

FARKLI FUNGUS CİNSLERİNDE ENDÜSTRİYEL ÖNEME SAHİP BAZI ENZİM AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

S. Elif KORCAN, Arzu ÖZKARA, Dilek AKYIL,
İbrahim Hakkı CİĞERCİ, Muhsin KONUK

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji
Bölümü, AFYONKARAHİSAR

ÖZET

Bu çalışmada Afyonkarahisar ilinin fungus faunasını yansıtan küf cinsi mantarlar üzerinde endüstriyel öneme sahip olan bazı enzim aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Küflerin bitki, hayvan ve insanlar üzerinde zararlı etkileri olmasına rağmen; primer metabolitlerinden olan bazı enzimleri endüstriyel açıdan önemli bir kaynak olabilmektedir. Özellikle gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan enzimlerden proteaz; unlu ürünlerden peynir endüstrisine kadar pek çok alanda kullanılmaktadır. Aynı şekilde amilaz bira üretimi, tahıl ürünleri ve çikolata işleme teknolojisi gibi alanlarda, lipaz ise süt teknolojisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu durum küflerin primer metabolitlerinin hayatımızdaki önemini açıkça göstermektedir. Çalışmamızda Afyonkarahisar ilinden 6 pilot bölgeden topladığımız küf koleksiyonlarında proteaz, amilaz ve lipaz enzimlerinin aktivitesi araştırılmıştır. Bu çerçevede lipaz ve proteaz üretim yeteneğinin incelenmesinde “Derin Kültürle Opasite Kapasitesi”, amilazda ise “Difüzyon Tekniği ile Zon Kontrolü” yöntemleri kullanılmıştır. Sonuç olarak elde edilen 4 mikrofungus cinsinden 515 adet örnek çalışılmış ve bu örneklerden pozitif sonuç verenler: amilaz için 130 (%25), proteaz için 135 (%26) ve lipaz için 115 (%22) pozitifdir.

Anahtar Kelimeler: Küfler, Enzimler, Amilaz, Proteaz, Lipaz, Afyonkarahisar

INVESTIGATIONS OF SOME INDUSTRIALLY IMPORTANT ENZYMES FROM DIFFERENT FUNGI

ABSTRACT

In this study it was aimed to determine some enzyme activities having industrial significance on the fungi types which reflect the microflorance of Afyonkarahisar province. Despite the harmful effects of the fungi on plants, animals and humans, some of their enzymes which are among the

primary metabolites can be important resources in terms of industry. Especially the enzyme protease used widely in food industry is also used in many other industries ranging from flour products to cheese industry. Likewise, while amilase is used in beer production, grain products and chocolate industry, etc, lipaz is used frequently in milk technology. Such situations reveal the significance of the primary metabolites of fungi in our life. In our study, proteaz, amilase and lipase enzyme activities were examined on the fungi samples collected from 6 pilot district Afyonkarahisar province. While "Opacity Capacities in Deep Culture Technique" was used for examining the production capacity of lipase and protease, "Clear Zone in Diffusion Technique" was used for the amilase. As a result, a study was held on 515 samples obtained from 4 microfungus types and those giving positive results from the samples are as follows: for amilase 130 (%25), for protease 135 (%26) and for lipase 115 (%22).

Keywords: Fungi, Enzymes, Amilase, Protease, Lipase, Afyonkarahisar

1. GİRİŞ

Günümüzde azalan doğal kaynaklar nedeniyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için potansiyel olarak görülmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Küfler de, bu mikroorganizma grupları arasında önemli bir yere sahiptir (1)

Funguslar kendi besinlerini üretmezler ve dolayısıyla saprofit veya parazit olarak varlıklarını devam ettirirler. Funguslar besinlerini, kendi yapılarının dışına enzimler salgılayarak sindirirler ve çözünmüş substrat haline getirerek çeperlerinden ve plazma membranlarından hücreleri içine alabilirler (2).

Doğadaki organik maddeleri parçalamaları, enzim, organik asit, antibiyotik, protein ve vitamin oluşturmaları, insan, hayvan ve bitkilerde hastalıklara neden olmaları, çeşitli yiyeceklerin bozulmalarına yol açmaları, fungusların ne kadar önemli fonksiyonlara sahip olduklarını ortaya koyar (4). Bunun yanı sıra funguslar toprak fertilesinin sağlanmasında, peynirlerin olgunlaşmasında ve bazı önemli endüstriyel ürünler elde edilmesinde çok büyük yararlar sağlarlar. Organik asitler, alkoller, enzimler, pigmentler, steroller, antifungal maddeler, antibiyotikler ve diğer birçok önemli maddeler bu ürünlerin arasında yer alırlar (3).

Enzimlerden endüstriyel alanda da yararlanılmaktadır. Örneğin iyi kalite hamur elde etmek için amilaz, proteaz ve fermentasyon enzimleri kullanılmaktadır. Böylece ekmeğin daha lezzetli ve kabarık bir hal alması sağlanmaktadır (6).

Gıda, deterjan ve nişasta endüstrileri, endüstriyel enzim üretiminin %75'ini kullanmaktadır ve proteaz, amilaz, lipaz, selüloz, pektinaz gibi hidrolazlar, en yaygın kullanılan enzim gruplarıdır (5).

Fungusların gıda maddesi olarak kullanılmasından sekonder metabolitlerine kadar birçok yararlı özellikleri insanlar tarafından kullanılmaktadır (7). Küflerin enzim üretim yetenekleri önemli endüstriyel avantajlar sağlamaktadır. Enzim kullanımı açısından gıda endüstrisi, tek başına %50'lik bir paya sahiptir. Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan enzimlerden proteaz; unlu ürünlerde, geleneksel fermente ürünlerde, biranın soğukta olgunlaştırılmasında, peynir endüstrisinde koagülasyon amacıyla, et olgunlaştırmada, balık proteininin çözünürlüğünün artırılmasında, klinikte ve biyokimyada (8), amilaz; biracılıkta ve damıtık içki üretiminde, tahıl ürünleri ve çikolata işleme teknolojisinde, lipaz; süt teknolojisinde olmak üzere yaygın olarak kullanımda olup özellikle mikrobiyal kökenli üretimleri de artmıştır (9).

Mikrobiyal kaynaklı enzim üretimi hayvansal kaynaklara göre çok daha ekonomik olduğundan tercih edilmektedir (12).

Çalışmamızda Afyonkarahisar ili merkez ilçesi altı pilot bölgeden topladığımız küf koleksiyonlarında endüstriyel açıdan öneme sahip olan, proteaz, amilaz ve lipaz enzimlerinin aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL METOD

Çalışmamızda Afyonkarahisar ilinde belirlenmiş olan 6 pilot bölgeden (Ahmet Necdet Sezer Kampüsü, Esentepe, Gümüşkent, Mecidiye, Sahipata ve Yukarı Pazar) alınan küf koleksiyonlarından 515 adet küf kültürü taramaya alınmıştır. Bu küf koleksiyonu *Aspergillus* (20), *Alternaria* (40), *Cladosporium* (65), *Penicillium* (390) olmak üzere dört genustan oluşmaktadır. Enzim aktivitelerinin belirlenmesinde lipaz ve proteaz üretim yeteneği için "Derin Kültürle Opasite Kapasitesi", amilaz için ise "Difüzyon Tekniği ile Zon Kontrolü" kullanılmıştır (1).

Proteaz üretme yeteneklerinin incelenmesi:

%0.1 K₂HPO₄, %0.05 MgSO₄.7H₂O, %0.05 KCl, %1.6 agar musluk suyu içinde iyice çözüldükten sonra 121°C de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Bu karışım 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine son konsantrasyon %4.8 olacak şekilde distile su ile hazırlanmış ve aynı şartlarda sterilize edilmiş yağsız süttezu çözeltisi aseptik olarak ilave

edilmiştir. Bu karışım steril test tüplerine 15'er ml olarak dağıtılıp, dik olarak dondurulmuştur (10).

Kültürün proteaz enzimi üretim yeteneğini belirleyebilmek için bu besiyerinin üzerine spor süspansiyonu hazırlanarak eklenmiştir. Spor süspansiyonu; Patates Dekstroz Agar besiyerine 3 nokta ekimi yapılarak geliştirilen saf kültürlerden 1 cm çapındaki agar delici ile 2 adet agarlı blok kesilip, 5ml'lik steril distile su içine atılmış ve aseptik koşullarda homojenize edilerek hazırlanmıştır (11).

Elde edilen spor süspansiyonundan her bir kültür için 0.1 ml alınarak hazırlanan besiyerinin üzerine ekim yapılmıştır. 25 ± 2 °C'de bir hafta inkübe edilmiştir. Testin pozitifliği, besiyerinde bulunan ve bulanıklık oluşturan süt kazeininin parçalanarak tüpün üst kısmında berraklık meydana gelmesine bakılarak değerlendirilmiştir (1).

Amilaz üretme yeteneklerinin incelenmesi:

Kültürlerin amilolitik aktivitelerinin belirlenebilmesi için özgün amilaz besiyeri kullanılmıştır [%2 agar, %0.15 bile salt (safra tuzu), %1 çözünebilir nişasta, %0.67'lik yeast nitrogen base (YNB)]. % 1'lik nişasta çözeltisi üzerine agar ve safra tuzu eklenerek steril edilmiştir. 60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, filtre sterilizasyonu yapılmış 10 ml YNB'den son konsantrasyon %0.67 olacak şekilde eklenip karıştırılmıştır. Hazırlanan besiyeri petrilere 30 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Katılaştıran besiyeri üzerine steril bistüri veya öze yardımı ile birbirine paralel iki yatay ve iki dikey çizgi çizilmiştir. Bu çizgilerin birbirini kestikleri noktalara 10 µl spor süspansiyonu inoküle edilmiş ve 25 ± 2 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası alınan petrilere üzerine %0.3'lük iyot damlatılmıştır (10, 11).

Test sonucunun pozitifliği, üremenin olduğu alanın yakın çevresinde iyot ile muamelede mavi rengin oluşmaması ile belirlenmiştir (Şekil 1).

Lipaz üretme yeteneklerinin incelenmesi:

Lipolitik aktiviteyi test edebilmek için özgün lipaz besiyeri otoklavda sterilizasyon ile hazırlanmış (%1 agar, %0.5 pepton, %0.3 maya ekstraktı) ve içine filtre ile sterilizasyonu yapılmış % 0.1 tributirin eklenmiştir. Daha sonra bu karışım homojenize edilerek tüplere aseptik olarak 7 ml dağıtılıp dik olarak katılaştırılmıştır.

Malt Ekstrakt Agarlı petride 30 ± 2 °C'de 7 gün geliştirilmiş test kültürlerinden steril mantar delici ile agarlı parçalar kesilip, hazırlanan

besiyerinin üzerine bırakılmıştır. Tekrar 30 ± 2 °C’de bir hafta inkübe edilerek, berraklık durumuna göre sonuçlar değerlendirilmiştir.

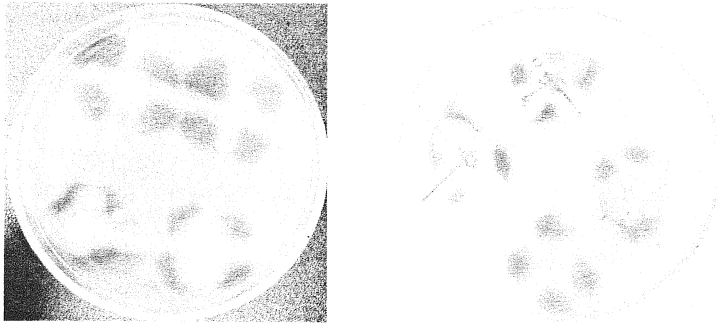
4. BULGULAR

Çalışmada proteaz, amilaz ve lipaz aktivitesi açısından 515 adet kültür ayrı ayrı taranmıştır. Bu taramalar sonucunda, elde edilen sonuçlar değerlendirilerek tablo 1’de verilmiştir.

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

Genus	Amilaz		Proteaz		Lipaz	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
<i>Aspergillus</i>	15	5	-	20	-	20
<i>Alternaria</i>	10	30	-	40	-	40
<i>Cladosporium</i>	10	55	-	65	5	60
<i>Penicillium</i>	95	295	135	255	110	280
Toplam	130 (%25)	385 (%75)	135 (%26)	380 (%74)	115 (%22)	400 (%78)

4 mikrofungus cinsinden 515 adet örnek çalışılmıştır. Bu izolatlardan 130 (%25)’unda amilaz, 135 (%26)’inde proteaz ve 115 (%22)’inde lipaz aktivitelerinin pozitif olduğu saptanmıştır.



Şekil 1. *Penicillium* genusunda amilaz pozitifliği.

Yaptığımız çalışmada 20 *Aspergillus* cinsi çalışılmış ve bunun sonucunda; amilaz testi için bu cinslerden 15 (%75) tanesi pozitif, 5 (%25) tanesi negatif, proteaz ve lipaz testi için ise 20 (%100) tanesi de negatif sonuç vermiştir.

Çalışılan 65 *Cladosporium* cinsinden amilaz testi için 10 (%15) tanesi pozitif, 55 (%85) tanesi negatif, proteaz testi için tümü negatif, lipaz testi için 5 (%8) tanesi pozitif, 60 (%92) tanesi negatif sonuç elde edilmiştir.

40 *Alternaria* cinsi ile yapılan çalışmada ise proteaz ve lipazın tümü negatif sonuç verirken amilaz testinde 10 (%25) tane pozitif, 30 (%75) tane negatif sonuç saptanmıştır.

Yapılan çalışmada en fazla elde edilen cins *Penicillium* olup 390 tanesi ile çalışılmıştır ve sonuç olarak amilaz testi için 95 (%24) tanesi pozitif, 295 (%76) tanesi negatif sonuç verirken, proteaz testi için 135 (%35) tanesi pozitif, 255 (%65) tanesi negatif olarak tespit edilmiştir. Lipaz testi için ise 110 (%28) tanesi pozitif, 280 (%72) tanesi negatif olarak elde edilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doğadaki organik maddeleri parçalamaları, enzim, organik asit, antibiyotik, protein ve vitamin oluşturmaları, insan, hayvan ve bitkilerde hastalıklara neden olmaları, çeşitli yiyeceklerin bozulmalarına yol açmaları fungusların ne kadar önemli fonksiyonlara sahip olduklarını ortaya koyar (4).

Funguslar hayatta kalabilmek için önemli avantajlar sağlayan; pektinaz, ksilinaz, sellüloz, amilaz, proteaz ve lipaz gibi enzimleri üretebilirler (13).

Yapmış olduğumuz çalışmada elde edilen sonuçlar açısından amilaz enzimi 515 küf kültüründeki her genusta pozitiflik gösterirken, proteaz ve lipaz enzimlerinde bu oran gözlenmemiştir. Özellikle *Penicillium* cinsi her üç enzim açısından pozitifliğe sahipken, *Aspergillus* ve *Alternaria* proteaz ve lipaz enzimleri bakımından negatiftir. *Cladosporium* cinsinde ise amilaz ve lipazda pozitif sonuçlar gözlenirken, proteazda negatiflik saptanmıştır.

Amilaz için 515 kültürde tarama yapılmış ve *Aspergillus* %3, *Alternaria* ve *Cladosporium* %2, *Penicillium* ise %15 pozitif sonuç vermiştir. Proteaz için yapılan taramalarda sadece *Penicillium* cinsinde pozitif sonuçlar saptanmış ve bu oran %2 olarak belirlenmiştir. Lipaz için ise *Aspergillus* ve *Alternaria* genusları negatif sonuçlar vermiş olup *Cladosporium* ve *Penicillium*'da pozitif sonuçlar %19 olarak saptanmıştır.

Birçok araştırmada; farklı mikroorganizmaların ekstrasellüler lipaz üretimine değinilmiştir. *Aspergillus niger* ile yapılan bir çalışmada farklı suşlarda ekstrasellüler lipaz enziminde çeşitlilik gözlenmiştir. Çalışma sonucunda *Aspergillus*'un yüksek lipolitik aktiviteye sahip olduğu tespit

edilmiştir (14). Çalışma sonuçlarımızda *Aspergillus* genusu için lipaz aktivitesinin negatif sonuç vermesi, genus içerisinde bu türe rastlanmadığını gösterebilir.

Topal ve arkadaşlarının (2000) yaptıkları bir çalışmada da toplam 1558 küf kültürü kullanılarak amilaz, proteaz ve lipaz taraması yapılmıştır. Bu çalışmaya göre pozitif sonuç verenler; amilaz için 645 (%41), proteaz için 1078 (%69) ve lipaz için 591 (%46)'dir (1). Yaptığımız çalışmada, proteazın yüksek aktivite göstermesi açısından bu çalışmaya paralellik göstermiştir. Farklı olarak bu çalışmada enzim aktifliği açısından proteazı lipaz takip etmişken, çalışmamızda amilaz takip etmiştir.

Amilazlar nişasta işleme endüstrisinde çok önemli rol oynayan enzimlerdir. Amilazların ticari preparasyonlarının büyük bir kısmı başta *Bacillus* türleri olmak üzere bakteriyel kaynaklardan sağlanmaktadır (15). Son yıllarda biracılık ve malt şurubu üretiminde fungal amilazların kullanımı ciddi bir biçimde artış göstermiştir (16).

Sonuç olarak, elde edilen kültürlerde en fazla amilolitik aktivite gözlenmiş olup diğer enzim aktiviteleri tüm genuslar baz alındığında daha düşük bulunmuştur. Genuslar içinde *Penicillium* genusunda her 3 enziminde aktifliği en fazladır.

Endüstriyel açıdan öneme sahip olan mantarların diğer enzim aktivitelerinin tespit edilmesi ve bu çalışmaların tür bazında da saptanması yapılacak çalışmalara temel oluşturması bakımından önemlidir.

6. KAYNAKLAR

1. Topal Ş., Pembeci C., Borcaklı M., 2000, "Türkiye'nin Tarımsal Mikoflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz", Turk J. Biol 24, 79-93.
2. Gücin F., Tamer Ü., 1994, "Mikolojiye Giriş", Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi ders notları, No:1, Bursa.
3. Arda M., 2000, "Temel Mikrobiyoloji", IX. Bölüm, Medisan Yayın Serisi:45, Ankara.
4. Asan A., 1990, "Fungus (Mantar)'ların Yaşamımızdaki Yeri", Bilim ve Teknik (TÜBİTAK), 23 227:46-47.
5. Cowan, D., Industrial enzyme technology. TIBTECH, 14; 177-178, 1996.
6. <http://www.aof.edu.tr/kitap/EHSM/1214/unite09.pdf>
7. Özkara, A., 2006, "Afyonkarahisar İli Merkez İlçe Hava Fungus Florasının Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, AKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.

8. Loffler, A., Proteolytic enzymes: source and applications. Food technology, 40(1); 63-70, 1986.
 9. James, J., and Simpson, B.K., Applications of enzymes in food processing. Critical reviews in food science and nutrition, 36(5): 437-463, 1996.
 10. Paterson, R.R.M. and Bridge, P.D. Biochemical Techniques for Filamentous Fungi. Wallingford, US., IMI Technical Handbooks: No:1, International Mycological Institute (CAB International), 125p, 1994.
 11. Campenhaut, L., Moutmicroflora: Kwantificeren Isoleren en Karakteriseren Van Schimmels. Ph. D. Thesis, Katolieke Universiteit, Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Leuven, 1995.
 12. Topal, S., Mikrobiyolojik yolla renin üretimi. TÜBİTAK MAM Beslenme ve Gıda Teknolojisi Bölümü, Yayın No:63, 96s, Aralık, 1982.
 13. González, J.A.; Gallardo, C.S.; Pombar, A; Rego, P. and Rodríguez, L.A., "Determination of Enzymatic Activities In Ecotypic *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* Yeasts", Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, ISSN 1579-4377.
 14. Falony, G., Armas, J. C., Mendoza, J.C.D., Hernández, J.L M, 2006, "Production of *A. niger* Lipase", *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2) 235-240.
 15. Barfoed, M. M., A, 1976, "Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding", *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Kindle, K.L., 1983, "Characteristics and Production of Thermostable α -amylase", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 8, 153-170.