulanmaktadır.

Bakteriyel lipazlar glikoprotein yapısındadırlar, fakat bazı hücre dışı bakteriyel lipazlara lipoprotein yapısındadırlar. Winkler et al. (1979) çoğu bakteride enzim üretiminin bazı polisakkaritler tarafından etkilenir. Şimdiye kadar çoğu bakteriyel lipazların yapıcı ve substratlarına karşı özgül olmadığı ve az bir kısım bakteriyel lipazların da ısıya karşı dayanıklıdır. Bakteriler arasında *Achromobacter sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus sp.* ve *Chromobacterium sp.*'den lipaz üretiminde faydalanılmaktadır. Stafilokokkal lipazlar doğada lipoprotein yapısında bulunurlar. En çok *Aspergillus niger*, *Mucor* ve *Candida* türlerinden elde edilirler. Fungal lipazlar üzerinde 1950'lerden beri çalışılmaktadır ve Lawrence, Brockerhoff ve Jensen kapsamlı görüşler sunmuşlardır. Bu lipazlar, düşük maliyetli soy verme özelliklerinin olması, ısıya ve pH'ya karşı dayanıklı olmaları, substrat özgüllüğü ve organik çözücülerde aktif olmalarından dolayı kullanılmaktadırlar. Ticari lipazların başlıca üreticileri *Aspergillus niger*, *Candida cylindracea*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *R. delemar*, *R. japonicus*, *R. niveus* ve *R. oryzae* türleridir.

### 2.2.3.3. Proteaz

Ticari olarak mikroorganizmalardan üretilen proteolitik enzimler genellikle endopeptidaz (proteinaz) ve egzopeptidaz karışımlarıdır. Proteinler proteinazlar sayesinde polipeptitlere, peptonlara, proteozlara bunlarda egzopeptidazlar sayesinde aminoasitlere parçalanabilirler. Mikrobiyal proteazların yanında bromelin, papain ve fisin gibi bitkisel proteazlar, pepsin ve tripsin gibi hayvansal proteazlarda endüstride geniş ölçekte kullanılır. Parçalanması zor kompleks yapılı proteinlerin yıkımında uygulamaya özel farklı proteazlar içeren enzim kombinasyonları kullanılır.

Mikrobiyal proteolitik enzimler farklı bakteri ve funguslardan elde edilebilir. Birçok fungal proteaz geniş pH aralığına (4-8) toleranslıdır ve bu aralıklarda oldukça etkili çalışırlar. Bir kısmı hariç bakteriyal proteazlar genellikle pH 7-8 aralığında etkin çalışırlar. Genellikle *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Sporotrichum* türlerinden elde edilirler.

Proteazlar (EC 3.4.21.24 ve 99); serin proteaz (alkali proteaz) (alkali pH), metalloproteaz (nötr pH), sistein proteaz (asidik pH) ve aspartik proteaz (asidik pH) olmak üzere dörde ayrılırlar (Fogarty, 1983; Priest, 1992).

#### 1. Alkali (Serin) Proteazlar

Alkali proteaz (EC 3.4.21.14) enzimi ticari önemi olan bir gruptur. Doğal alkali ortamda aktivite göstermektedirler (pH 8-11) (Whitaker, 1972b; Frost and Moss, 1987). Alkali proteazlar çeşitli mikroorganizmalardan izole edilmekte olup; *Aspergillus oryzae*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Penicillium cyaneofulvum*, *Alternaria tenuissima*, *Saccharomyces cerevisiae* bunlardan bazılarıdır (Reed, 1966; Matsubara and Feder, 1971). 1994 yılında mevcut olan toplam endüstriyel enzimlerin yaklaşık 400 milyon dolarını karşılamaktadırlar. Bu enzimlerin 112 milyon doları deterjan üretimi için kullanılmaktadır. Alkali proteazlar günden güne yükselen bir değere sahiptir (Hodgson 1994).

## 2. Metalloproteazlar

Nötral pH'de yüksek aktivite gösterirler ve küfler bakterilerden yaygın olarak üretilebilmektedirler (Whitaker, 1972b). Mikroorganizmalardan; *Bacillus subtilis*, *Streptomyces griseus*, *Aspergillus oryzae*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *Pseudomonas aeruginosa*'dan metalloproteazlar üretilmektedir (Reed, 1966; Matsubara and Feder, 1971).

## 3. 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 üretilebilmektedirler. 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, rennin ise; *Mucor pusillus* ve *Endothia parasitica*'dan izole edildiği bildirilmektedir (Matsubara and Feder, 1971). Ayrıca, *Rhizopus* türleri de asit proteaz kaynağı olarak gösterilmiştir (Blain, 1975).

## 4. Sistein Proteazlar

Aktif bölgesinde sistein bulunur ve bitki enzimi olan papain bu grubun örneğidir. Bu enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan eldesi oldukça azdır. Bu enzimlerin en uygun çalışma ortamı nötr pH dolayındadır (Fogarty, 1983; Priest, 1992).

## 2.3. Fungal Enzimlerin Endüstride Kullanım Alanları

### 2.3.1. Amilaz Enziminin Kullanım Alanları

$\alpha$ -amilaz ticari olarak kullanılan ilk enzimdir. 1905 yılında Japonya'da tekstil endüstrisinde haşılalma işlemi için ticari amaçla üretilmiştir. Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam olması ve kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilir. Bu işleme haşılama denmektedir (Sarıkaya, 1995). Kumaş dokunduktan sonra, kumaştaki fazla nişastanın uzaklaştırılması gerekir. Bu işleme de haşıl alma adı verilmektedir. Haşıl alma ajanı olarak da yaygın olarak  $\alpha$ -amilaz enzimi kullanılmaktadır (Tarakçıoğlu, 1979).

$\alpha$ -amilazların diğer bir kullanım alanı ise deterjan üretimidir. Enzimler deterjan katkısı olarak ilk kez 1913 yılında Alman kimyacı Otto Röhm tarafından kullanılmıştır.

Meyve suyu endüstrisinde de kullanım alanı bulan amilaz enzimi, özellikle elma ve armut sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Meyveler tam olgunlaşmadan toplandığında meyvede halen nişasta bulunduğu için meyve sularında bulanıklığa yol açmaktadır. Bu sorun ortama  $\alpha$ -amilaz ilave edilerek giderilebilmektedir (Ekşi, 1988; Sarıkaya, 1995).

$\alpha$ -Amilazlar nişasta endüstrisinin yanı sıra çeşitli endüstrilerde de kullanılır. Ekmek yapımında, maya tarafından kullanılmak üzere nişastanın glukoza dönüştürülmesinde kullanılır, ekmeğin bayatlamasını geciktirmesinden ve raf ömrünü uzatmasından dolayı da yaygın olarak kullanılmaktadır. Biracılıkta arpa tanelerinden elde edilen maltın öğütülüp su ile karıştırılmasından sonra ilave edilen  $\alpha$ -amilazlarla alkolik fermantasyon için mayanın kullanacağı şekerler oluşur. Kağıt endüstrisinde ise iyi kalite kağıt (pürüzsüz yüzeyli) eldesi için nişasta banyosuna sokulan kağıt üzerindeki fazla nişastanın uzaklaştırılmasında  $\alpha$ -amilazlar kullanılır.

$\beta$ -amilaz, ekmekçilik, biracılık ve nişastanın fermente olabilir bir şeker olan maltoza dönüştürüldüğü işlemlerde kullanılır (Telefoncu, 1993).

Bira, damıtma, fırıncılık ve tekstil endüstrisinde kullanılan, *Bacillus* ve *Aspergillus* tarafından üretilen, ayrıca arpa ve buğday maltında da bulunabilen enzimler, amilaz ve endo  $\beta$ -glukanazlardır (Demain and Solomon, 1981).

### 2.3.2. Lipaz Enziminin Kullanım Alanları

Lipazlar bakteri, maya ve küfleri içeren mikrobiyal flora tarafından bol miktarda üretilmektedir. Lipazların kullanım alanı çok geniştir. Lipazlar gıda endüstrisinde, biyomedikal uygulamalarda, biyosensörler ve pestisitlerin yapımında, deterjan ve deri sanayiinde, çevre yönetiminde, kozmetik ve parfüm sanayiinde uygulama alanları bulmaktadır. Endüstriyel olarak en yaygın kullanılan lipaz üreticisi mikroorganizmalar; *Candida sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus sp.*'dir. Son yıllarda biyoteknoloji alanında lipazların kullanımında hızlı bir artış gözlenmektedir. Bu nedenle lipazların aşırı üretimini sağlamak amacıyla yönlü mutasyonlar yardımıyla suş geliştirme çalışmalarına ağırlık verilmiştir.

Eczacılıkta sindirimi kolaylaştırıcı ilaçların yapımında, gıda sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Lipazlar son yıllarda kimyasal madde sentez sektörüne de girmiştir. Esterlerin sentezinde, ekmek yapımında, yağ emülsifiyerlerini sentezinde ve yağ modifikasyonları için kullanılmaktadır. Peynir üretimi ya da olgunlaştırılması sırasında ortama eklenmektedir. Lipazlar özellikle süt ve süt ürünlerinin elde edilmesinde lezzet, koku ve tatlarının geliştirilmesinde kullanılır. Süttozu, süt kaymağı, mayonez yapımında, katı ve yumuşak peynir üretiminde kullanılır.

Lipazların kullanımı başka alanlarda da önem kazanmıştır. Özellikle mutfaklardaki yağ filtrelerindeki yağların uzaklaştırılması, boruların yüzeyindeki yağların temizlenmesinde kullanılmaktadır. Atık suların arıtılmasında da kullanılmaktadır.

*Rhizopus oligosporus* lipaz aktivitesi nedeniyle Uzakdoğu'da özellikle Endonezya'da yaygın olan "tempeh" isimli yöresel yemeğin hazırlanışında kullanılmaktadır. Hindistan cevizi, soya fasulyesi gibi bitkisel materyal, bu fungusun

sporları ile inoküle edilerek fermentasyona bırakılmakta ve fungusun lipolitik ve proteolitik aktivitesi nedeniyle değişik bir tat elde edilmektedir (Nahas, 1988).

Kıyafetlerimizi kirleten maddelerin başında proteinler, yağlar ve nişasta gelir. Bu lekeleri yüksek sıcaklıkta kimyasal deterjanlar yoluyla gidermek mümkünse de, enzimlerin kullanılması düşük sıcaklıkta ve daha az mekanik enerji ile istenen temizliği sağlar. Ayrıca çimen, kan, süt ve ter lekelerini çıkarmakta biyolojik olmayan deterjanlara göre çok daha etkilidir.

Deterjanlarda kullanılan enzimlerden proteazlar yumurta, kan gibi lekelerdeki proteinleri parçalar; lipaz yağ lekelerini, amilaz ise nişasta bazlı lekeleri çıkartmakta etkilidir. Çamaşırların yıpranmasıyla oluşan selülöz fibriller ise, selülaz enzimi ile parçalanarak çamaşırların daha yumuşak olması ve renklerini koruması sağlanır (Hiol et al., 2000).

Lipaz enzimi de dericilikte kullanılan enzimlerden biridir. Bu enzim, yalnızca derinin yüzeyindeki değil, içindeki yağları da temizleyerek, deriyi tabaklama ve boyama gibi işlemler için daha uygun hale getirir. Deriler işlenirken bu amaçla bazı proteinler parçalanıp, deriden uzaklaştırılıyor. Deriye ne derecede esneklik kazandırılacağı ise, derinin kullanılacağı alana bağlıdır.

Lipaz enzimi, unda bulunan %1-2 civarındaki lipid içeriğine etki etmektedir. Bu enzim içinde kullanım miktarı ve tipi oldukça önemlidir. Örneğin, yüksek miktarlarda kullanımda hamur özellikleri açısından sorunlar yaşanmasına neden olmaktadır. Öte yandan uygun lipaz tipinin seçilmesi de önemlidir. Türk ekmeğ üretimi için uygun olmayan lipaz tipinin ekmeğ özelliklerine olumlu bir katkısı bulunmamaktadır. Onlara uygun lipaz tipinin ilavesi; hamurun işlenebilirliğinde kolaylık, hamur stabilitesinde artış, ekmeğ içi yumuşaklık, ekmeğ hacminde artış sağlar.



### 2.3.3. Proteaz Enziminin Kullanım Alanları

Proteazlar, toplam endüstriyel enzim ticaretinin yaklaşık %60'nı oluşturmaktadır. Proteazlar, çamaşır deterjanları, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğraf, organik sentezlerde ve atıkların muamelesinde kullanılmaktadır. Proteazlar arasında bakteriyel proteazlar, hayvan ve fungal proteazlar ile karıştırıldığı zaman daha etkin olduğu görülmektedir (Banerjee et al., 1999). Bu nedenle ticari ilgiden dolayı endüstriyel olarak uygun proteazları üreten mikroorganizmalar araştırmacılar tarafından çalışılmıştır (Jasvir et al., 1998). Alkali proteazlar, bakteri, küf, maya gibi çeşitli kaynaklardan elde edilse de alkalifilik *Bacillus* biyoteknolojide en fazla kullanılan mikroorganizmadır (Johnvesly and Naik, 2001).

Proteazlar, deterjan sanayisi gibi geniş uygulama alanlarında kullanıldıklarından çok önemli endüstriyel enzimlerdir (Matyar, 2002). Günümüzde deterjan endüstrisi, yıkama sıcaklığının düşürülmesi ve deterjan kompozisyonunun değişmesi yönünde çalışmalar yapılmakta, fosfat tabanlı deterjanları uzaklaştırarak, deterjan uygulamaları için daha uygun yeni proteazlar üzerinde durmaktadır (Mehrotra et al., 1999). Bu enzim protein lekelerini çıkartır. Örneğin; çim, kan, yumurta ve eter lekeleri bu enzim tarafından temizlenebiliyor. Bu organik, leke yapıcı maddeler, giysinin lifleri arasına sıkıca yapışma eğilimindedir. Proteinler, bir çeşit tutkal gibi iş görüp, normal deterjanların diğer kir ve lekeleri de çıkarmasını engelliyorlar (Telefoncu, 1997).

Fungal proteazların en fazla kullanıldığı alan unlu mamullerin ve ekmek yapımında, hamurun kabarması ve yoğrulma süresini azaltmaya yardımcı olur. Fungal proteazlar aynı zamanda klinik ve farmasotik uygulamalarda sindirim amaçlı kullanılır.

Süt endüstrisinde peynir yapımında genellikle asit proteazlardan olan rennin kullanılmaktadır. Rennin özellikle *Mucor miechei*, *Mucor pusillus* ve *Endothia parasitica*'dan elde edilmektedir (Bothast and Smiley, 1978; Topal, 1982; 1985).

### 2.3. Enzim Araştırmaları

Enzimlerin insanoğlu tarafından kullanımı tarih öncesi devirlere kadar uzanmaktadır. İlk çağlardan beri üretildiği bilinen ekmek, şarap, yoğurt, peynir gibi gıda maddelerinin üretiminde enzimler önemli rol oynamışlardır. Ve daha sonra bildirilen bu sınıfta fisin adı verilen bir enzimin bulunduğu saptanmıştır. Enzimler üzerindeki ilk bilgiler ise 1570’li yıllarda elde edilmiştir. Daha sonraları bu konuda yapılan çalışmalar artmış hatta Pasteur ve Liebing gibi birçok ünlü araştırıcının katkıları ile enzimler hakkında pek çok temel bilgi sağlanmıştır.

Enzim alanında 1760–1829 yılları arasında araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. 1833 yılında şekeri parçalayan aktif madde kısmen izole edilmiş ve bu maddeye ‘diastaz’ adı verilmiştir ki bu enzim řu anda amilaz olarak bilinmektedir. 1835 yılında Barzellius patatesten elde edilen enzimler karışımının, nişastayı sülfürik asitten daha hızlı parçaladığını gözlemlemiş ve gözlemlerine dayalı olarak canlı organizmadaki bütün maddelerin katalizör maddelerin etkisinde yapıldığını iddia etmiştir. Bu maddeleri kimyasal katalizörler olarak değerlendirmiş, ancak bunların protein olduğunu tespit edilememiştir.

1838 yılında Alman kimyacı Berzelius, reaksiyon hızı üzerine etki yapan maddelere “katalizör” ya da “katalizatör” adını vermiştir. 1838’de Gagnard ve Schaw adlı iki bilgin, birbirlerinden habersiz olarak fermentasyon olayını incelemişler ve bu olayın maya adı verilen bazı mikroorganizmalar aracılığıyla meydana geldiğini saptamışlardır.

1860 yılında Pasteur’ün, biyolojik reaksiyonlarda görülen katalizörün kimyasal reaksiyondakilerden farklı olduğu dikkatini çekmiştir. Bunun üzerine fermentasyonun enzimler tarafından başlatıldığını, maya hücrelerinin yapı ve canlılığına bağlı olduğunu savunmuştur. Ayrıca enzimler için organize olmuş ferment deyimini kullanıp aktivite göstermesi için hücrede bulunması gerektiğini söylemiştir. Bunun yanı sıra diğer katalizör maddeler içinse, anorganize ferment deyimini kullanarak bunların aktif olmaları için hücre içinde olmalarına gerek olmadığını belirtmiştir.

1878 yılında K nhe bu aktif maddelere genel tanımla ‘‘ferment’’ adını vermiştir (Kazan, 1997). 1879’da K nhe, biyolojik reaksiyon hızlarına etki eden maddeleri öteki katalizörlerden ayırt etmek için Yunanca, mayada bulunan anlamına gelen enzim kelimesini öneriyor.

1883 yılında Payen ve Person nişastanın çözünürleştirilmesinde, malt özütünün içinde bulunan diastaz enziminin etken olduğunu saptamışlardır.

1884 yılında Chittedon tarafından ileri sürülen üç kavram enzimoloji tarihinde dönüm noktası olmuştur. Hala geçerliliğini koruyan bu üç kavram şöyle özetlenebilir;

- Enzimler proteinlerden oluşmaktadır.
- Katalitik aktivite, enzim yapısına özel ve enzime bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.
- Enzimler pasif katalizörler olmayıp substratları ile ara kompleks oluşturarak görev yapan aktif bileşiklerdir.

1885 yılında Blumenthal, peynir yapımında kullanılmak üzere ilk kez rennin enziminin  z t n  teknolojik boyutlarda üretmeyi başarmıştır.

Enzimlerin endüstriyel amaçla ilk kez kullanımı 1894 yılında Dr. Jhokichi Takamine’nin koji üretimi amacıyla *Aspergillus oryzae*’den bir enzim preparatı elde etmesiyle başlamıştır.

1897 yılında Alman Buchner kardeşlerin, maya hücrelerinden alkolik fermentasyonu katalize eden enzimleri saflaştırmasıyla enzimlerin hücre dışında da aktivite gösterebilecekleri kanıtlanmıştır. Enzimlerin saf ve kristal halde elde edilmeleri ise uzun zaman almıştır.

1897’de Büchner, maya hücrelerinden bazı enzimleri ayırmayı başarak, yeni bir araştırma alanı açmıştır.

1904 yılında Harden ve Young, düşük molekül ağırlığına sahip, ısıya dayanıklı bir molekül olan Koenzim A ya da diğer adıyla Nikotinamidadenin (NAD), fermentasyon enzimlerinin aktivite göstermeleri için gerekli olduğunu bulmuştur.

1915'te Rohm, lipaz ve proteaz enzimlerinin çamaşır yıkama sularına katılarak çok etken bir temizleyici olarak kullanılacağını saptamıştır.

1926 yılında A.B.D'nin Cornell Üniversitesi profesörlerinden James B. Summer, ilk kez üreaz enzimlerinin kristallerini elde ederek, molekülünün büyük bir kısmının protein yapısında olduğunu göstermiştir.

1930'da ise Rockefeller Enstitüsünde Northrop, Kunitz, Herriott ve Amson gibi bilginlerden oluşan araştırma grubu, sırası ile pepsin, tripsin, kimotripsin ve karboksipeptidaz enzimlerini kristalize etmeye başarmışlardır.

1930 yılında Nurthrop, pepsini saf ve kristal halde elde etmiş, yapısının protein olduğunu kanıtlamıştır.

1934 yılında Herriot ve Nurthrop, bazı fonksiyonel grupları bloke ettikleri zaman enzim aktivitesinin kaybolduğunu tespit etmişlerdir.

1940 yılından sonra enzim araştırmaları, inanılmaz bir hızla ilerleyerek birçok yeni enzimin bulunmasına neden olmuştur (Palmer, 1981). 1930 yılında 80 adet enzim tanımlanırken, 1968'lerde bu rakam 1300'e, 1982'de ise 2000'e yükselmiştir. Bugün 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. Enzimlerle ilgili çalışmalar hızla devam etmektedir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Fungus İzolatları

Enzim aktiviteleri incelenmek üzere, Demirel ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan “Türkiye’de bulunan tuzlaların mikrofunguslarının belirlenmesi” başlıklı çalışmadan izole edilen fungus izolatları kullanılmıştır. Fungus izolatları Çizelge 3.1’de gösterilmektedir.

**Çizelge 3.1.** Test edilen fungus izolatları

İzolat Sayısı	Fungus İzolatları
19	<i>Penicillium chrysogenum</i>
9	<i>Aspergillus versicolor</i>
8	<i>Aspergillus flavipes</i>
8	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>
7	<i>Penicillium griseofulvum</i>
6	<i>Penicillium implicatum</i>
5	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>
5	<i>Penicillium corylophyllum</i>
4	<i>Mycelia sterilia</i>
3	<i>Alternaria alternata</i>
3	<i>Aspergillus sydowii</i>
3	<i>Beauveria alba</i>
3	<i>Eurotium amstelodami</i>
3	<i>Penicillium puberulum</i>
3	<i>Ulocladium atrum</i>
2	<i>Aspergillus sparsus</i>
2	<i>Penicillium citreonigrum</i>
2	<i>Penicillium waksmanii</i>
2	<i>Stachybotrys chartarum</i>
1	<i>Aspergillus niger</i>
1	<i>Aspergillus parasiticus</i>
1	<i>Aspergillus wentii</i>
1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
1	<i>Eurotium herbarium</i>
1	<i>Penicillium decumbens</i>
1	<i>Penicillium viridicatum</i>
<b>Toplam 104</b>	

Fungus izolatları Malt Ekstrakt Agarlı (MEA) yatık tüplerde 25 °C'de 7 gün inkübasyondan sonra +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Gerektiği zamanda aktive edilerek kullanılmıştır.

### 3.1.2. Besiyerler

#### 3.1.2.1. Malt Ekstrat Agar (MEA) (Fluka)

Malt Extract	30 g
Mycological Pepton	5 g
Agar	15 g
Distile Su	1000 ml

Ticari besiyerinden 50 g/l oranında tartılarak distile suda çözündürülmüştür, 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

#### 3.1.2.2. Potato Dextrose Agar (PDA) (Fluka)

Potato Extract	4 g
Dextrose	20 g
Agar	1,5 g
Distile Su	1000 ml

Ticari besiyerinden 39 g/l oranında tartılarak distile suda çözündürülmüştür, 121°C 'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

#### 3.1.2.3. Amilaz Besiyeri

Çözünebilir Nişasta	10 g
Yeast Nitrogen Base (YNB)	6,7 g
Bile Salt (Safra Tuzu)	1,5 g
Agar	20 g
Distile Su	1000 ml

Nişasta distile su içinde kaynatılarak çözüdüürülmüş, üzerine agar ve safra tuzu eklenerek, 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. 50-60°C'ye kadar soğutulduktan sonra, 10 ml filtre sterilizasyonu yapılmış, 10 kat konsantre YNB'den son konsantrasyon %0,67 olacak şekilde eklenip karıştırılmıştır. Petrilere aseptik koşullarda dökülüp katılaşmaya bırakılmıştır.

Amilaz besiyerine NaCl ilavesi ile istenen oranlarda tuz içeren besiyerleri hazırlanmıştır (%2,5; % 5; %10; %15).

#### 3.1.2.4. Lipaz Besiyeri

Pepton	5 g
Maya Ekstraktı	3 g
Agar	10 g
Distile Su	1000 ml

Besiyeri bileşenleri distile su içinde çözüdüürülmüş, 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilerek 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra, daha önceden filtre sterilizasyonu yapılmış tributirinden (Sigma) %0,1 oranında eklenmiştir. 8 dakika vortekste homojenize edilmiş, tüplere aseptik olarak 7 ml dağıtıp dik durumda katılaşması sağlanmıştır.

Lipaz besiyerine NaCl ilavesi ile istenen oranlarda tuz içeren besiyerleri hazırlanmıştır (%2,5; % 5; %10; %15).

#### 3.1.2.5. Proteaz Besiyeri

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
KCl	0,5 g
Agar	16 g
Musluk Suyu	1000 ml

Süt tozu çözeltisi hariç, diğer tüm bileşenler musluk suyu içinde çözündürülüp, 121°C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika otoklavda sterilize edilir. 60°C'ye kadar soğuduktan sonra üzerine son konsantrasyonu %4,8 olacak şekilde distile su ile hazırlanmış ve aynı şartlarda sterilize edilmiş yağsız sütün çözeltisi aseptik olarak ilave edilir. Bu karışım steril test tüplerine 15'er ml olarak dağıtılıp, dik olarak katılaşmasına izin verilir.

Çalışmamızda yağsız sütün yerine yağsız süt kullanılmıştır. Piyasada satılan UHT yağsız sütün kuru madde ağırlığı dikkate alınarak yağsız sütün karşılık gelen miktarı hesaplanarak besiyerine ilave edilmiştir.

Proteaz besiyerine NaCl ilavesi ile istenen oranlarda tuz içeren besiyerleri hazırlanmıştır (%2,5; % 5; %10; %15).

### **3.1.3. Çözeltiler**

#### **3.1.3.1. İyot Çözeltisi**

300 ml distile suya 1 g I<sub>2</sub> ve 2 g KI ilave edilerek iyot çözeltisi elde edilmiştir.

#### **3.1.3.2. Triton-X 100**

1000 ml distile su içerisine 1 ml triton-X 100 ilave edilerek oluşan karışım homojenize edilir. 5 ml tüplere aktarılarak 121°C'de 1,5 atm basınç altında 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.



## **3.2. Metot**

### **3.2.1. Spor Süspansiyonun Hazırlanması**

Enzim aktivitesi belirlenecek küf izolatlarına ait bir spor süspansiyonunun hazırlanması gerekmektedir. Bunun için petri içerisinde PDA (Potato Dextrose Agar) besiyerinde geliştirilmiş ve sporlanması için 7 gün 26-28°C’de inkübe edilmiş küf kültürlerinden; bir agar delici vasıtasıyla steril şartlarda 2 agar dilimi kesilmiş ve yine steril koşullarda, içerisinde 5ml triton-X 100’lü distile su bulunan steril deney tüpleri içerisine aseptik olarak aktarılıp bir vorteks yardımıyla hazırlanan spor süspansiyonu homojenize edilmiştir (Campenhout, 1995).

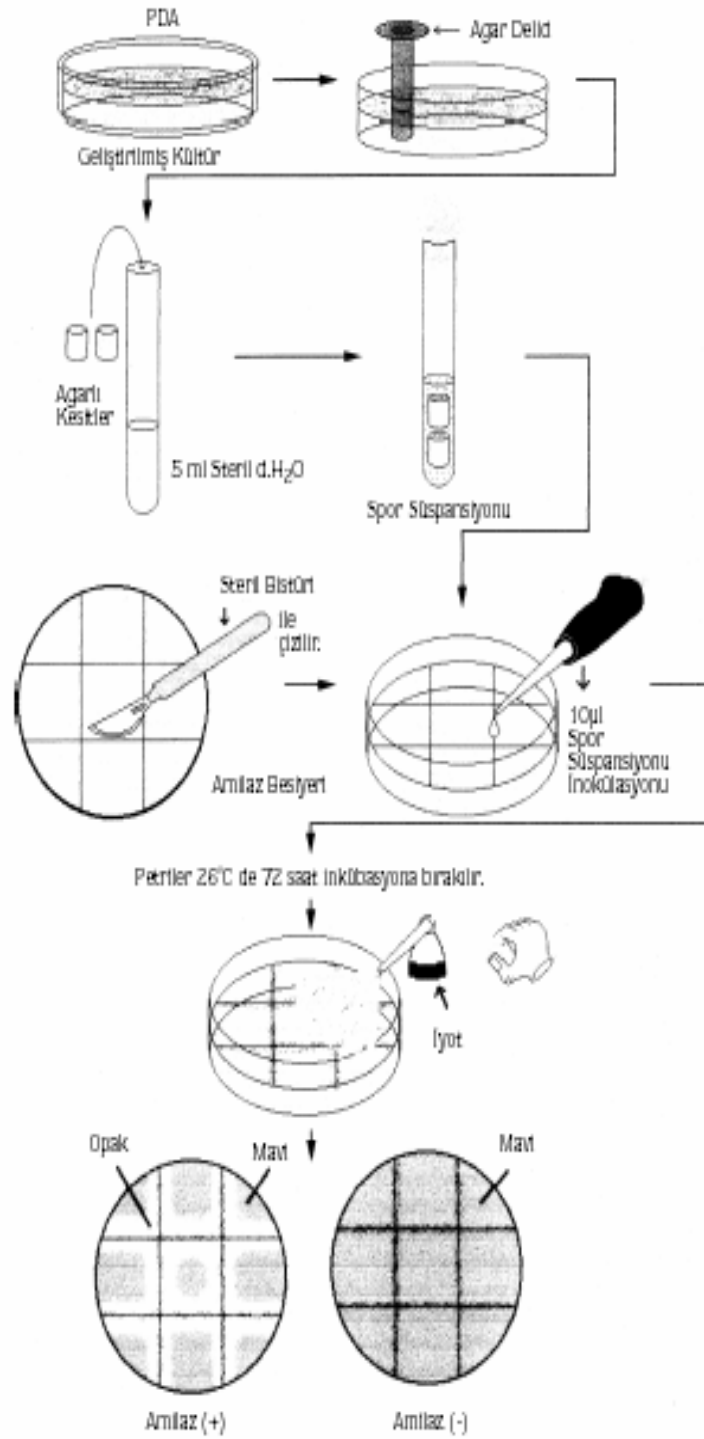
### **3.2.2. İzolatların Enzim Aktiviteleri Açısından Taranması**

#### **3.2.2.1. Amilaz Aktivitesi Açısından Tarama**

Petride katılaştıran amilaz besiyerleri aseptik koşullarda steril bistiği 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. İnkübasyon sonrası alınan petrilerin üzerine %0,3’lük iyot püskürtülmüştür.

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 ürediği alanın etrafı bulanık beyaz renkte, diğer alan mavi renkte kalmaktadır. Eğer amilaz sentezlenmemişse petrinin tamamı mavi renkte görülmektedir (Şekil 3.1.).

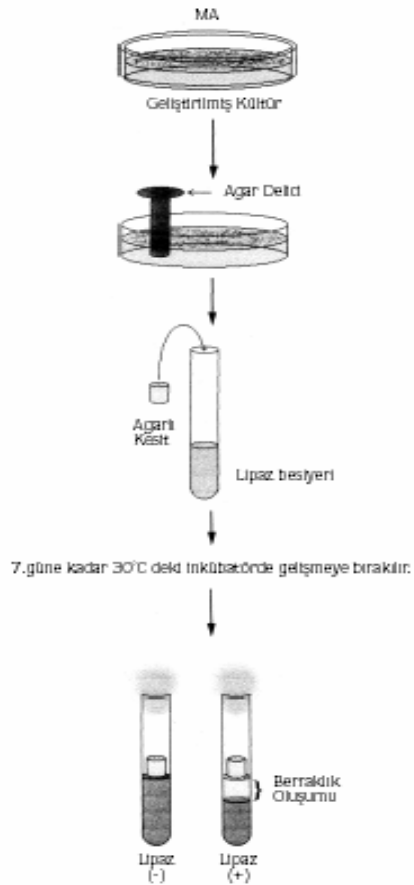
Amilaz aktivitesi yüksek, düşük ve aktivite yok olmak üzere 3 şekilde değerlendirilmiştir. Çizgi boyunca belirgin zon oluşturanlar yüksek aktiviteli, sadece üreme olan alanda zon oluşturan düşük aktiviteli olarak değerlendirilmiştir.



**Şekil 3.1.**Amilaz aktivitesinin analiz basamakları  
(Difüzyon tekniği ile zon kontrolü yöntemi)

### 3.2.2.2. Lipaz Aktivitesi Açısından Tarama

Malt Agar (MA)'lı petride 30°C'de 7 gün üretilmiş test kültürlerinden steril mantar delici ile agarlı parçalar kesilip, hazırlanan tributirinli besiyerinin üzerine bırakılmıştır. Tekrar 30°C'de 10 güne kadar inkübe edilerek, berraklık durumuna göre değerlendirilmiştir. Sonuçta lipaz (+) ise, besiyerinde bir berraklık meydana gelmekte, lipaz (-) ise besiyerinde hiçbir değişiklik olmamaktadır (Şekil 3.2.). Lipolitik aktivitenin değerlendirilmesi için berraklığın derinliği 3. günden itibaren kumpas ile ölçülmüş ve bu işlem 10. güne kadar sürdürülmüştür (Sztajer et al., 1988). Herbir örnek için üç paralel olarak hazırlanmıştır ve bu üç tüpün ortalaması alınarak sonuçları değerlendirilmiştir.

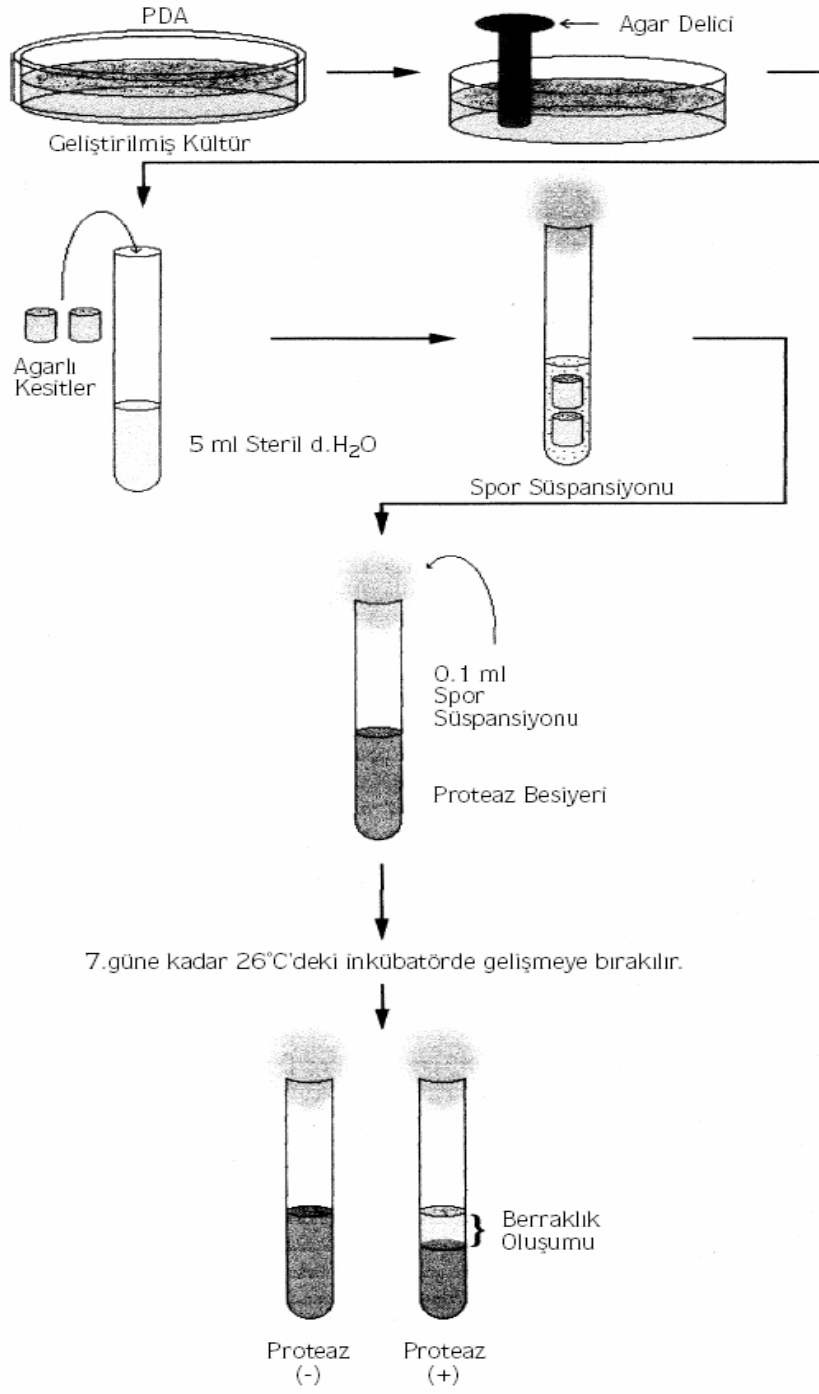


**Şekil 3.2.** Lipaz aktivitesinin analiz basamakları  
(Derin kültür ile opasite kapasitesi yöntemi)

### 3.2.2.3. Proteaz Aktivitesi Açısından Tarama

Kültürün enzim üretim yeteneğini test edebilmek için bu besiyerinin üzerine spor süspansiyonu hazırlanarak eklenmiştir. Spor süspansiyonu; PDA besiyerinde 3 nokta ekimiyle inokule edilip, geliştirilen saf kültürlerden 1 cm çapındaki agar delici ile 2 izolat agarlı blok kesilip, 5ml'lik steril triton-x 100 destile su içine atılmış ve aseptik koşullarda homojenize edilerek hazırlanmıştır.

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 3.3.). 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.



**Şekil 3.3.** Proteaz aktivitesinin analiz basamakları  
(Derin kültür ile opasite kapasitesi yöntemi)

### **3.2.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Tuz Konsantrasyonunun Etkisi**

Enzim aktivitesi taranmasında kullanılan besiyerlerine tuz içermeyen; %2,5; %5; %10 ve %15 oranında tuz ilavesiyle hazırlanan tuzlu besiyerleri kullanılarak aynı yöntemler uygulanmıştır. Aktivite derecesinin belirlenmesinde kullanılan ölçümler esas alınarak tuz konsantrasyonlarının aktivite üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1. İzolatların Enzim Aktivitesi Açısından Taranması

#### 4.1.1. Amilaz Aktivitesi

104 mikrofungus izolatının amilaz aktivitesi açısından taranmasına ilişkin sonuçlar Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Amilaz aktivitesinin tarama sonuçları

İzolat Kodu	Mikrofungus	Yüksek Aktivite (+ +)	Düşük Aktivite (+)	Aktivite Yok (-)
3.10.3	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl			√
4.5.6	<i>A. alternata</i>			√
4.20.6	<i>A. alternata</i>		√	
<b>6.5.6</b>	<b><i>Aspergillus flavipes</i></b> (Bainier&R.Sartory) Thom&Church	√		
<b>6.5.9</b>	<b><i>A. flavipes</i></b>	√		
<b>6.10.8</b>	<b><i>A. flavipes</i></b>	√		
<b>6.20.4</b>	<b><i>A. flavipes</i></b>	√		
<b>6.25.4</b>	<b><i>A. flavipes</i></b>	√		
<b>8.5.1</b>	<b><i>A. flavipes</i></b>	√		
<b>8.15.1</b>	<b><i>A. flavipes</i></b>	√		
<b>9.10.8</b>	<b><i>A. flavipes</i></b>	√		
<b>6.10.6</b>	<b><i>A. niger</i></b> Tieghem	√		
<b>6.10.1</b>	<b><i>A. parasiticus</i></b> Speare	√		
6.15.5	<i>A. sclerotiorum</i> G.A.Huber		√	
<b>6.20.1</b>	<b><i>A. sclerotiorum</i></b>	√		
8.20.3	<i>A. sclerotiorum</i>			√
<b>9.15.4</b>	<b><i>A. sclerotiorum</i></b>	√		
10.5.3	<i>A. sclerotiorum</i>			√
<b>6.15.6</b>	<b><i>A. sparsus</i></b> Raper&Thom	√		
<b>6.15.7</b>	<b><i>A. sparsus</i></b>	√		
<b>1.5.1</b>	<b><i>A. sydowii</i></b> (Bainier&R.Sartory) Thom&Church	√		
<b>3.25.1</b>	<b><i>A. sydowii</i></b>	√		
<b>5.2.2</b>	<b><i>A. sydowii</i></b>	√		
2.5.11	<i>A. versicolor</i> Vuillemin (Tiraboschi)			√
2.20.5	<i>A. versicolor</i>		√	
<b>2.25.6</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	√		
<b>3.5.5</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	√		
4.5.4	<i>A. versicolor</i>		√	
<b>4.10.1</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	√		
4.15.2	<i>A. versicolor</i>		√	
<b>4.20.1</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	√		
<b>6.10.5</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	√		

Çizelge 4.1. (Devam)

İzolat Kodu	Mikrofungus	Yüksek Aktivite (++)	Düşük Aktivite (+)	Aktivite Yok (-)
2.5.5	<i>A. wentii</i> Wehmer			√
4.5.5	<i>Beuvaria alba</i> (Limber) Saccas			√
10.15.3	<i>B. alba</i>			√
10.20.1	<i>B. alba</i>			√
<b>4.5.8</b>	<b><i>Cladosporium cladosporides</i></b> (Fresen) C.A de Uries	√		
1.10.1	<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin			√
5.10.1	<i>E. amstelodami</i>			√
5.10.2	<i>E. amstelodami</i>			√
<b>3.10.2</b>	<b><i>E. herbarium</i></b> F.H Wigg	√		
4.5.2	<i>Mycelia sterilia</i>			√
4.10.3	<i>M.S</i>		√	
10.5.2	<i>M.S</i>			√
10.10.4	<i>M.S</i>			√
<b>3.5.3</b>	<b><i>Penicillium aurantiogriseum</i></b> Dierckx	√		
<b>3.10.1</b>	<b><i>P. aurantiogriseum</i></b>	√		
<b>3.10.2</b>	<b><i>P. aurantiogriseum</i></b>	√		
<b>3.10.8</b>	<b><i>P. aurantiogriseum</i></b>	√		
<b>3.15.1</b>	<b><i>P. aurantiogriseum</i></b>	√		
<b>3.20.1</b>	<b><i>P. aurantiogriseum</i></b>	√		
<b>4.20.2</b>	<b><i>P. aurantiogriseum</i></b>	√		
<b>7.5.2</b>	<b><i>P. aurantiogriseum</i></b>	√		
<b>2.5.3</b>	<b><i>P. chrysogenum</i></b> Thom	√		
<b>2.10.3</b>	<b><i>P. chrysogenum</i></b>	√		
<b>2.15.3</b>	<b><i>P. chrysogenum</i></b>	√		
2.20.2	<i>P. chrysogenum</i>			√
<b>2.25.4</b>	<b><i>P. chrysogenum</i></b>	√		
<b>2.25.5</b>	<b><i>P. chrysogenum</i></b>	√		
<b>3.10.4</b>	<b><i>P. chrysogenum</i></b>	√		
5.5.2	<i>P. chrysogenum</i>			√
<b>6.15.4</b>	<b><i>P. chrysogenum</i></b>	√		
7.5.5	<i>P. chrysogenum</i>		√	
<b>8.10.1</b>	<b><i>P. chrysogenum</i></b>	√		
8.15.2	<i>P. chrysogenum</i>		√	
8.20.1	<i>P. chrysogenum</i>			√
8.20.5	<i>P. chrysogenum</i>		√	
8.20.6	<i>P. chrysogenum</i>		√	
<b>9.10.1</b>	<b><i>P. chrysogenum</i></b>	√		
<b>9.15.1</b>	<b><i>P. chrysogenum</i></b>	√		
9.15.2	<i>P. chrysogenum</i>		√	
<b>9.20.4</b>	<b><i>P. chrysogenum</i></b>	√		
3.10.2	<i>P. citreonigrum</i> Dierckx		√	
<b>6.5.5</b>	<b><i>P. citreonigrum</i></b>	√		
<b>6.5.4</b>	<b><i>P. corylophylum</i></b> Dierckx	√		
6.10.2	<i>P. corylophylum</i>		√	
6.20.6	<i>P. corylophylum</i>		√	
9.10.6	<i>P. corylophylum</i>			√
9.15.6	<i>P. corylophylum</i>			√
<b>9.10.2</b>	<b><i>P. decumbens</i></b> Thom	√		
2.5.7	<i>P. implicatum</i> Biourge			√
2.5.8	<i>P. implicatum</i>		√	
3.5.4	<i>P. implicatum</i>			√

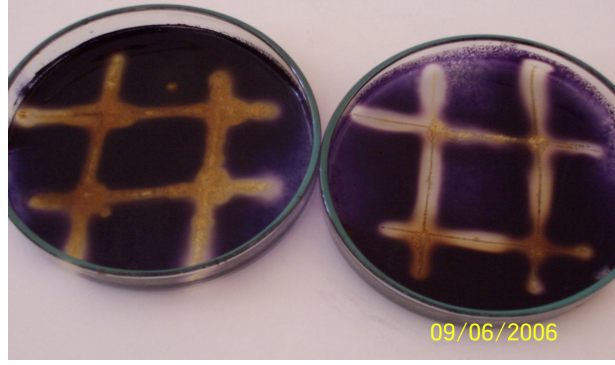


Çizelge 4.1. (Devam)

İzolot Kodu	Mikrofungus	Yüksek Aktivite (+ +)	Düşük Aktivite (+)	Aktivite Yok (-)
4.10.2	<i>P. implicatum</i>			√
6.5.2	<i>P. implicatum</i>			√
10.5.5	<i>P. implicatum</i>			√
2.25.2	<i>P. griseofulvum</i> Dierckx		√	
<b>3.5.5</b>	<b><i>P. griseofulvum</i></b>	√		
3.20.1	<i>P. griseofulvum</i>			√
4.5.3	<i>P. griseofulvum</i>		√	
<b>4.20.3</b>	<b><i>P. griseofulvum</i></b>	√		
6.15.2	<i>P. griseofulvum</i>			√
6.25.3	<i>P. griseofulvum</i>		√	
<b>8.20.2</b>	<b><i>P. puberulum</i></b> Bainier	√		
<b>9.20.1</b>	<b><i>P. puberulum</i></b>	√		
<b>10.10.1</b>	<b><i>P. puberulum</i></b>	√		
<b>9.25.1</b>	<b><i>P. viridicatum</i></b> Westling	√		
9.15.1	<i>P. waksmanii</i> K.M. Zalessky		√	
9.15.8	<i>P. waksmanii</i>		√	
<b>2.5.12</b>	<b><i>Stachybotrys chartarum</i></b> (Ehrenberg) S. Hughes	√		
3.5.7	<i>S. chartarum</i>			√
3.5.1	<i>Ulocladium atrum</i> Preuss			√
4.10.4	<i>U. atrum</i>			√
10.10.2	<i>U. atrum</i>			√
<b>Toplam</b>	<b>104</b>	<b>53</b>	<b>20</b>	<b>31</b>

İnkübasyonu takiben iyotla muamele sonucu şeffaf zon verenler zon alanına göre (++) (Şekil 4.1) ya da (+) (Şekil 4.2), mavi rengi koruyanlar (-) (Şekil 4.3) olarak değerlendirilmiştir.

Tüm izolatların %51'i (n=53) yüksek aktivite, %19'u (n=20) düşük aktivite gösterirken, %30'u (n=31) ise aktivite göstermemiştir (Şekil 4.4; n=104). Genus düzeyinde değerlendirildiğinde; *Aspergillus* genusuna ait izolatların %67'si yüksek aktivite, %15'i düşük aktivite gösterirken, %18'i aktivite göstermemiştir (Şekil 4.5). *Penicillium* genusuna ait izolatların %52'si yüksek aktivite, %22'si düşük aktivite gösterirken, %26'sı aktivite göstermemiştir (Şekil 4.6). *C. cladosporioides* ve *S. chartarum* türlerinin izolatlarında yüksek aktivite gözlenmiştir. Diğer *A. alternata*, *B. alba* ve *U. atrum* izolatlarında ise aktivite gözlenmemiştir.



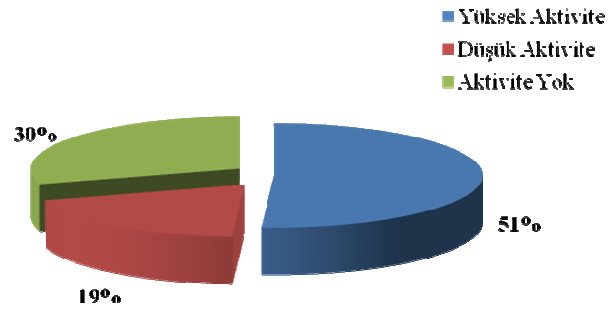
Şekil 4.1. Yüksek aktivite gösteren *A. parasiticus*'a ait görüntü



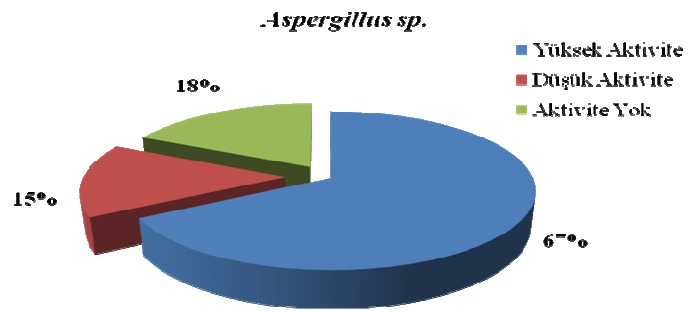
Şekil 4.2. Düşük aktivite gösteren *A. versicolor*'a ait görüntü



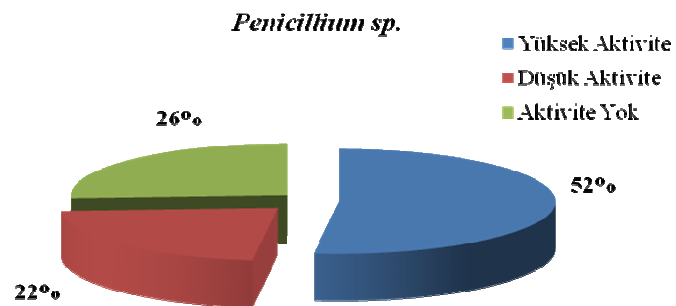
Şekil 4.3. Aktivite göstermeyen *P. implicatum*'a ait görüntü



Şekil 4.4. Tüm izolatların amilaz aktivitesi açısından dağılımı



Şekil 4.5. *Aspergillus* genusuna ait izolatların amilaz aktivitesi açısından dağılımı



Şekil 4.6. *Penicillium* genusuna ait izolatların amilaz aktivitesi açısından dağılımı

#### 4.1.2. Lipaz Aktivitesi

104 mikrofungus izolatının lipaz aktivitesi açısından taramasına ilişkin sonuçlar Çizelge 4.3.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Lipaz aktivitesinin tarama sonuçları

İzolat Kodu	Mikrofungus	Derinlik(mm)	Değerlendirme
3.10.3	<i>Alternaria alternata</i>	13	-
4.5.6	<i>A. alternata</i>	11	-
4.20.6	<i>A. alternata</i>	13	-
6.5.6	<i>Aspergillus flavipes</i>	12	-
6.5.9	<i>A. flavipes</i>	15	-
<b>6.10.8</b>	<b><i>A. flavipes</i></b>	<b>22</b>	+
6.20.4	<i>A. flavipes</i>	14	-
6.25.4	<i>A. flavipes</i>	10	-
8.5.2	<i>A. flavipes</i>	13	-
8.15.1	<i>A. flavipes</i>	14	-
<b>9.10.8</b>	<b><i>A. flavipes</i></b>	<b>22</b>	+
6.10.6	<i>A. niger</i>	10	-
<b>6.10.1</b>	<b><i>A. parasiticus</i></b>	<b>25</b>	+
<b>6.15.5</b>	<b><i>A. sclerotiorum</i></b>	<b>22</b>	+
<b>6.20.1</b>	<b><i>A. sclerotiorum</i></b>	<b>23</b>	+
8.20.3	<i>A. sclerotiorum</i>	9	-
<b>9.15.4</b>	<b><i>A. sclerotiorum</i></b>	<b>22</b>	+
<b>10.5.3</b>	<b><i>A. sclerotiorum</i></b>	<b>20</b>	+
6.15.6	<i>A. sparsus</i>	14	-
6.15.7	<i>A. sparsus</i>	13	-
<b>1.5.1</b>	<b><i>A. sydowii</i></b>	<b>23</b>	+
<b>3.25.1</b>	<b><i>A. sydowii</i></b>	<b>23</b>	+
<b>5.2.2</b>	<b><i>A. sydowii</i></b>	<b>25</b>	+
<b>2.5.11</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	<b>24</b>	+
<b>2.20.5</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	<b>22</b>	+
<b>2.25.6</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	<b>25</b>	+
<b>3.5.5</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	<b>26</b>	+
4.5.4	<i>A. versicolor</i>	19	-
<b>4.10.1</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	<b>21</b>	+
<b>4.15.2</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	<b>27</b>	+
<b>4.20.1</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	<b>27</b>	+
<b>6.10.5</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	<b>23</b>	+
2.5.5	<i>A. wentii</i>	12	-
4.5.5	<i>Beauveria alba</i>	0	-
10.15.3	<i>B. alba</i>	5	-
10.20.1	<i>B. alba</i>	3	-
4.5.8	<i>C. cladosporioides</i>	12	-
1.10.1	<i>Eurotium amstelodami</i>	17	-
5.10.1	<i>E. amstelodami</i>	16	-
5.10.2	<i>E. amstelodami</i>	17	-
<b>3.10.2</b>	<b><i>E. herbarium</i></b>	<b>26</b>	+
4.5.2	<i>Mycelia sterilia</i>	15	-
4.10.3	<i>M.S</i>	12	-
10.5.2	<i>M.S</i>	13	-

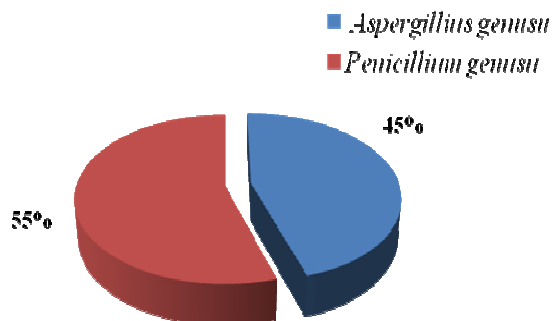
Çizelge 4.2. (Devam)

İzolat Kodu	Mikrofungus	Derinlik(mm)	Değerlendirme
10.10.4	<i>M.S</i>	15	-
3.5.3	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	24	+
3.10.1	<i>P. aurantiogriseum</i>	24	+
3.10.2	<i>P. aurantiogriseum</i>	26	+
3.10.8	<i>P. aurantiogriseum</i>	26	+
3.15.1	<i>P. aurantiogriseum</i>	25	+
3.20.1	<i>P. aurantiogriseum</i>	24	+
4.20.2	<i>P. aurantiogriseum</i>	23	+
7.5.2	<i>P. aurantiogriseum</i>	26	+
2.5.3	<i>P. chrysogenum</i>	24	+
2.10.3	<i>P. chrysogenum</i>	28	+
2.15.3	<i>P. chrysogenum</i>	22	+
2.20.2	<i>P. chrysogenum</i>	17	-
2.25.4	<i>P. chrysogenum</i>	19	-
2.25.5	<i>P. chrysogenum</i>	16	-
3.10.4	<i>P. chrysogenum</i>	22	+
5.5.2	<i>P. chrysogenum</i>	12	-
6.15.4	<i>P. chrysogenum</i>	15	-
7.5.5	<i>P. chrysogenum</i>	13	-
8.10.1	<i>P. chrysogenum</i>	9	-
8.15.2	<i>P. chrysogenum</i>	11	-
8.20.1	<i>P. chrysogenum</i>	12	-
8.20.5	<i>P. chrysogenum</i>	12	-
8.20.6	<i>P. chrysogenum</i>	12	-
9.10.1	<i>P. chrysogenum</i>	21	+
9.15.1	<i>P. chrysogenum</i>	13	-
9.15.2	<i>P. chrysogenum</i>	14	-
9.20.4	<i>P. chrysogenum</i>	13	-
3.10.2	<i>P. citreonigrum</i>	16	-
6.5.5	<i>P. citreonigrum</i>	9	-
6.5.4	<i>P. corylophyllum</i>	14	-
6.10.2	<i>P. corylophyllum</i>	16	-
6.20.6	<i>P. corylophyllum</i>	17	-
9.10.6	<i>P. corylophyllum</i>	21	+
9.15.6	<i>P. corylophyllum</i>	25	+
9.10.2	<i>P. decumbens</i>	20	+
2.5.7	<i>P. implicatum</i>	21	+
2.5.8	<i>P. implicatum</i>	21	+
3.5.4	<i>P. implicatum</i>	21	+
4.10.2	<i>P. implicatum</i>	21	+
6.5.2	<i>P. implicatum</i>	16	-
10.5.5	<i>P. implicatum</i>	8	-
2.25.2	<i>P. griseofulvum</i>	16	-
3.5.5	<i>P. griseofulvum</i>	17	-
3.20.1	<i>P. griseofulvum</i>	16	-
4.5.3	<i>P. griseofulvum</i>	17	-
4.20.3	<i>P. griseofulvum</i>	15	-
6.15.2	<i>P. griseofulvum</i>	14	-
6.25.3	<i>P. griseofulvum</i>	17	-
8.20.2	<i>P. puberulum</i>	11	-
9.20.1	<i>P. puberulum</i>	14	-
10.10.1	<i>P. puberulum</i>	15	-
9.25.1	<i>P. viridicatum</i>	23	+
9.15.1	<i>P. waksmanii</i>	21	+
9.15.8	<i>P. waksmanii</i>	21	+

Çizelge 4.2. (Devam)

İzolat Kodu	Mikrofungus	Derinlik(mm)	Değerlendirme
2.5.12	<i>Stachybotrys chartarum</i>	12	-
3.5.7	<i>S. chartarum</i>	10	-
3.5.1	<i>Ulocladium atrum</i>	7	-
4.10.3	<i>U. atrum</i>	10	-
10.10.2	<i>U. atrum</i>	10	-
<b>Toplam</b>	<b>104</b>		

7 günlük şeffaf zonu derinlik değerleri 20 mm ve üzeri olanları lipaz pozitif (+) olarak değerlendirilmiştir.

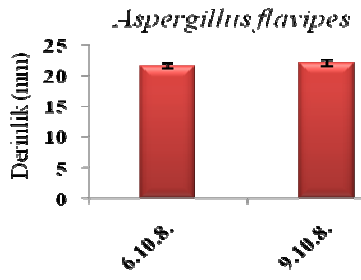


Şekil 4.7. Genus düzeyinde lipaz aktivite gösteren izolatların dağılımı

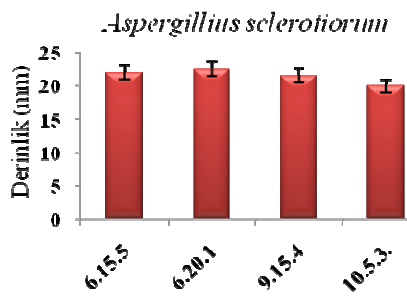
104 mikrofungus izolatından 43'ü (%41) lipaz aktivitesi gösterirken, 61'i (%59) aktivite göstermemiştir (Çizelge 4.2). Genus düzeyinde değerlendirildiğinde ise en fazla *Penicillium* genusuna ait izolatların aktivite gösterdiği (%55), bunu *Aspergillus* genusuna ait izolatların (%45) takip ettiği görülmüştür (Şekil 4.7). *A. alternata*, *B. alba*, *C. cladosporioides*, *M.S.*, *S. chartarum*, *E. herbarium* ve *U. Atrum* türlerin izolatlarında ise lipaz aktivitesi gözlenmemiştir.

*A. sydowii* (Şekil 4.10), *P. aurantiogriseum* (Şekil 4.12) ve *P. waksmanii* (Şekil 4.16) izolatlarının tamamı lipaz aktivitesi göstermiştir.

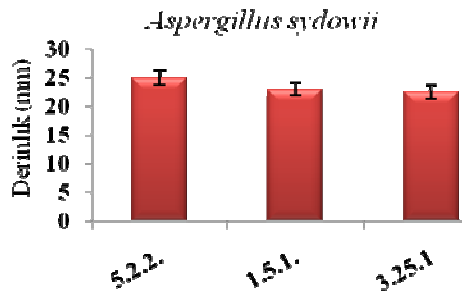
8 *A. versicolor* (Şekil 4.11), 5 *P. chrysogenum* (Şekil 4.13), 4 *A. sclerotiorum* (Şekil 4.9), 4 *P. implicatum* (Şekil 4.15), 2 *A. flavipes* (Şekil 4.8), 2 *P. corylophyllum* (Şekil 4.14) türlerine ait izolatlarında lipaz aktivitesi gözlenmiştir.



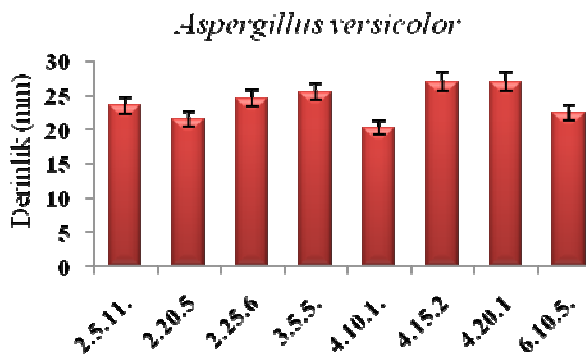
Şekil 4.8. Lipaz aktivitesi gösteren *A. flavipes* izolatları



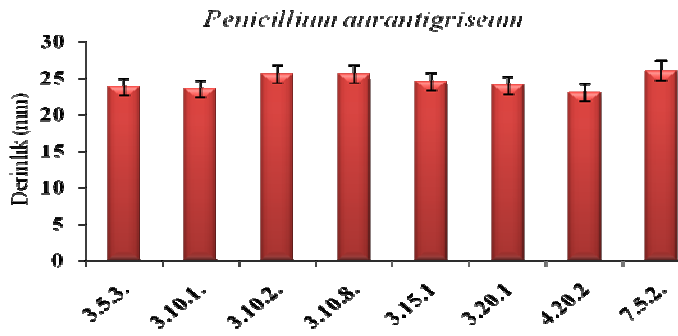
Şekil 4.9. Lipaz aktivitesi gösteren *A. sclerotiorum* izolatları



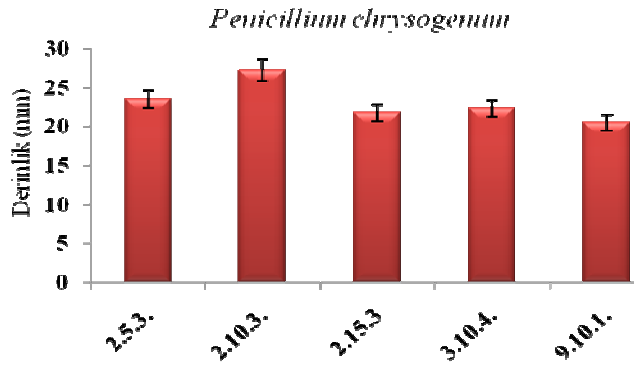
Şekil 4.10. Lipaz aktivitesi gösteren *A. sydowii* izolatları



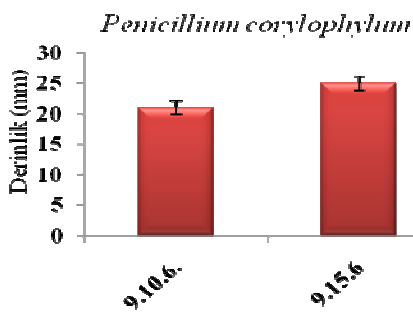
Şekil 4.11. Lipaz aktivitesi gösteren *A. versicolor* izolatları



Şekil 4.12. Lipaz aktivitesi gösteren *P. aurantiigriseum* izolatları

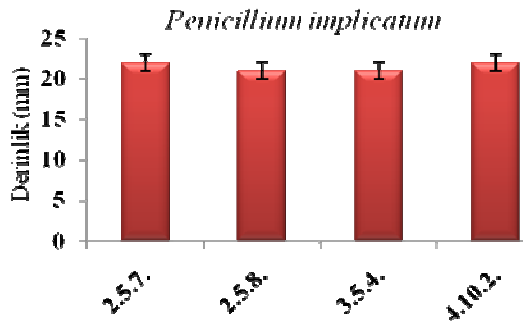


Şekil 4.13. Lipaz aktivitesi gösteren *P. chrysogenum* izolatları

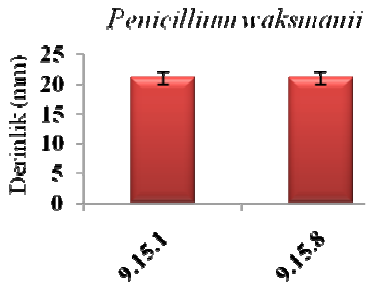


Şekil 4.14. Lipaz aktivitesi gösteren *P. corylophyllum* izolatları





Şekil 4.15. Lipaz aktivitesi gösteren *P. implicatum* izolatları



Şekil 4.16. Lipaz aktivitesi gösteren *P. waksmanii* izolatları

### 4.1.3. Proteaz Aktivitesi Sonuçları

104 mikrofungus izolatının proteaz aktivitesi açısından taranmasına ilişkin sonuçlar Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Proteaz aktivitesinin tarama sonuçları

İzolat Kodu	Mikrofungus	3.Gün	7.Gün	Ortalama	Değerlendirme
3.10.3	<i>Alternaria alternata</i>	0	6	3	-
4.5.6	<i>A. alternata</i>	0	6	3	-
<b>4.20.6</b>	<b><i>A. alternata</i></b>	3	9	<b>6</b>	+
<b>6.5.6</b>	<b><i>Aspergillus flavipes</i></b>	3	11	<b>7</b>	+
6.5.9	<i>A. flavipes</i>	0	6	3	-
6.10.8	<i>A. flavipes</i>	2	4	3	-
<b>6.20.4</b>	<b><i>A. flavipes</i></b>	4	10	<b>7</b>	+
<b>6.25.4</b>	<b><i>A. flavipes</i></b>	4	10	<b>7</b>	+
<b>8.5.1</b>	<b><i>A. flavipes</i></b>	2	8	<b>5</b>	+
<b>8.15.1</b>	<b><i>A. flavipes</i></b>	3	5	<b>4</b>	+
<b>9.10.8</b>	<b><i>A. flavipes</i></b>	6	14	<b>10</b>	+
<b>6.10.6</b>	<b><i>A. niger</i></b>	4	22	<b>13</b>	+
<b>6.10.1</b>	<b><i>A. parasiticus</i></b>	4	14	<b>9</b>	+
<b>6.15.5</b>	<b><i>A. sclerotiorum</i></b>	4	12	<b>8</b>	+
<b>6.20.1</b>	<b><i>A. sclerotiorum</i></b>	5	13	<b>9</b>	+
<b>8.20.3</b>	<b><i>A. sclerotiorum</i></b>	2	8	<b>5</b>	+
<b>9.15.4</b>	<b><i>A. sclerotiorum</i></b>	3	9	<b>6</b>	+
<b>10.5.3</b>	<b><i>A. sclerotiorum</i></b>	4	12	<b>8</b>	+
<b>6.15.6</b>	<b><i>A. sparsus</i></b>	0	8	<b>4</b>	+
<b>6.15.7</b>	<b><i>A. sparsus</i></b>	2	12	<b>7</b>	+
<b>1.5.1</b>	<b><i>A. sydowii</i></b>	0	8	<b>4</b>	+
3.25.1	<i>A. sydowii</i>	0	6	3	-
<b>5.2.2</b>	<b><i>A. sydowii</i></b>	1	7	<b>4</b>	+
<b>2.5.11</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	5	13	<b>9</b>	+
2.20.5	<i>A. versicolor</i>	0	0	0	-
2.25.6	<i>A. versicolor</i>	0	4	2	-
<b>3.5.5</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	0	10	<b>5</b>	+
<b>4.5.4</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	0	12	<b>6</b>	+
<b>4.10.1</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	2	12	<b>7</b>	+
<b>4.15.2</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	2	12	<b>7</b>	+
<b>4.20.1</b>	<b><i>A. versicolor</i></b>	0	8	<b>4</b>	+
6.10.5	<i>A. versicolor</i>	0	4	2	-
2.5.5	<i>A. wentii</i>	0	0	0	-
4.5.5	<i>Beauveria alba</i>	0	0	0	-
10.15.3	<i>B. alba</i>	0	4	2	-
10.20.1	<i>B. alba</i>	0	6	3	-
<b>4.5.8</b>	<b><i>Cladasporium cladosporioides</i></b>	3	5	<b>4</b>	+
1.10.1	<i>Eurotium amstelodami</i>	0	4	2	-
5.10.1	<i>E. amstelodami</i>	0	6	3	-
5.10.2	<i>E. amstelodami</i>	0	6	3	-
3.10.2	<i>E. herbarium</i>	0	6	3	-
<b>4.5.2</b>	<b><i>Mycelia sterilia</i></b>	3	9	<b>6</b>	+
<b>4.10.3</b>	<b><i>M.S</i></b>	3	7	<b>5</b>	+

Çizelge 4.3. (Devam)

İzolat Kodu	Mikrofungus	3.Gün	7.Gün	Ortalama	Değerlendirme
10.5.2	<i>M.S</i>	5	13	9	+
10.10.4	<i>M.S</i>	0	0	0	-
3.5.3	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	4	14	9	+
3.10.1	<i>P. aurantiogriseum</i>	2	8	5	+
3.10.2	<i>P. aurantiogriseum</i>	4	12	8	+
3.10.8	<i>P. aurantiogriseum</i>	3	11	7	+
3.15.1	<i>P. aurantiogriseum</i>	3	9	6	+
3.20.1	<i>P. aurantiogriseum</i>	4	16	10	+
4.20.2	<i>P. aurantiogriseum</i>	1	11	6	+
7.5.2	<i>P. aurantiogriseum</i>	3	11	7	+
2.5.3	<i>P. chrysogenum</i>	2	12	7	+
2.10.3	<i>P. chrysogenum</i>	1	9	5	+
2.15.3	<i>P. chrysogenum</i>	1	9	5	+
2.20.2	<i>P. chrysogenum</i>	2	12	7	+
2.25.4	<i>P. chrysogenum</i>	3	13	8	+
2.25.5	<i>P. chrysogenum</i>	1	11	6	+
3.10.4	<i>P. chrysogenum</i>	0	8	4	+
5.5.2	<i>P. chrysogenum</i>	1	11	6	+
6.15.4	<i>P. chrysogenum</i>	2	14	8	+
7.5.5	<i>P. chrysogenum</i>	0	2	1	-
8.10.1	<i>P. chrysogenum</i>	2	16	9	+
8.15.2	<i>P. chrysogenum</i>	2	16	9	+
8.20.1	<i>P. chrysogenum</i>	0	10	5	+
8.20.5	<i>P. chrysogenum</i>	1	9	5	+
8.20.6	<i>P. chrysogenum</i>	0	8	4	+
9.10.1	<i>P. chrysogenum</i>	0	8	4	+
9.15.1	<i>P. chrysogenum</i>	0	12	6	+
9.15.2	<i>P. chrysogenum</i>	2	8	5	+
9.20.4	<i>P. chrysogenum</i>	3	13	8	+
3.10.2	<i>P. citreonigrum</i>	0	4	2	-
6.5.5	<i>P. citreonigrum</i>	0	12	6	+
6.5.4	<i>P. corylophyllum</i>	4	16	10	+
6.10.2	<i>P. corylophyllum</i>	2	14	8	+
6.20.6	<i>P. corylophyllum</i>	4	12	8	+
9.10.6	<i>P. corylophyllum</i>	2	12	7	+
9.15.6	<i>P. corylophyllum</i>	6	14	10	+
9.10.2	<i>P. decumbens</i>	0	10	5	+
2.5.7	<i>P. implicatum</i>	0	6	3	-
2.5.8	<i>P. implicatum</i>	3	11	7	+
3.5.4	<i>P. implicatum</i>	1	9	5	+
4.10.2	<i>P. implicatum</i>	2	12	6	+
6.5.2	<i>P. implicatum</i>	0	12	6	+
10.5.5	<i>P. implicatum</i>	5	15	10	+
2.25.2	<i>P. griseofulvum</i>	3	13	8	+
3.5.5	<i>P. griseofulvum</i>	5	15	10	+
3.20.1	<i>P. griseofulvum</i>	6	14	10	+
4.5.3	<i>P. griseofulvum</i>	3	15	9	+
4.20.3	<i>P. griseofulvum</i>	6	16	11	+
6.15.2	<i>P. griseofulvum</i>	5	15	10	+
6.25.3	<i>P. griseofulvum</i>	6	16	11	+
8.20.2	<i>P. puberulum</i>	0	14	7	+
9.20.1	<i>P. puberulum</i>	2	14	8	+
10.10.1	<i>P. puberulum</i>	2	18	10	+
9.25.1	<i>P. viridicatum</i>	0	12	6	+

Çizelge 4.3. (Devam)

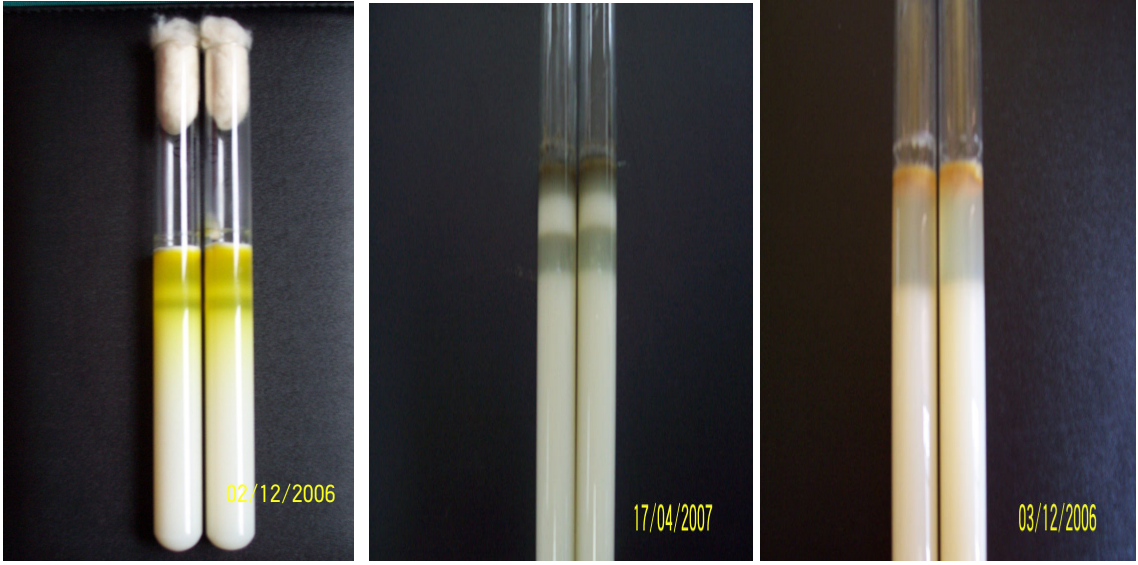
İzolot Kodu	Mikrofungus	3.Gün	7.Gün	Ortalama	Değerlendirme
9.15.1	<i>P. waksmanii</i>	1	11	6	+
9.15.8	<i>P. waksmanii</i>	1	13	7	+
2.5.12	<i>Stachybotrys chartarum</i>	3	9	6	+
3.5.7	<i>S. chartarum</i>	2	10	6	+
3.5.1	<i>Ulocladium atrum</i>	0	4	2	-
4.10.4	<i>U. atrum</i>	2	12	7	+
10.10.2	<i>U. atrum</i>	1	15	8	+
<b>Toplam</b>	<b>104</b>				

3. ve 7. günün şeffaf zonu derinlik değerleri ortalamaları 4 mm ve üzerinde olanlar proteaz (+) (Şekil 4.17), 4 mm'den küçük olanlar ise proteaz (-) (Şekil 4.18) olarak değerlendirilmiştir.

Toplam 104 mikrofungus izolatından 83'ü (%80) proteaz aktivitesi gösterirken, 21'in (%20) aktivite göstermemiştir (Çizelge 4.3). Genus düzeyinde proteaz aktivitesi değerlendirildiğinde ise; en fazla *Penicillium* genusu proteaz aktivitesine sahip olduğu (%62), bunu *Aspergillus* genusuna ait izolatların (%28) takip ettiği görülmüştür (Şekil 4.19). Sırasıyla *M.S* (%4), *S. chartarum* (%3), *U. atrum* (%2) ve *C. cladosporioides* izolatları (%1) proteaz aktivitesi göstermiştir. *Alternaria alternata*, *E. amstelodami*, *E. herbarium* ve *B. alba* izolatlarında proteaz aktivitesi gözlenmemiştir.

*A. sclerotiorum* (Şekil 4.22), *A. sparsus* (Şekil 4.23), *P. aurantiogriseum* (Şekil 4.27), *P. corylophyllum* (Şekil 4.29), *P. griseofulvum* (Şekil 4.30), *P. puberulum* (Şekil 4.32), *P. waksmanii* (Şekil 4.33) ve *S. chartarum* (Şekil 4.34) izolatlarının tamamı proteaz aktivitesi göstermiştir.

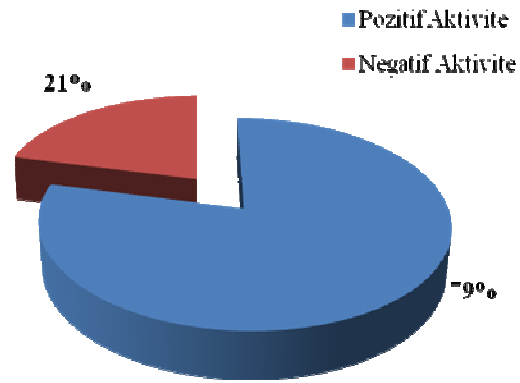
18 *P. chrysogenum* (Şekil 4.28), 6 *A. flavipes* (Şekil 4.21), 6 *A. versicolor* (Şekil 4.25), 5 *P. implicatum* (Şekil 4.31), 3 *M.S* (Şekil 4.26) ve 2 *U. atrum* (Şekil 4.35) türlerine ait izolatlarda proteaz aktivitesi gözlenmiştir.



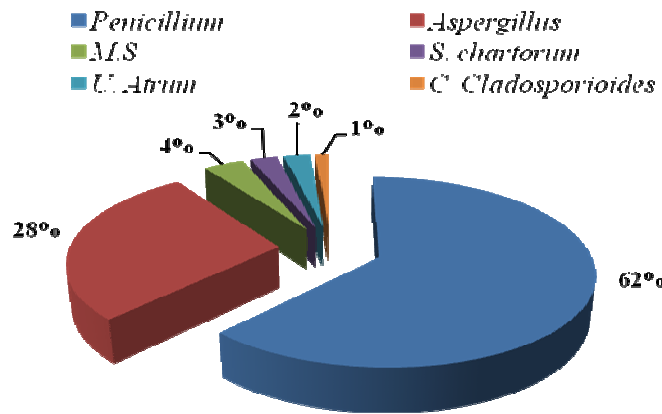
**Şekil 4.17.** Proteaz aktivitesi gösteren izolatların görüntüsü



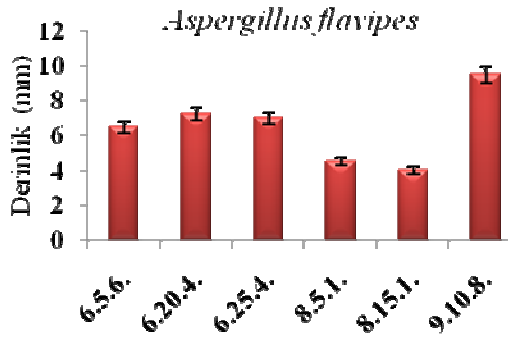
**Şekil 4.18.** Proteaz aktivitesi göstermeyen izolatın görüntüsü



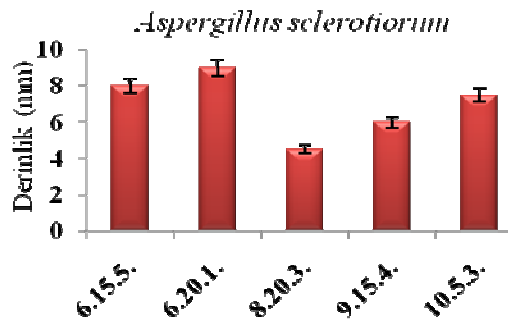
Şekil 4.19. Tüm izolatların proteaz aktivesi açısından dağılımı



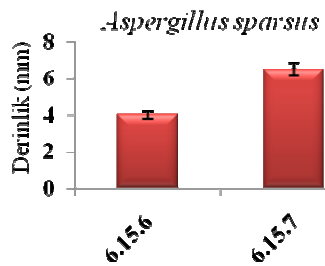
Şekil 4.20. Genus düzeyinde aktivite gösteren izolatların dağılımı



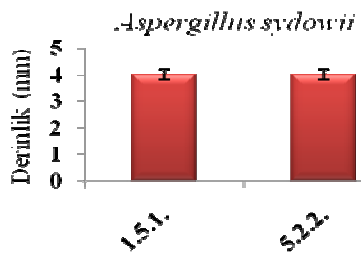
Şekil 4.21. Proteaz aktivitesi gösteren *A. flavipes* izolatları



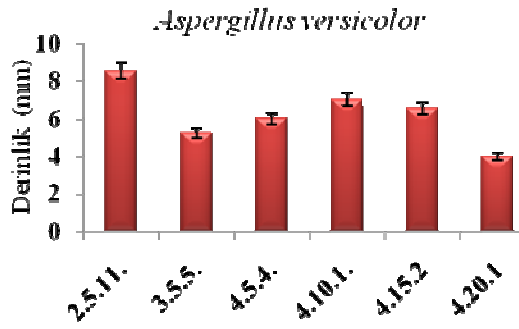
Şekil 4.22. Proteaz aktivitesi gösteren *A. sclerotiorum* izolatları



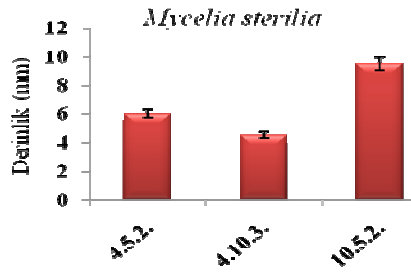
Şekil 4.23. Proteaz aktivitesi gösteren *A. sparsus* izolatları



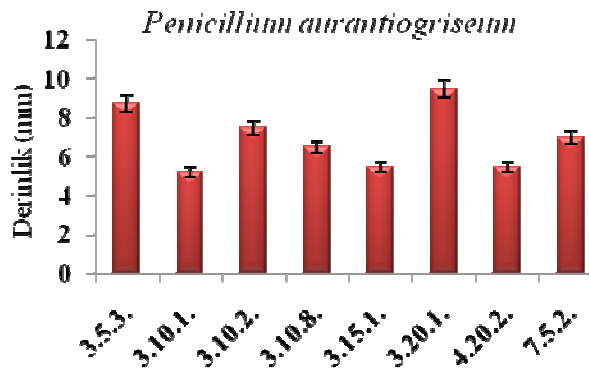
Şekil 4.24. Proteaz aktivitesi gösteren *A. sydowii* izolatları



Şekil 4.25. Proteaz aktivitesi gösteren *A. versicolor* izolatları

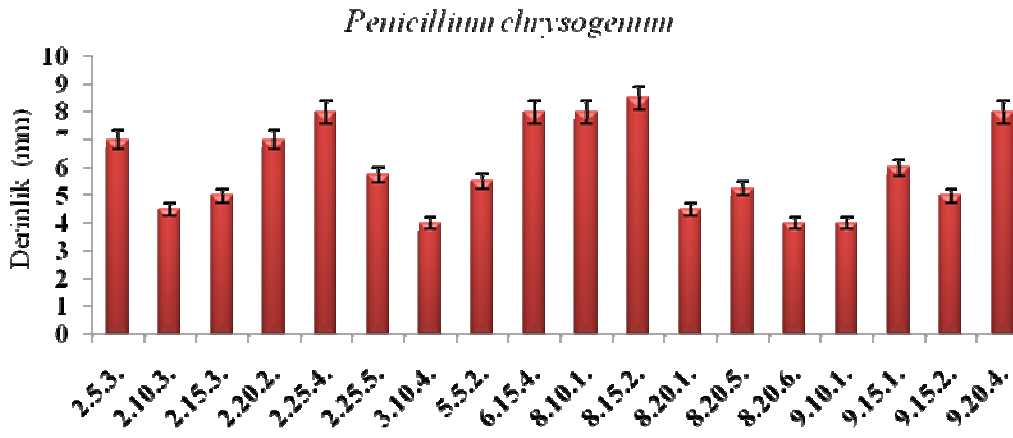


Şekil 4.26. Proteaz aktivitesi gösteren *M.S* izolatları

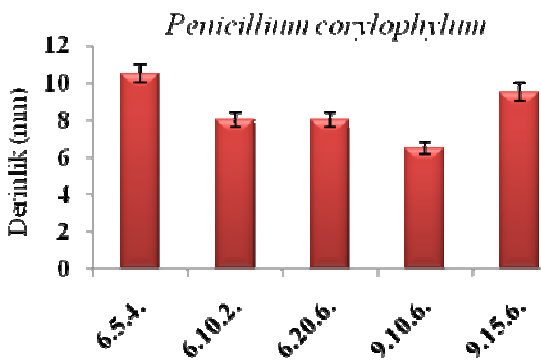


Şekil 4.27. Proteaz aktivitesi gösteren *P. aurantiogriseum* izolatları

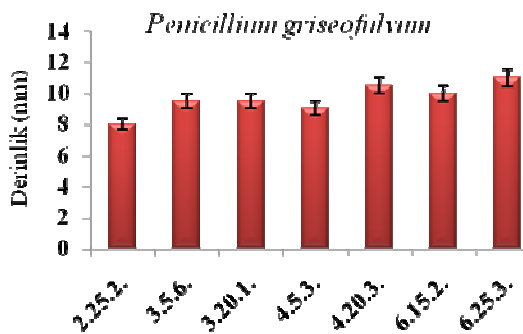




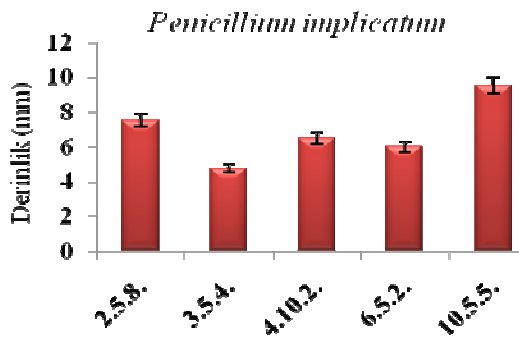
Şekil 4.28. Proteaz aktivitesi gösteren *P. chrysogenum* izolatları



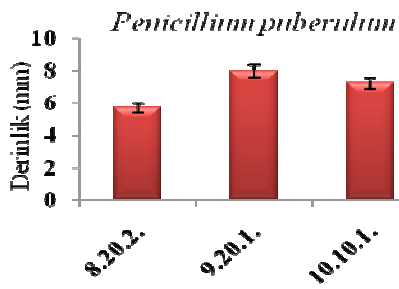
Şekil 4.29. Proteaz aktivitesi gösteren *P. corylophyllum* izolatları



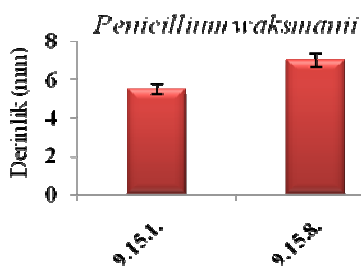
Şekil 4.30. Proteaz aktivitesi gösteren *P. griseofulvum* izolatları



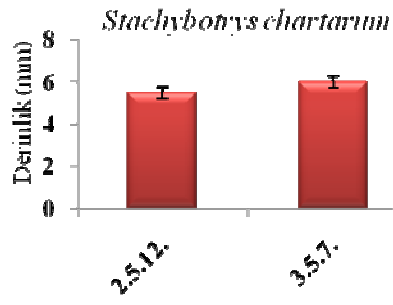
Şekil 4.31. Proteaz aktivitesi gösteren *P. implicatum* izolatları



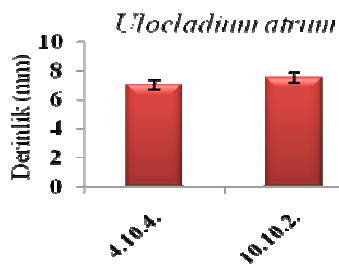
Şekil 4.32. Proteaz aktivitesi gösteren *P. puberulum* izolatları



Şekil 4.33. Proteaz aktivitesi gösteren *P. waksmanii* izolatları



Şekil 4.34. Proteaz aktivitesi gösteren *S. chartarum* izolatları



Şekil 4.35. Proteaz aktivitesi gösteren *U. atrum* izolatları

#### 4.1.4. Amilaz Aktivitesi Üzerine Tuz Konsantrasyonunun Etkisine İlişkin Sonuçlar

En iyi amilaz aktivitesi göstermiş olan 8 mikrofungus izolatının amilaz aktivitesi üzerine tuz konsantrasyonunun etkisine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

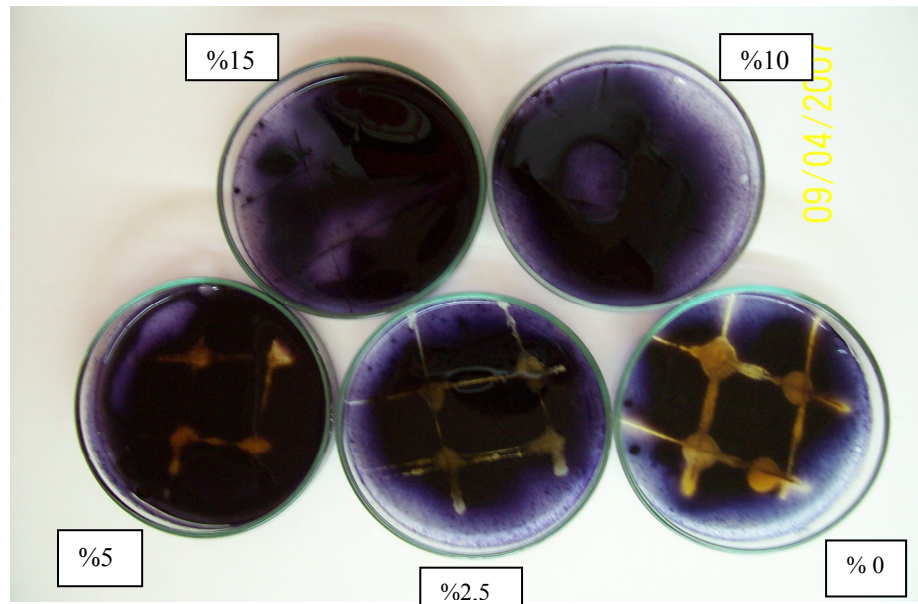
**Çizelge 4.4.** Tuz konsantrasyonunun amilaz aktivitesi üzerine etkisi

6.10.1	Yüksek Aktivite	Düşük Aktivite	Aktivite Yok
<i>A. parasiticus</i>	++	+	-
% 0	√		
% 2.5	√		
% 5		√	
%10			√
%15			√
<b>5.2.2</b>			
<i>A. sydowii</i>			
% 0	√		
% 2.5	√		
% 5	√		
%10			√
%15			√
<b>4.10.1</b>			
<i>A. versicolor</i>			
% 0	√		
% 2.5	√		
% 5	√		
%10			√
%15			√
<b>9.10.8</b>			
<i>A. flavipes</i>			
% 0	√		
% 2.5	√		
% 5	√		
%10		√	
%15			√
<b>2.10.3</b>			
<i>P. chrysogenum</i>			
% 0	√		
% 2.5	√		
% 5	√		
%10		√	
%15			√
<b>3.25.1</b>			
<i>P. viridicatum</i>			
% 0	√		
% 2.5	√		
% 5		√	
%10			√
%15			√

Çizelge 4.4. (Devam)

9.10.2 <i>P. decumbens</i>	Yüksek Aktivite ++	Düşük Aktivite +	Aktivite Yok -
% 0	√		
% 2.5		√	
% 5			√
%10			√
%15			√
7.5.2 <i>P. aurantiigriseum</i>			
% 0	√		
% 2.5	√		
% 5	√		
%10			√
%15			√

104 izolat arasından amilaz aktivitesi yüksek olan 4'er adet *Aspergillus* ve *Penicillium* genusu türleri seçilerek, amilaz aktivitesi üzerine tuz konsantrasyonu etkisi incelenmiştir. *Aspergillus* genusuna ait *A. sydowii*, *A. versicolor*, *A. flavipes* ve *Penicillium* genusuna ait *P. chrysogenum* ve *P. aurantiigriseum* (Şekil 4.7) izolatları %2,5-5 arası tuz varlığında yüksek aktivite göstermiştir. *A. flavipes* ve *P. chrysogenum* %10 tuz varlığında düşük aktivite göstermiştir. İncelenen izolatların hiçbiri %15 tuz varlığında aktivite göstermemiştir (Çizelge 4.4).



Şekil 4.36. *P. aurantiigriseum* amilaz aktivitesine tuz konsantrasyonunun etkisinin görüntüsü

#### 4.1.5. Lipaz Aktivitesi Üzerine Tuz Konsantrasyonunun Etkisine İlişkin Sonuçlar

En iyi lipaz aktivitesi göstermiş olan 7 mikrofungus izolatının lipaz aktivitesi üzerine tuz konsantrasyonunun etkisine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.4.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.5.** Tuz konsantrasyonunun lipaz aktivitesi üzerine etkisi

<b>7.5.2</b> <i>P. aurantiogriseum</i>	Derinlik (mm)	Değerlendirme	<b>5.5.2</b> <i>A. sydowii</i>	Derinlik (mm)	Değerlendirme
%0	26	+	%0	25	+
%2,5	24	+	%2,5	23	+
%5	23	+	%5	21	+
%10	21	+	%10	14	-
%15	10	-	%15	11	-
<b>3.10.8</b> <i>P. aurantiogriseum</i>			<b>4.20.1</b> <i>A. versicolor</i>		
%0	26	+	%0	27	+
%2,5	23	+	%2,5	24	+
%5	24	+	%5	23	+
%10	16	-	%10	22	+
%15	8	-	%15	7	-
<b>9.15.6</b> <i>P. corylophyllum</i>			<b>9.10.8</b> <i>A. flavipes</i>		
%0	25	+	%0	23	+
%2,5	22	+	%2,5	21	+
%5	21	+	%5	16	-
%10	13	-	%10	14	-
%15	4	-	%15	11	-
<b>2.10.3</b> <i>P. chrysogenum</i>					
%0	28	+			
%2,5	24	+			
%5	24	+			
%10	22	+			
%15	14	-			

Taranan 104 izolat arasından lipaz aktivitesi yüksek olan 3 adet *Aspergillus* ve 4 adet *Penicillium* genusundan seçilen izolatların lipaz aktivitesi üzerine tuz konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. *Aspergillus* genusuna ait *A. sydowii* ve *A. versicolor*; *Penicillium* genusuna ait *P. chrysogenum* ve her iki *P. aurantiogriseum* izolatı %2,5-5 arası tuz varlığında aktivite göstermiştir. Ayrıca *A. versicolor*, *P. chrysogenum* ve *P. aurantiogriseum* (7.5.2) %10 tuz varlığında da aktivite göstermiştir. *A. flavipes* %2,5 aktivite göstermiştir. İzolatlar %15'lik tuz varlığında aktivite göstermemiştir (Çizelge 4.5)

#### 4.1.6. Proteaz Aktivitesi Üzerine Tuz Konsantrasyonunun Etkisinin Sonuçları

En iyi proteaz aktivitesi göstermiş olan 8 mikrofungus izolatının proteaz aktivitesi üzerine tuz konsantrasyonunun etkisine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.6.'da gösterilmiştir.

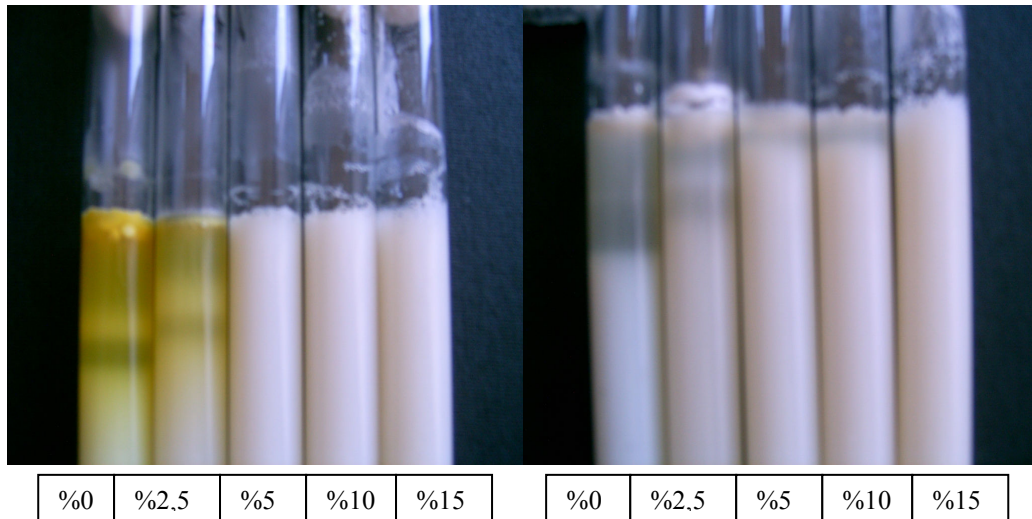
**Çizelge 4.6.** Tuz konsantrasyonunun proteaz aktivitesi üzerine etkisi

<b>6.10.6</b>	3.gün	7.gün	Ortalama	Değerlendirme
<b><i>A. niger</i></b>				
% 0	4	22	<b>13</b>	+
% 2,5	2	12	<b>7</b>	+
% 5	1	11	<b>6</b>	+
%10	0	8	<b>4</b>	+
<b>10.5.3</b>				
<b><i>A. sclerotiorum</i></b>				
% 0	4	12	<b>8</b>	+
% 2,5	2	8	<b>5</b>	+
% 5	0	6	<b>3</b>	-
%10	0	0	<b>0</b>	-
<b>9.10.8</b>				
<b><i>A. flavipes</i></b>				
% 0	6	14	<b>10</b>	+
% 2,5	3	13	<b>8</b>	+
% 5	2	10	<b>6</b>	+
%10	0	8	<b>4</b>	+
<b>8.10.1</b>				
<b><i>P. chrysogenum</i></b>				
% 0	2	16	<b>9</b>	+
% 2,5	1	11	<b>6</b>	+
% 5	0	8	<b>4</b>	+
%10	0	0	<b>0</b>	-
<b>6.25.3</b>				
<b><i>P. griseofulvum</i></b>				
% 0	6	16	<b>11</b>	+
% 2,5	2	14	<b>8</b>	+
% 5	0	14	<b>7</b>	+
%10	0	2	<b>1</b>	-
<b>10.10.1</b>				
<b><i>P. puberulum</i></b>				
% 0	2	18	<b>10</b>	+
% 2,5	1	13	<b>7</b>	+
% 5	0	10	<b>5</b>	+
%10	0	0	<b>0</b>	-

Çizelge 4.6 (devam)

<b>6.5.4</b>				
<b><i>P. corylophyllum</i></b>	3.gün	7.gün	Ortalama	Değerlendirme
% 0	4	16	<b>10</b>	+
% 2,5	2	14	<b>8</b>	+
% 5	0	12	<b>6</b>	+
%10	0	4	2	-
<b>3.20.1</b>				
<b><i>P. aurantiogriseum</i></b>				
% 0	4	16	<b>10</b>	+
% 2,5	1	9	<b>5</b>	+
% 5	0	2	1	-
%10	0	0	0	-

104 izolat arasından proteaz aktivitesi yüksek olan 3 *Aspergillus* ve 5 *Penicillium* genusuna ait türler seçilerek proteaz aktivitesi üzerine tuz konsantrasyonu etkisi incelenmiştir. *A. sclerotiorum* ve *P. aurantiogriseum* %2,5 tuz varlığında; *P. chrysogenum*, *P. griseofulvum*, *P. puberulum* ve *P. corylophyllum* izolatları %2,5-5 arası tuz varlığında; *A. niger* ve *A. flavipes* %10 tuz varlığında aktivite göstermiştir (Çizelge 4.6). Proteaz aktivitesinde ayrıca %20 tuz konsantrasyonu etkisi incelenmiştir. Fakat izolatlar %15-20 tuz varlığında aktivite göstermemiştir



**Şekil 4.37.** Proteaz aktivitesi üzerine tuz konsantrasyonu etkisine ilişkin izolatların görüntüsü



## 5. TARTIŞMA

Şimdiye kadar çeşitli habitatlardan izole edilmiş pek çok fungal izolatin metabolit profilleri özellikle enzimleri açısından taranmıştır (Pembeci, 1998; Çeltik, 1999; Topal vd., 2000; Alkan, 2003). Günümüzde ekstrem koşullarda yaşayan organizmaların ürettiği enzimler üzerine ilgi hızla artmaktadır. Yüksek sıcaklık, yüksek pH, yüksek iyonik güce sahip ortamlardan izole edilen organizmaların enzimlerinin de bu ekstrem koşullara dayanıklı olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda Tuz Gölü çevresindeki topraklardan izole edilen 104 mikrofungus izolatu ile çalışılmıştır. Demirel ve arkadaşları tarafından bu izolatların artan tuz konsantrasyonlarında gelişimi incelenmiş ve bunların halofilik değil de halotolerant olduğu ifade edilmiştir (Demirel vd., 2006). Bu nedenle çalışmamızda uygulanacak tuz konsantrasyonları %2,5; %5; %10 ve %15 olarak belirlenmiştir. Çalışmamız süresince incelenen izolatları %15 tuz konsantrasyonunda hiç üreme göstermediği görülmüştür. Cantrell et al. (2006) yaptıkları çalışmada *Aspergillus flavipes* ve *A. niger*'i zayıf halotolerant, *C. cladosporioides*'i ılımlı halotolerant ve *P. chrysogenum*'u ise yüksek halotolerant olarak belirlemişlerdir. Söz konusu türler çalışmamızdaki izolat listesinde de yer almaktadır.

Fungal izolatların halotolerant olması nedeniyle tarama işlemi tuz içermeyen ortamda gerçekleştirilmiştir. Enzimlerinin tarama işlemlerinde Topal vd.'nin kullandığı amilaz için “Difüzyon tekniği ile zon kontrolü”, lipaz ve proteaz için ise “Derin kültürde opasite kapasitesi” teknikleri kullanılmıştır. Bu tekniklerin çok sayıda izolatu ön tarama işlemleri için uygun olması, bu tekniklerin uygulama kolaylığı ve ucuz olmasından ileri gelmektedir.

İzolatların amilaz sentezleme yeteneklerinin belirlenmesinde kullanılan “Difüzyon tekniği ile zon kontrolü” testinin ilkesi genellikle katı besiyerinde büyüyen kolonilerin metabolit difüzyonunun oluşturduğu zon çapının ölçümüne dayanmaktadır. Karbon kaynağı olarak sadece çözünür nişasta içeren tarama besiyerleri; üretim sonrası iyot çözeltisi ile muamele edilmiş pozitif koloniler etrafında şeffaf zonlar yani mavi-

mor rengin oluşmadığı alanlar gözlemlenerek değerlendirilmiştir. Nişasta içeren besiyerinde şeffaf kalan zonların çapı ve koloni çapının birbirine olan oranı ile enzim konsantrasyonu arasında güçlü doğrusal bir ilişki vardır. Buna dayanarak sonuçlar yüksek aktivite (++), düşük aktivite (+) ve aktivite yok (-) şeklinde değerlendirilmiştir.

Tarama süresinde 4'ü *Mycelia sterilia* olmak üzere 7 cinse ait 25 türün toplam 104 izolatu taranmıştır. İzolatların yaklaşık olarak yarısının yüksek amilaz aktivitesi gösterdiği görülmüştür.

*Aspergillus* (%67), *Penicillium* (%52) genuslarına ait türlerde ve ilaveten *S. chartarum* ve *C. cladosporioides* türlerinde de yüksek amilaz aktivite görülmüştür. İncelenen 10 *Aspergillus* türüne ait 34 izolatın 23'ü yüksek aktivite göstermiştir. Pandey et al. (1999) ve Pandey et al. (2005)'e göre, amilolitik enzimler ipliksi funguslar tarafından da üretilmekte olup, tercih edilen türler *Aspergillus* ve *Rhizopus*'tur. Wainwright (1995) ve Pandey et al. (2005) *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *Fusarium oxysporum*, *Humicola insolens*, *Mucor pusillus*, *Trichoderma viride* gibi türlerin  $\alpha$ -amilaz üretici türler olduğunu ileri sürmektedirler. Halihazırda endüstriyel proseslerde kullanılmakta olan *Aspergillus*, *Rhizopus* ve *Basillus* türleri dikkati çekmektedir (Spier et al., 2006).

İncelenen 10 *Penicillium* türüne ait 54 izolatın 31'i yüksek aktivite göstermiştir. Çalışmamızda 8 *P. aurantiogriseum* izolatu amilaz aktivitesi açısından incelenmiş ve tüm izolatların yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur. Pembeci (1998), 1006 *Penicillium spp.* izolatını denemeye alarak amilaz aktiviteleri açısından taramıştır. %60'ın üzerinde izolatın amilaz enzim potansiyeline sahip olduğu; en yüksek aktivite gösteren türlerin *P. aurantiogriseum*, *P. bilalii*, *P. commune*, *P. concentricum*, *P. cyaneum*, *P. echinulatum*, *P. expansum*, *P. frequentans*, *P. funiculosum*, *P. granulatum*, *P. hirsutum*, *P. implicatum*, *P. jensenii*, *P. megasporum*, *P. miczynskii*, *P. ochraceum*, *P. olsonii*, *P. rugulosum*, *P. spinulosum*, *P. steckii*, *P. sublateritium*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum* ve *P. waksmanii* olduğu bildirilmiştir (Pembeci, 1998). Kennedy 1987'de, çalışmasında *Aspergillus* ve *Penicillium spp.*'den oluşan 360 strainde aktivite taraması yapmış ve *Aspergillus niger* NRRL 337 nin amilaz üreticisi olduğunu saptamıştır.

Ayrıca,  $\alpha$ -amilaz üreten küfler arasında *Aspergillus*, *Mucor* ve *Penicillium* türlerinin başlıca kaynaklar olduğu bildirilmiştir (Fogarty, 1983).

Çalışmamızda *Alternaria alternata*, *Aspergillus wentii*, *B. alba*, *E. amstelodami*, *M.S.*, *P. implicatum*, *P. waksmanii* ve *U. atrum* izolatları hiç amilaz aktivitesi göstermemiştir. Literatürde, *Aspergillus sydowii*, *A. flavus*, *A. ustus*, *A. wentii*, *P. griseoroseum*, *P. puberulum*, *C. cladosporioides* türlerinin amilolitik aktivite göstermediği bildirilmektedir (Pembeci, 1998; Çeltik, 1999; Topal vd., 2000). *A. wentii* ve *A. alternata*'nin aktivite göstermeyen türler arasında yer alması Topal vd.'nin (2000) sonuçlarıyla uygunluk göstermektedir. Ancak bulgularımızın bir kısmı Topal vd.'nin (2000) sonuçlarıyla uyuşmamaktadır. Çalışmamızda *A. sydowii*, *P. puberulum* ve *C. cladosporioides* izolatları yüksek amilaz aktivitesi gösterirken Topal vd. (2000), Pembeci (1998) ve Çeltik (1999)'in incelediği aynı türlerin strainleri amilaz aktivitesi göstermemiştir. Ayrıca *E. amstelodami*, *P. implicatum* ve *P. waksmanii* izolatları çalışmamızda aktivite göstermezken Topal vd.'nin incelediği aynı türlerin strainleri yüksek amilaz aktivitesi göstermiştir. Kendi sonuçlarımızda da görüldüğü gibi, aynı türe ait strainler arasında farklı sonuçlar bulunması nedeniyle bu uyumsuzluğun olağan olduğu düşünülmektedir.

Derin kültürde opasite kapasitesi tekniğiyle lipaz aktivitesi; tribütirin içeren ve tüplerde dik olarak dondurulan besiyerinin inokulasyonu, besiyerinde oluşan berraklık derinliğine göre değerlendirilmektedir. Topal ve arkadaşları 1998'de yaptıkları bir çalışmada aynı tekniği kullanarak 1558 izolatı lipaz sentezleme yeteneği açısından incelemişlerdir. 7. güne ait ölçüm sonuçlarının ortalaması 20 mm olması nedeniyle 20 mm ve üzeri berrak zon oluşturanları pozitif olarak değerlendirmişlerdir. Buna dayanarak ve sonuçların karşılaştırılabilir olması için, çalışma sonuçları aynı şekilde değerlendirilmiştir.

Lipaz sentezleme yeteneği açısından 104 izolat incelenmeye alınmış ve 43'ü (%41) pozitif olarak değerlendirilmiştir. Aktivite gösteren cinsler içinde *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinde aktivite gözlenmiştir. *Aspergillus spp.*'den *A. versicolor* ve *A. sydowii*; *Penicillium spp.*'den *P. aurantiogriseum* izolatları başta olmak üzere *P.*

*chrysogenum* izolatları da iyi aktivite göstermiştir. Yüksek lipaz sentezleme yeteneği olduğu belirlenen *P. aurantiogriseum* üzerine ayrıntılı çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada yabani tip *P. aurantiogriseum*'dan elde edilen lipolitik preparatın aktivitesi ve kararlılığı üzerine çeşitli çevresel koşulların ve kimyasal bileşiklerin etkisi incelenmiştir (Lima et al., 2004). *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. sublateritium*, *Phanerocheta chrysosporium* ve *Trichoderma spp.* en fazla lipolitik aktivite gösterenler olduğu bildirilmiştir (Topal vd., 2000). Ayrıca Cihangir ve Sarıkaya (2003) Türkiye topraklarından izole edilen *Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*, *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.* ve *Neurospora sp.*'yi lipaz enzim üretiminde kullanmışlar ve aktivitelerini incelenmiş en iyi lipaz enzim üretimi *Aspergillus sp.* elde edildiğini bildirmişlerdir (Cihangir ve Sarıkaya, 2004). Topal ve arkadaşlarının yaptığı lipaz taramasında en iyi aktivite gösteren türler arasında *P. aurantiogriseum*'un yer alması sonuçlarımızla uygunluk göstermektedir. Fakat çalışmamızda *P. puberulum*'a ait izolatlarda aktivite gözlenmezken Topal vd.'nin en fazla aktivite gösteren türler arasında yer almaktadır.

Derin kültürde opasite kapasitesi tekniğiyle proteaz aktivitesi; süt içeren ve dik olarak dondurulan besiyerinin inokulasyonu, besiyerinde oluşan berraklık derinliğine göre değerlendirilmektedir. Değerlendirme birçok kaynaktan elde edilen bilgilerden referans olarak alınan *Penicillium roqueforti*'nin sonuçlarıyla Çizelge 4.3'deki sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir (Löffler, 1986; Durand-Poussereau and Fevre, 1996; Topal vd., 2000). Topal ve arkadaşlarının yaptığı gibi 3. ve 7. günün berraklık derinliği ölçümlerinin ortalaması 4 mm ve üzerinde olanlar enzim üretme yetenekleri bakımından pozitif sayılmıştır.

Çizelge 4.5'e göre 3. gün berraklık derinliği ölçümlerinden elde edilen en düşük değer 36 izolat "0" olup, en yüksek değer 8 izolatta "5-6 mm" olarak bulunmuştur. 7. gün sonundaki berraklık derinliği ortalaması en düşük 4 izolat "0" olup, en yüksek olan izolat "22 mm" olarak gözlenmiştir. 3. ve 7. gün ortalamalarında ise 4 izolatta en düşük değer "0" olup, en yüksek değer 7 izolatta "10-13 mm" olarak elde edilmiştir.

Buna göre, proteaz taramalarında incelenen 104 mikrofungusun 83'ü (%80) proteaz pozitif (+) olarak değerlendirilirken, 21'i (%20) proteaz negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5). Sonuçlar tür bazında değerlendirildiğinde; *Aspergillus niger*, *A. sydowii*, *A. versicolor*; *Penicillium chrysogenum*, *P. corylophylum*, *P. griseofulvum*, *P. puberulum* türleri proteaz üretimi bakımından pozitif sonuç vermişlerdir. Topal vd. 1998'de yaptıkları bir çalışmada aynı tekniği kullanarak 1558 izolatu proteaz sentezleme yeteneği açısından incelemişlerdir buna çalışmada proteaz taramalarında incelenen küflerin %69' nun pozitif sonuç verdiği bulunmuştur. Kendi arasında en fazla proteolitik aktivite gösteren kültürlerin *Alternaria alternata*, *Aspergillus candidus*, *A. clavatus*, *A. oryzae*, *A. sydowii*, *A. versicolor*, *Cladosporium cladosporodies*, *C. herbarum*, *C. resinae*, *Curvularia geniculata*, *Fusarium solani*, *Geothricum candidum*, *Monascus ruber*, *Moniliella acetoabutens*, *Penicillium chrysogenum*, *P. corylophylum*, *P. griseofulvum*, *P. lividum*, *P. nalgiovense*, *P. paraherquei*, *P. roqueforti*, *Paecilomyces fulvus*, *Scopulariopsis candida*, *Trichoderma spp.*, *Verticillium sp.* olduğu bildirilmektedir. Yedinci günün berraklık derinliği ortalaması en yüksek olan strain ise *A. niger (carbonarius)* olarak bildirilmiştir (Topal vd., 2000).

Çalışmamızda hiç proteolitik aktivite göstermeyen türler; *Alternaria alternata*, *Eurotium amstelodami* ve *E. herbarium'* dir. *A. versicolor* (2.20.5), *A. wentii*, *B. alba* (4.5.5) ve *M.S* (10.10.4) izolatlarında 3. ve 7. günün sonuçları "0" olup hiçbir aktivite gözlenmemiştir. Literatürde, *A. glaucus*, *A. wentii*, *Chatemium spp.*, *Curvularia lunata*, *Epicoccum purpuracens*, *Penicillium implicatum*, *Paecilomyces variotti*, *Papularia sp.*, *Scopulariopsis fusca* türlerinin proteolitik aktivite göstermediği bildirilmiştir (Topal vd., 2000).

Yapılan değerlendirme sonuçlarından en yüksek aktiviteyi gösteren *Aspergillus niger* izolatıdır. Bunu takiben *A. sydowii*, *A. versicolor*, *Penicillium chrysogenum*, *P. corylophylum* ve *P. griseofulvum* iyi proteaz aktivitesi gösteren strainlerdir. Bu sonuçlarla birlikte, *A. wentii*'nin aktivite göstermeyen türler arasında yer alması Topal vd.'nin (2000) sonuçlarıyla uygunluk göstermektedir. Ancak bulgularımızın bir kısmı Topal vd.'nin (2000) sonuçlarıyla uyuşmamaktadır. Çalışmamızda 6 *P. implicatum*

izolatından 5'i oldukça iyi proteaz aktivitesi gösterirken Topal vd.'nin (2000) ayrıca Pembeci'nin (1998) incelediği aynı türün strainleri proteaz aktivitesi göstermemiştir. Kendi sonuçlarımızda da görüldüğü gibi aynı türe ait strainlerin farklı sonuçlar bulunması nedeniyle bu uyumsuzluk olağandır.

Bu aşamaya kadar yapılan tarama çalışmalarının sonuçlarına dayanarak amilaz, lipaz ve proteaz enzimi sentezleme yeteneklerinin yüksek olduğu belirlenen izolatlar ile çalışmaya devam edilmiştir. Amilaz enzimi ürettiği belirlenen türler *Aspergillus versicolor* (4.10.1), *A. sydowii* (5.2.2), *A. parasiticus* (6.10.1), *A. flavipes* (9.10.8), *Penicillium chrysogenum* (2.10.3), *P. aurantiogriseum* (7.5.2), *P. decumbens* (9.10.2) ve *P. viridicatum* (3.25.1); lipaz enzimi için *A. versicolor* (4.10.1), *A. sydowii* (5.2.2), *A. flavipes* (9.10.8), *P. chrysogenum* (2.10.3), *P. aurantiogriseum* (3.10.8), *P. aurantiogriseum* (7.5.2) ve *P. corylophylum* (9.15.6); proteaz enzimi için *A. niger* (6.10.6), *A. flavipes* (9.10.8), *A. sclerotiorum* (10.5.3), *P. corylophylum* (6.5.4), *P. griseofulvum* (6.25.3), *P. chrysogenum* (8.10.1) ve *P. puberulum* (10.10.1) türler seçilmiştir.

Seçilen izolatların enzim sentezi üzerine tuz konsantrasyonunun etkisini belirlemek için %2,5; %5; %10 ve %15 tuz içeren besiyerleri hazırlanarak aynı yöntemler uygulanmıştır.

Genel olarak incelenen tüm izolat ve türler için tuz konsantrasyonu arttıkça enzim sentezinin azaldığı gözlenmiştir. Amilaz enzimi için %2,5 oranında tuz içeren besiyerinde incelenen izolatlardan sadece *P. decumbens* (9.10.2) düşük amilaz aktivitesi gösterirken diğerleri yüksek aktivite göstermiştir. %5 tuz konsantrasyonunda ise *P. decumbens* (9.10.2) hiç amilaz aktivitesi gözlenmezken, *P. viridicatum* (3.25.1) ve *A. parasiticus* (6.10.1) düşük aktivite, *A. versicolor* (4.10.1), *A. sydowii* (5.2.2), *A. flavipes* (9.10.8), *P. chrysogenum* (2.10.3) ve *P. aurantiogriseum* (7.5.2) yüksek aktivite gözlenmiştir. %10 tuz konsantrasyonunda sadece *P. chrysogenum* (2.10.3) tuzsuz besiyeri kadar olmasada oldukça iyi aktivite gözlenmiştir (Şekil 4.4).

%2,5 tuz konsantrasyonunda incelemeye alınan tüm izolatlar, %5'lik tuz konsantrasyonunda ise *A. flavipes* (9.10.8) dışındaki tüm izolatlar lipaz enzim aktivitesi gözlenmiştir. Halotolerant olduğunu ifade ettiğimiz bu türlerin %10 tuz konsantrasyonunu tolere ettiği söylenebilir. Özellikle *A. versicolor* (4.10.1), *P. aurantiogriseum* (7.5.2) ve *P. chrysogenum* (2.10.3) %10 tuz konsantrasyonun da lipaz sentezleme yeteneklerini neredeyse tuz içermeyen ortamdaki kadar korumuşlardır. Bu üç izolatin %2,5-5 tuz konsantrasyonlarında yakın sonuçlar vermesi, hatta %5 tuz konsantrasyonunda enzim sentezinin %2,5 gibi daha düşük tuz konsantrasyonundan daha fazla olması oldukça ilgi çekicidir (Çizelge 4.5).

%2,5 tuz konsantrasyonunda seçilen tüm izolatlar tarafından proteaz enzimi sentezlenmiştir. %5 tuz konsantrasyonun da ise *A. sclerotiorum* (10.5.3) ve *P. aurantiogriseum* (3.20.1) hariç diğerlerinin enzimi sentezledikleri gözlenmiştir. % 10 tuz konsantrasyonun da ise *A. niger* (6.10.6) ve *A. flavipes* (9.10.8) tuz içermeyen ortamdaki göre düşüğe olsa enzim sentezi gözlenmiştir (Şekil 4.6). %10'a kadar tuz konsantrasyonlarında aktivite gösteren izolatlar, çevresel koşulların optime edilmesiyle daha yüksek verimde enzim sentezlemesi sağlanabilir. İleri çalışmalarda organizmaların enzim sentezleme yeteneği ve enzimin aktivitesini etkileyen koşullar optimize edilmesi gerekmektedir.

İzolatlar 3 enzim sentezleme yeteneği açısından değerlendirildiğinde *Penicillium aurantiogriseum* (hepsi), *Aspergillus parasiticus*, *A. sclerotiorum* (6.20.1; 9.15.4), *A. sydowii* (1.5.1; 5.2.2), *A. versicolor* (3.5.5; 4.10.1; 4.20.1), *P. chrysogenum* (2.5.3; 2.10.3; 2.15.3; 3.10.4; 9.10.1), *P. decumbens*, *P. viridicatum* 'un amilaz, lipaz ve proteaz üreticisi strainler olduğunu söylenebilir.

*Alternaria alternata* (3.10.3; 4.5.6), *A. wentii*, *B. alba* (hepsi), *E. amstelodami* (hepsi), *M.S* (10.10.4), *P. citreonigrum* (3.10.2) ve *U. atrum* (3.5.1) amilaz, lipaz ve proteaz enzimi sentezleme yeteneği göstermeyenler strainlerdir.

Hiperhalofillerin enzimlerinin yüksek iyonik gücün bulunduğu ortamlarda etkin olmaları yanında termostabil özellikleri nedeniyle endüstriyel amaçlı enzim üretiminde tercih edilmektedirler (Margesin and Schinner, 2001). Buna dayanarak halotolerant olduğu bilinen izolatların ürettiği enzimlerin tuzlu ortamlarda aktif olması yanında daha yüksek sıcaklıklara dayanıklı olabileceği söylenebilir. Ancak bu özelliklerin ortaya çıkarılabilmesi için enzim saflaştırılması, karakterizasyonu ve çevresel koşulların optimizasyonu üzerine daha ileri çalışmalar yapılmalıdır.



## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alaa, M. and Abou Z., 1997, Production, purification and characterization of an extracellular amylase enzyme isolated from *Aspergillus flavus*, *Microbios*, 89: 55-66.
- Alkan, B., 2003, *Penicillium chrysogenum*'dan  $\alpha$ -amilaz üretimi, Yüksek lisans tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne (yayınlanmamış).
- Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W. and Soni, R., 1999, Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive, *Process Biochemistry*, 35: 213-219.
- Beckhorn, E.J., 1967, Production of microbial enzymes, (in: microbial technology), Chapter 15; 366-380, Universal Food Corporation/Wisconsin.
- Bhat, M.K., 2000, Cellulases and related enzymes in biotechnology, *Biotechnology Advances*, 18: 355-383.
- Blain, J.A., 1975, Industrial enzyme production, (in: The filamentous, Fungi vol 1: Industrial Mycology), Chapter 10; 193-211, Edward Arnold, London.
- Borris, R., 1987, Biology of enzymes (in: Biotechnology), Chapter 2; Verlag Chemie, Weinheim.
- Bothast, R.J. and Smiley, K.L., 1978, Metabolites of fungi used in food processing (in: food and beverage mycology); Ed: Beuchat, L.R. Chapter 13, 368-396, Avi Publishing Company Inc.
- Buchan, A., Newell, S.Y., Butler, M., Biers, E.J., Hollibaugh, J.T. and Moran, M.A., 2003, Dynamics of bacteria and fungal communities on decaying Salt Marsh Grass, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 11, 6676-6687.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren, A. and Gunde-Cimerman, N., 2005a, Yeast diversity in hypersaline habitats, *FEMS Microbiology Letters* 244: 229–234.
- Butinar, L., Sonjak, S., Zalar, P., Plemenitas, A. and Gunde-Cimerman, N., 2005b. Melanized halophilic fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns. *Botanica Marina*, 48: 73–79.
- Campenhaut, L., Moutmicroflora: Kwantificeren Isoleren en Karakteriseren Van Schimmels. Ph. D. Thesis, Katolieke Universiteit, Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Leuven, 1995.
- Cantrell, S. A., Casillas-Martínez, L. and Molina, M., 2006, Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques, *Mycological Research* 110: 962–970.
- Cheetham, P.S.J., 1995, The applications of enzymes in industry, *Handbook of Enzyme Biotechnology* (Wiseman, A.-eds). 419-552. Ellis Horwood, Cornwall.
- Çeltik, Ö., 1999, Türkiye'nin dominant mikroflorasından bazı *Deuteromycetes* cinslerinin proteaz ve amilaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü (yayınlanmamış).
- Cihangir, N, and Sarıkaya, E. , 2004. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus sp.*, *World Journal of Microbiology&Biotechnology* 20: 193–197.
- Cowan, D., 1996, Industrial enzyme technology. *Tıbbtech*, 14; 177-178.
- Da Costa, M.S., Duarte, J.C., and Williams, R.A.D., 1989, *Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology*, Elsevier Applied Science, London and New York.
- Daniels, M.J., 1992, Paper technology, *33(6)*: 14.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Demain, A.L. and Solomon, N.A., 1981, In industrial microbiology and the advent of genetic engineering, 3-14p. Scientific American, Freeman & Company, San Fransisco.
- Demirel, R., Güven, K., İlhan, S., and Mutlu, M.B., 2006, Determination of microfungi from saltern areas in Turkey. 11<sup>th</sup> Interational Symposium on Microbial Ecology (Isme-11), Vinenna, Austria.
- Durand-Poussereau, N., and Fevre, M., 1996, Charecteriation of protease deficient strain of *P. roqueforti* generated by heterelogus plasmid integration: potential use for protein production. Journal of Biotechnology, 51: 97-105.
- Ekşi, A., 1988, Meyve suyu durultma tekniği, Gıda Teknolojisi Derneği yayınları No:9. 127 s. Ankara.
- Eskin, N.A.M., Henderson, H.M. and Townsend, R.J., 1971, Biochemistry of foods, Academic Press, USA, 137-141.
- Fogarty, M., 1983, Microbial enzymes and biotechnology, Applied Science Publishers, England.
- Frost, G.M. and Moss, D.A., 1987, Production of enzymes by fermentation (in: Biotechnology); Vol 7a Enzyme Technology; Vol Ed: Kenndy, J.F.: Chapter 3, 68-211. Verlag Chemie, Weinhein.
- Godfrey, T. and Reichelt, J., 1983, Industrial enzymology, The applications of enzymes in industry, Macmillian Publishers Ltd., Great Britain, 581p.
- Grishkan, I., Nevo, E., and Wasser, P., 2004, Micromycetes from the Saline Arubotaim Cave: Mount Sedom, The Dead Sea Southwestern Shore, Israel. J Arid Environments, Vol. 157, Issue 4, 431-443.
- Gunde-Cimerman. N., Zalar, P., de Hoog, GS. and Plemenitas, A., 2000, Hypersaline water in salterns-natural ecological niches for halophilic black yeasts, Fems Microbiology Ecology 32: 235–240.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., Petrovic, U., Turk, M., Kogej, T., de, Hoog, GS. and Plemenitas, A., 2004, Fungi in the salterns. In: Ventosa A(ed) Halophilic Microorganisms. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 103–113.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. and K., Chauhan, B., 2003, Microbial  $\alpha$ -Amylases: A biotechnological perspective, Process Biochemistry, 38 1599\_/1616.
- Hamilton, M., Kelly, C., Fogarty, W., 1999. Production and properties of the raw starch-digesting  $\alpha$ -amylase of *Bacillus sp.* IMD 435. Proc. Biochem. 35, 27–31.
- Hiol, A., Jonzo, M.D., Rugani, N., Druet, D., Sadra, L. and Comeau, L.C., 2000, Purification and characterization of an extracellular lipase from thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit, Enzyme and Microbial Technology. 26, 421-430.
- Hodgson, J. 1994, The changing bulk catalysis market: recombinant DNA techniques have changed bulk enzyme production dramatically, Biotechnology 12: 789-790.
- James, J., and Simpson, B.K., 1996, Applications of enzymes in food processing. Critical reviews in food science and nutrition, 36(5): 437-463.
- Jasvir, S., Navdeep, G., Gina, D. and Debendra, K., 1998, Studies on alkaline protease by *Bacillus sp.* NG312. All Rights of Any Nature Whatsoever Reserved, 0273-2289/99/76/0057.
- John, F.K., 1987, Enzyme Technology (H.J. Rehm., G. Reed editör). Biotechnology, 7A: 37-62.
- John, W., and Sons, I., 1998, Industrial enzymes and their applications, United States of Amerika. 454p.
- Johnvesly, B. and Naik, G.R., 2001, Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic *Bacillus sp.* JB-99 in a chemically defined medium, Process Biochemistry 37: 139-144.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Kennedy, J. F., 1987, Enzyme Technology, Biotechnology, VCH, Germany, Vol. 7a, 761p.
- Kıran, E.Ö., Çömlekçioğlu, U. ve Dostbil, N., 2006, Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, KSU Journal of Science and Engineering 9(1).
- Kumar, C.G. and Takagi, H., 1999, Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. Biotechnol Adv 17:561–594.
- Lima, V.M.G., Krieger, N., Sarquis, M.I.M., Mitchell, D.A. and Fontana, J.D., 2004, Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents, Biochemical Engineering Journal 18, 65–71.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Forr, A.C. and Rondall, R.J., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265.
- Löffler, A., 1986, Proteolytic enzymes: Sources and Applications, Food Technology, 40(1);63-70.
- Madsen, G.B., Norman, B.E. and Slott, S., 1973, A new heat-stable bacterial amylase and its use in high-temperature liquefaction, Starke 25, 304.
- Mandeel, Q.A., 2002, Microfungal community associated with rhizosphere of *Zygophyllum qatarense* in arid habitats of Bahrain. 50:665-681.
- Margesin, R. and Schinner F., 2001, Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology, Extremophiles 5, 73-83.
- Matsubara, H. and Feder, J., 1971, Other bacterial, mold and yeast proteases, Chapter 20; 721-795, Academic Press/ New York.
- Matyar, F., 2002. Anaerobik ortamlardan izole edilen bakteri gruplarında amilaz ve selülaz aktivitelerinin araştırılması ve yapılabilecek genetik manipülasyonlar, Çukurova Üniversitesi, Doktora Tezi, Adana, 1-23s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Mehrotra, S., Pandey, P.K., Gaur, R. and Darmwal, N.S., 1999, The Production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. *Biosource Technology*, 67: 201-203.
- Mittal, G.S., 1992, *Food Biotechnology*, Technomic Publishing Company, 380s. Lancaster, *Microbiology Reviews* 24. 403-427.
- Mudau, M.M. and Setati, M.E., 2006, Screening and identification of endomannanase-producing microfungi from hypersaline environments, *Current Microbiology* Vol. 52, pp. 477-481.
- Nahas, E., 1988, Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions. *Journal of General Microbiology* 134, 227-233.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M. and Antranikian, G., 1999, Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application, *Applied Microbiology Biotechnology*. 51: 711-729.
- Noorderliet, P.F. and Toet, D.A., 1987, Safety in enzymes technology, (in: *Biotechnology*), Volume 7a *Enzyme Technology*, Verlag Chemie, Weinheim.
- Sarıkaya, E., 1995,  $\alpha$ -Amilaz üreten bazı *Bacillus* suşlarının gelişme parametreleri, enzim özellik ve üretim koşullarının optimizasyonu, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi 2s.
- Spier, M. R. , Woiciechowski, A.L., Vandenberghe L. P. de S., and Soccol, C. R., 2006, Production and characterization of amylases by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agro industrial products. *International Journal of Food Engineering*, vol 2.
- Sztajer, H., Maliszewska, I. and Wieczorek, J., 1988, Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes, *Enzymes Microbiology Technology*, 10,492-497.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Palmer, T., 1981, Understanding enzymes, Ellis Horwood Publishers, New York.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., and Soccol, V.T., 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 29:119–131.
- Pandey, A.; Webb, C.; Soccol, C.R., and Larroche, C. 2005, *Enzyme Technology*, New Delhi: Asiatech Publishers, Inc., p.197.
- Pembeci, C., 1998, Türkiye'nin dominant mikoflorasındaki *Penicillium* türlerinde bazı enzimatik aktivitelerin belirlenmesi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Yüksek lisans tezi (yayınlanmamış).
- Paterson, R.R.M. and Bridge, P.D., 1994, Biochemical techniques for filamentous fungi. Wallingford, US., IMI Technical Handbooks: No:1, International Mycological Institute (CAB International), 125p.
- Priest, G.F., 1992, Enzymes extracellular, *Encyclopedia of Microbiology*. London, Academic Press, In. Ltd., 2: 81-93.
- Reed, G., 1966, Proteolytic enzymes, *Enzymes in Food Processing*, Academic Press, New York, 109-341.
- Tarakçıoğlu, Y., 1979, An amylase producing maltotiose from *Bacillus subtilis* agriculture biology chemistry, 49(4): 1901-1097.
- Telefoncu, A., 1993, Besin Kimyası. E. Ü. Fen Fak. Yayınları No:149. 216 s. İzmir.
- Telefoncu, A., 1997 Enzimlerin endüstriyel uygulamaları, *Enzimoloji*, (Telefoncu, A.-eds). Fen Fak. Yayınları No: 249-306. İzmir.
- Topal, Ş., 1982, Mikrobiyolojik yolla renin üretimi. TÜBİTAK MAM Beslenme ve Gıda Teknolojisi Bölümü, Yayın No:63-96s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Topal, Ş., 1985, Enzimler, mikrobiyolojik yolla enzim üretimi ve bu teknolojiye reninin yeri. Gıda, 10(1): 25-37.
- Topal Ş., Pembeci, C. ve Borcaklı, M., 2000, Türkiye'nin tarımsal mikoflorasının endüstriyel öneme sahip bazı enzimatik aktivitelerinin incelenmesi-I: amilaz, proteaz, lipaz. Turk J. Biol. 24 79-93.
- Underkofler, A.L., 1976, Microbial enzymes, Industrial Microbiology, McGrawHill Book Company, USA, 128-164.
- Ventosa, A., Nieto, J.J. and Oren, A., 1998, Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 504-544.
- Wainwright, M., 1995, *Introducción a la Biotecnología de los Hongos*. Zaragoza: Acibia, 228 p.
- Whitaker, J.R., 1972a, The Glycoside Hydrolases (in: Principles of Enzimology for the Food Sciences); Chapter 15; 443-450, Marcel Dekker Inc., New York.
- Whitaker, J.R., 1972b, The Proteolytic Enzymes (in: Principles of Enzimology for the Food Sciences); Chapter 19; 515-543, Marcel Dekker Inc., New York.
- Winkler, U.K. and Stuckmann, M., 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 138:663-670.
- Wiseman, A., 1987, Handbook of enzyme biotechnology, Second edition, Chapter 3, The Application Of Enzymes In Industry, p. 274-373.
- Wilson, J.J., Khactourians, C.G. and Ingledew, W.M., 1982, Biotechnology Letts. 4: 333-338.
- Zeikus, J.G., 1979. Enzyme Microb. Technol. 1,243.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

<http://www.indexfungorum.org/names/NAMES>