

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEMEL ENDÜSTRİYEL MİKROBİYOLOJİ BİLİM DALI

YABANI MAKROFUNGUS TÜRLERİNE AIT MİSELLERİN ENZİM
ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Gökçe Canan ALTAYLI

Danışman

Prof. Dr. Fatih KALYONCU



MANİSA – 2018

TEZ ONAYI

Gökçe Canan ALTAYLI tarafından hazırlanan “Yabani Makrofungus Türlerine Ait Misellerin Enzim Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması 18.10.2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman **Prof. Dr. Fatih KALYONCU**
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi **Prof. Dr. Hüsniye KAYALAR**
Ege Üniversitesi

Jüri Üyesi **Dr. Öğretim Üyesi Fulya OCAK**
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, akademik ve Etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Gökçe Canan ALTAYLI



İÇİNDEKİLER

	SAYFA
İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR	II
ŞEKİLLER DİZİNİ	III
TABLO DİZİNİ	IV
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Spektrofotometrik Yöntem	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1. Amilaz Testleri	14
3.2. Proteaz Testleri	15
3.3. Çalışmada Kullanılan Ekipmanlar	17
4. BULGULAR	20
4.1. Makrofungus Misellerinin Katı Besiyerinde Amilaz Enzim Aktivitesi Açısından Değerlendirilmesi	20
4.2. Makrofungus Misellerinin Katı Besiyerinde Proteaz Enzim Aktivitesi Açısından Değerlendirilmesi	23
4.3. Makrofungus Misellerinin Sıvı Besiyerinde Amilaz Enzim Aktivitesi Ölçüm Değerleri	27
4.4. Makrofungus Misellerinin Sıvı Besiyerinde Proteaz Enzim Aktivitesi Ölçüm Değerleri	28
4.5. Enzim Üreticisi Makrofungusların Gelişim Parametrelerinin Belirlenmesi	29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	31
6. KAYNAKÇA	34
ÖZGEÇMİŞ	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	Adenozin trifosfat
(T)	Transmittans
(I)	Çözeltiden çıkan ışık şiddeti
(I₀)	Çözeltiye giren ışık şiddeti
ECM	Ektomikorizal
TNBSA	Trinitro benzenesulfonic acid
MCC	Macrofungi culture collection

ŞEKİLLER DİZİNİ

	SAYFA
Şekil 1.1. Fruktoz Mısır Şurubu Üretimi	3
Şekil 2.1. Haloenzim Yapısı	6
Şekil 3.3.1. Etüv	1
Şekil 3.3.2. Spektrofotometre	17
Şekil 3.3.3. Otoklav	18
Şekil 3.3.4. Hassas Tartı	18
Şekil 3.3.5. Karıştırıcı	19
Şekil 4.1.1. Amilaz Enzim Aktivitesi Gösteren Türler	20
Şekil 4.1.2. <i>Armillaria mellea</i>	21
Şekil 4.1.3. <i>Pleurotus sajor-caju</i>	21
Şekil 4.1.4. <i>Lentinula edodes</i>	22
Şekil 4.1.5. <i>Russula fellea</i>	22
Şekil 4.1.6. <i>Postia stiptica</i>	22
Şekil 4.2.1. <i>Inocybe leicocephala</i>	23
Şekil 4.2.2. <i>Lentinula edodes</i>	24
Şekil 4.2.3. <i>Paxillus involutus</i>	24
Şekil 4.2.4. <i>Pleurotus eryngii</i>	24
Şekil 4.2.5. <i>Armillaria mellea</i>	25
Şekil 4.2.6. <i>Pleurotus ostreatus</i>	25
Şekil 4.2.7. <i>Postia stiptica</i>	25
Şekil 4.2.8. <i>Stropharia inuncta</i>	26
Şekil 4.2.9. <i>Lentinula edodes</i>	26
Şekil 4.2.10. <i>Meripilus giganteus</i>	26
Şekil 4.3.1. Sıvı Besiyeri Ortamı	28

TABLolar DİZİNİ

	SAYFA
Tablo 2.1. Dünya Kültür Mantar Üretimini Türler'e Göre Oransal Dağılımı ...	5
Tablo 2.2. Fungal Enzimlerin Endüstriyel Uygulama Alanları	9
Tablo 3.1. Çalışma Kapsamında Miselleri Kullanılan Makrofungus Suşları ve Koleksiyon Numaraları	13
Tablo 4.1.1. Amilaz Enzim Aktivitesi Gösteren Türler ve Zon Çapları Gösterimi	20
Tablo 4.2.1. Proteaz Enzim Aktivitesi Gösteren Türler ve Zon Çapları Gösterimi	23
Tablo 4.3.1. Makrofungus Misellerinin Amilaz Enzimi Üretim Değerleri	27
Tablo 4.4.1. Makrofungus Misellerinin Proteaz Enzim Üretim Değerleri	29
Tablo 4.5.1. Farklı Karbon Kaynakları – Sıcaklık ve pH Değerlerinin <i>Armillaria mellea</i> 'nın Misel Gelişimi Üzerine Etkileri (mm)	30
Tablo 4.5.2. Farklı Karbon Kaynakları – Sıcaklık ve pH Değerlerinin <i>Meripilus giganteus</i> 'un Misel Gelişimi Üzerine Etkileri (mm)	30

TEŞEKKÜR

Çalıőmamın zorlu süreçlerin de her daim güler yüzlülüğü ile beni motive eden, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, sabrına hayran kaldığım saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Fatih KALYONCU'ya, çalıőmalarım sırasında bana maddi ve manevi destek olan aileme teşekkür ediyorum.



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Yabani makrofungus türlerine ait misellerin enzim üretim potansiyellerinin belirlenmesi*

Gökçe Canan ALTAYLI

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fatih KALYONCU

Bu çalışmada ülkemiz topraklarından toplanan 20 makrofungus türünden (*Postia stiptica*, *Pleurotus ostreatus*, *Meripilus giganteus*, *Inocybe leiocephala*, *Stropharia inuncta*, *Armillaria mellea*, *Pleurotus sajor-caju*, *Lentinula edodes*, *Paxillus involutus*, *Pleurotus eryngii*, *Russula fellea*, *Inocybe flocculosa* var. *crocifolia*, *Ganoderma lucidum*, *Fomes fomentarius*, *Stropharia inuncta*, *Tricholoma caligatum*, *Pleurotus djamor*) elde edilen misellerin enzim aktivite potansiyelleri araştırılmıştır. Çalışmamız Makrofungus suşlarına ait misellerin amilaz ve proteaz enzimlerinin üretim potansiyelleri açısından katı besiyerde gerçekleşen enzim üretim tarama testi ve sıvı besiyerinde gerçekleşen enzim miktarı belirlenme testi olmak üzere iki ana kısımdan oluşmuştur. Katı besiyeri tarama testinde amilaz için beş, proteaz için on makrofungus pozitif olarak işaretlenmiştir. Sıvı besiyeri denemelerinde amilaz üretimi 22.50 U/ml en yüksek *Armillaria mellea*, proteaz denemeleri açısından ise 37.69 U/ml *Meripilus giganteus* en yüksek üretim değerlerini vermiştir.

Çalışmamızın son bölümünde enzim üreten organizmaların optimum gelişim parametreleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla farklı karbon kaynağı içeren katı besiyerine aşılana organizmaların gelişimi misel büyüme hızlarının düzenli ölçülmesi ile farklı pH ve sıcaklık değerleri kullanılarak yapılmıştır. Bunun sonucunda; *Armillaria mellea* miselleri; karbon kaynağı olarak sükröz içeren besiyerinde 25⁰C' de ve pH 6.0'da optimum gelişim göstermiştir. *Meripilus giganteus* miselleri ise; fruktoz içeren besiyerinde, 25⁰C' de ve pH 5.5' de optimum koloni gelişimi sergilemiştir.

Anahtar Kelimeler: Amilaz, Enzim, Makrofungus, Proteaz, Türkiye,

2018, 41 sayfa

ABSTRACT

Master Thesis

The production potential of mycelia in the enzymes that wild macrofungi possess*

Gökçe Canan ALTAYLI

Manisa Celal Bayar University Institute of Science

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Fatih KALYONCU

In this research, 20 types of macro fungi that are found in our country (*Postia stiptica*, *Pleurotus ostreatus*, *Meripilus giganteus*, *Inocybe leiocephala*, *Stropharia inuncta*, *Armillaria mellea*, *Pleurotus sajor-caju*, *Lentinula edodes*, *Paxillus involutus*, *Pleurotus eryngii*, *Russula fellea*, *Inocybe flocculosa* var. *crocifolia*, *Ganoderma lucidum*, *Fomes fomentarius*, *Stropharia inuncta*, *Tricholoma caligatum*, *Pleurotus djamor*) have been examined for the micelle they contain and the effect on active potential for enzymes. The research was to observe the potential production of the enzymes, protease and amylase, that the macro fungi contain. The conclusions are divided into two outcomes. We put the enzymes into both agar and broth culture and observed their reaction. In conclusion, for amylase, 5 macro fungi came up positive. For protease, there was 10 positive macro fungi. The fungus with the highest amount of amylase was *Armillaria mellea* with a production of 22.50 U/ml. The fungus with the highest amount of protease was *Meripilus giganteus*, with a production of 37.69 U/ml.

The final part of our research is to figure out the optimum parameter for improving the enzyme production in organisms. To do this, we put organisms in agarose that contain carbon source to measure the production of micelle. There was a control group and experimental group. The control groups had constant factors that favored the production. The experimental group had different pH levels and temperatures to observe how it was affected. In conclusion, the micelles of *Armillaria mellea* grew in the optimal environment where there was sucrose in the culture, kept at 25⁰C, and had a pH of 6.0. On the other hand, *Meripilus giganteus* grew colonies at the optimum environment in a fructose culture at 25⁰C with pH of 5.5.

Keywords: Amylase, Enzyme, Macrofungus, Protease, Turkey

2018, 41 pages

1. GİRİŞ

Günümüzde azalan doğal kaynaklar nedeniyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için potansiyel olarak görülmekte ve bu alanda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Funguslar da bu mikroorganizma grupları arasında önemli bir yere sahiptir [1]. Funguslar kendi besinlerini üretemezler ve dolayısı ile saprofit veya parazit olarak yaşamlarını sürdürürler. Gübre gibi diğer organizma artıkları ve ölü organizma kalıntıları üzerinde saprofit beslenirler. Bitki, hayvan ve diğer fungusların canlı hücreleri üzerinde veya içinde parazit olarak yaşamlarını sürdürürler. Ökaryotik organizmalardır. Gerçek bir nükleus ve sitoplazmik organellere sahiptirler. Funguslar; pektinaz, ksilanaz, selülaz, amilaz, proteaz, lipaz gibi enzimler üretebilirler, besinlerini hücre dışına enzimleri salgılayarak sindirirler ve çözülmüş substrat olarak hücre içine alırlar. Funguslarda hücre duvarının %80-90'ını polisakkarit, kalanının büyük bir kısmı glikoprotein ve az miktarda lipid oluşturur. Funguslar organik madde yıkımından ve geri dönüşümünden sorumlu olup, doğadaki organik maddeleri parçalamaları, enzim, organik asit, antibiyotik, protein ve vitamin oluşturmaları, insan, hayvan ve bitkiler de hastalıklara neden olmaları, çeşitli yiyeceklerin bozulmalarına yol açmaları gibi özellikleri vardır. Funguslar, çoğunlukla sıcaklık istekleri yönünden mezofiliklerdir. Optimum 25-35°C' de büyüme gösterirler. Bunların yanında; optimum 40°C'nin üstünde büyüme gösteren termofilik funguslar da bulunur. *Aspergillus fumigatus* termofilik funguslara örnektir. İnsan ve hayvanlarda aspergillozis enfeksiyonuna yol açar. Fungusların çok az bir kısmı da psikotoleranttır (0°C ve altında). *Thamndium elegans*, dondurulmuş etlerde ciddi problemlere yol açar. pH istekleri yönünde funguslar membran geçirgenliği ve moleküllerin iyonlaşması etkilidir. pH: 5.0 - 5.5 aralığında optimum gelişim gösterirler. Işık ise, fungusların eşeyli ve eşeysiz üreme yapılarının oluşumunu başlatır. Bu yapıların spor düzenlenmesinde etki sağlar. Örneğin; *Pleurotus sp.* sporokarp oluşumu için ışığa gereksinim duyar [2].

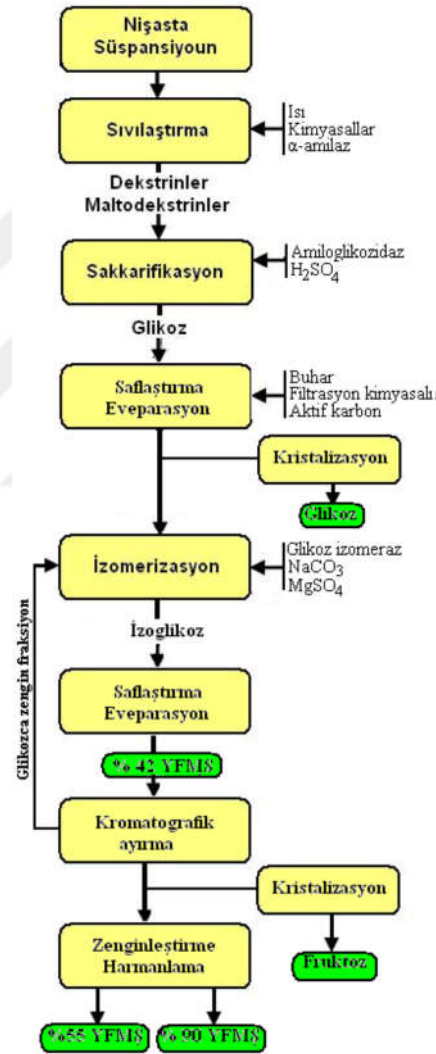
Biyolojik reaksiyonları hızlandıran biyokatalizörler için "hücrede bulunan" anlamına gelen "enzim" kavramı ilk kez Willy Kühne tarafından 1878'de kullanılmıştır. Enzimlerin hücre ve canlı metabolizmasındaki önemi oldukça fazla

olması nedeniyle tıp, biyokimya ve biyoloji gibi geniş bir araştırma alanı bulmuştur [3].

Bir enzimden herhangi bir alanda yararlanabilme olanağı büyük ölçüde ekonomik parametreler ile ilgilidir. Enzimler canlı materyallerden elde edilmektedir. İzolasyon ve saflaştırma işlemleri emek gerektiren pahalı aşamalardan oluşmaktadır. Bu nedenlerden ötürü enzimler genellikle pahalı materyallerdir. Enzimin yaygın bir şekilde kullanılabilme şansını arttıran unsurlar, bir enzimin mikrobiyal kaynaklardan eldesi ve ham preparatının saflık düzeyinin tasarlanan işlemler için yeterli olmasıdır. Enzimler endüstriyel veya evsel atıkların (fenolik bileşikler, nitriller, aminler vb.) toksik kimyasal bileşiklerini parçalama veya dönüştürme yoluyla indirgeyebilirler. Dünya genelinde endüstriyel enzim pazarı 1,4 milyar USD düzeyinde olup, yıllık % 10 civarı pazar ağı artışı ve %5 satış artışı ile en yaygın tüketim ürünlerinden biri konumuna yükselmiştir. Endüstriyel enzim üretiminin yaklaşık %75'i gıda, deterjan ve nişasta endüstrileri tarafından kullanılmaktadır [4].

Nişasta, endüstride kullanılan en önemli ham maddelerden biridir. Bitkilerde depo polisakkarit formunda çokça bulunmaktadır ve geniş çapta kullanılan gıda sektöründe glikoz, fruktoz ve maltoz içeren şurupların eldesi için ucuz bir kaynaktır. Polikristalin fazda yoğun bir şekilde paketlenmesi ile birlikte nişasta granüllerinde moleküller iç ve ara molekül bağlar ile bağlanmıştır. Bu yüzden soğuk suda çözünmezler ve sıklıkla kimyasallara ve enzimlere karşı dirençlidirler [5]. Nişastadan üretilen glikoz ve fruktoz şuruplarının üretim maliyetlerinin düşmesinin nedeni; tek basamakta ham nişastayı hidrolizleyen amilaz enzimidir. Bu durum amilaz enzimi üzerine araştırmaları arttıran bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır. Yüksek fruktozlu mısır şurubu genelde mısır nişastasının, kimyasal ve enzimatik hidroliz teknikleri kullanılarak sıvılaştırma, parçalama ve izomerizasyon aşamaları ile üretilmektedir [6]. Üretimde mısır nişastasını basit şekerler olan glikoz ve fruktoza dönüştürmek için üç farklı enzim kullanılmaktadır. İlk olarak alfa amilaz enzimi yardımıyla uygun ortamda nişasta granülleri hidrolize edilerek dekstrin zincirlerine parçalanır. Daha sonra glukoamilaz enzimi ile dekstrin zincirleri dekstrin moleküllerine ve en son glikoz, izomeraz enzimi ile fruktoza dönüştürülmektedir [7]. Asit de hidroliz işleminde kullanılabilir. Kompleks bir damıtma ve toplu proseten sonra farklı fruktoz içeren (%42, %55 ve %90) şuruplar elde edilmektedir. Öncü olarak dekstrozun

enzimler ile izomerleştirilmesi sonucunda %42'lik fruktoz şurubu üretilmektedir. Daha sonra bu şurup fruktozu tutan kolonlardan geçirilerek %90'lık yüksek fruktozlu şurup ve tekrar %42'lik şurup ile karıştırılarak %55 fruktozlu mısır şerbeti elde edilmektedir. Ayrıca bu şuruptan kristalizasyon işlemi ile kristalize fruktoz da üretilebilmektedir [8]. Genellikle, doğal tadın korunmasının ve orta seviyede bir tatlılığın istenildiğinde gıdalar ile konservelerde %42'lik; alkolsüz içecekler, dondurma ve tatlılarda %55'lik ve çok az bir tatlandırıcı ile yüksek şeker tadının istendiği gıdalarda %90'lık fruktoz şurubu kullanılmaktadır. Mısır nişastasından yüksek fruktozlu mısır şurubu üretim akım şeması da Şekil 1.1.' de gösterilmektedir.



Şekil 1.1 Fruktoz Mısır Şurubu Üretimi [6]

Amilaz enzimi kadar mikrobiyal kökenli proteazlar da üretim kolaylığı ve düşük maliyetli üretimi, süreklilik, in-vitro koşullarda aktif olması, alerjen ve toksik

etkilere sahip olmaması gibi avantajlar nedeni ile bitkisel ve hayvansal kökenli proteazlara göre daha fazla ilgi görmektedirler. Bunun yanı sıra proteaz üretici kaynaklarının fazlalığı ve elde edilen proteazların spesifik özelliklerindeki farklılıklar da kullanım alanlarına uygun olarak diğer bir avantaj sağlamaktadır [9].

Bu tez çalışması ile ülkemiz topraklarından toplanan yabani makrofunguslardan elde edilen misellerden oluşturulan kültür koleksiyonundaki bireylerin amilaz ve proteaz üretim potansiyelleri açığa çıkarılmaya çalışılmıştır. Çalışmamız kapsamında mevcut literatürden farklı olarak ülkemize özgü yabani makrofungus kültürleri kullanılmıştır. Bu kültürlerin daha önce benzer bir çalışmada kullanılmamış olması ve performanslarının belirlenmemesi çalışmamıza literatür açısından özgünlük ve yüksek performanslı kültürlerin belirlenmesi halinde de ekonomik açıdan bir üstünlük kazandıracaktır.

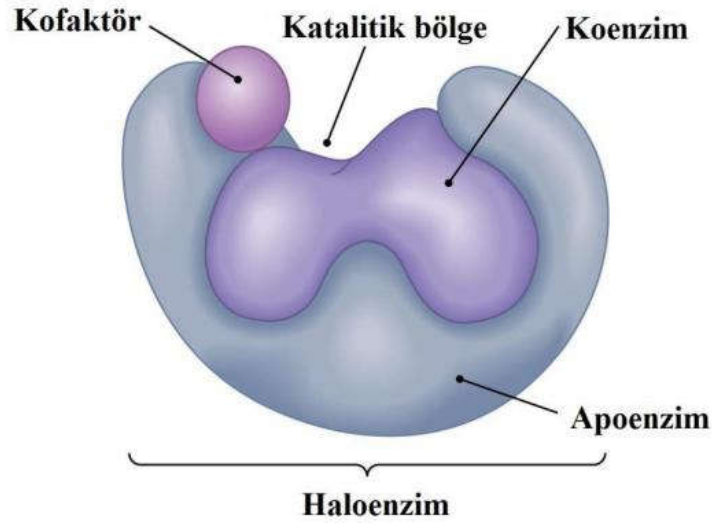
2. GENEL BİLGİLER

Dünyada makrofungus üretiminde Çin'i Amerika, Hollanda, Fransa, Polonya ve İspanya takip etmektedir. Dünyada en yaygın olarak üretilen makrofungus türü *Agaricus bisporus*'tur. Ülkemizde yaygın olarak üretilen bu tür halk arasında da kültür mantarı diye adlandırılır. Funguslar; yenebilen, tedavi amaçlı kullanılabilen ve ticari öneme sahip organizmalardır. Sebzedden daha çok protein yapısına sahip bir besin kaynağıdır. Protein miktarı kuru ağırlığın %10-40'ı arasında değişkenlik gösterir. Yüksek oranda fosfor, potasyum, az miktarda demir ve kalsiyum mineralleri bulundurlar. Ayrıca funguslar folik asit bakımından da zengin olduklarından kansızlık tedavilerinde öncü olarak kullanılabilirler. Tıbbi amaçlı kullanılan funguslar da *Grifolia frondosa*, *Tremella fuciformis*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*, *Innotus obliquus* ve *Flammulina velutipes*'tir. Bu funguslar bağışıklığı güçlendirerek kanser ve AIDS gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Türlerine göre oransal dağılım Tablo 2.1.'de gösterilmektedir [10].

Tablo 2.1. Dünya Kültür Mantar Üretiminin Türlerine Göre Oransal Dağılımı [11]

TÜR	ÜRETİM (Bin Ton)	% (Yüzde)
<i>Agaricus bisporus</i>	1424	37.8
<i>Pleurotus spp.</i>	909	24.2
<i>Auricularia spp.</i>	400	10.6
<i>Lentinus edodes</i> (Shiitake)	393	10.4
<i>Volveriella volvaceae</i>	207	5.5
<i>Flammulina velutipes</i>	143	3.8
<i>Tremella fuciformis</i>	105	2.8
<i>Hericium erinaceus</i>	90	2.4
<i>Pholita nameko</i>	53	1.4
<i>Hypsizigus marmoreus</i>	22	0.6
<i>Grifolia frondosa</i> (Maitake)	7	0.2
Diğerleri	10	0.3
Toplam	3763	100.0

Enzimler genellikle belirli madde / maddelere özgülük göstermektedirler. Enzimin protein yapısı etki edeceği maddeyi ve katalize edeceği reaksiyonun tipini belirlemektedir. Enzimlerin protein kısmına apoenzim adı verilir. Enzimlerin bazıları basit protein yapısındadır ve bunların katalitik aktivite gösteren kısmı proteinin polipeptid zinciridir. Çoğu enzim katalitik aktivitesi için proteinden başka bir metal iyonuna, protein olmayan inorganik bileşiklere, bazılarının ise her ikisine de ihtiyacı vardır. Bu iyon veya bileşiğe genel olarak kofaktör adı verilmektedir. Enzimlerin inaktif halde bulunan proteinden ibaret kısmına proenzim veya zimojen denilmektedir. Organik bileşik enzimin protein kısmı ile birleşmiş ve ayrılmıyorsa prostetik grup, sıkıca birleşmemiş ve ayrılabilirse koenzim olarak adlandırılır. Apoenzim enzimin spesifikliğini sağlayan kısımdır. Koenzim ve apoenzimin birlikte oluşturduğu enzime haloenzim adı verilir. Şekil 2.1’de haloenzimin yapısı gösterilmiştir. Enzimin etki ettiği maddeye substrat, reaksiyon sonucu oluşturduğu maddeye ise ürün adı verilmektedir [12].



Şekil 2.1 Haloenzimin Yapısı [13]

Enzimler Uluslararası Biyokimya Derneği enzim komisyonuna göre altı sınıfa ayrılmaktadır. Bu enzim grupları sırası ile oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlardır [13].

- 1- **Oksidoredüktazlar:** Redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

- 2- **Transferazlar:** Fonksiyonel grup transferinin gerçekleştiği reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.
- 3- **Hidrolazlar:** Hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
- 4- **Liyazlar:** C-C, C-O, C-N ve bazı diğer bağların eliminasyon yoluyla yıkılmasını veya bazı grupların çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
- 5- **İzomerazlar:** Substratın geometrik ya da yapısal olarak yeniden düzenlenmesini katalizleyen enzimlerdir.
- 6- **Ligazlar:** ATP veya diğer bir nkleozidtrifosfattaki bir fosfat bağının hidrolizinden açığa çıkan enerji yardımıyla gerçekleşen sentez reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. [13]

Amilaz enzimi (1,4- α -D-glucanohydrolase) nişastadaki α -1,4 bağlarını hidrolizler. Nişastayı hidroliz etme derecesine göre değişen iki kategori içinde sınıflandırılır. Sıvılaştırıcı amilazlar nişastanın %30-40'ını, şekerleştirici amilazlar ise nişastanın %50-60'ını hidroliz ederler [14]. Amilaz enziminin hidrolizi ile serbest bırakılan hemiasetal grupları α -optik konformasyona sahip olduklarından bu enzimlere yaygın olarak α -amilaz denilmektedir [15]. Ekmek yapımı, glikoz / fruktoz şurubu, tekstil ve kâğıt endüstrisi gibi alanlarda amilaz enzimi yaygın olarak kullanılmaktadır [16]. *Bacillus* sp. ve *Aspergillus* sp. tarafından üretilen, ayrıca arpa ve buğday maltında da bulunabilen enzimler, amilaz ve endo β -glukanazlardır. Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması ve kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile etki edilirler. Bu işleme "haşıllama" adı verilir. Kumaş dokunduktan sonra, kumaştaki fazla nişasta uzaklaştırılması gerekir, bu işleme de haşıl alma adı verilir. Haşıl alma ajanı olarak da yaygın olarak α -amilaz kullanılmaktadır [17]. Ekmeğin bayatlamasının geciktirilmesi ve raf ömrünün uzatılması (2-3 gün) için de yaygın olarak kullanılmaktadır. Meyve suyu endüstrisinde de uygulama alanı olan amilaz, özellikle elma ve armut sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Meyveler tam olgunlaşmadan toplandığında meyvede hala nişasta bulunduğu için

meyve suyunda bulanıklık meydana gelir. Bu sorun ortama α -amilaz ilave edilerek giderilir [17].

Amilaz iç etkili bir enzimdir. Rastgele biçimde nişasta polimerlerinin iç kısmındaki zincirleri hidrolizler, dallanmış ve doğrusal oligosakkaritlerin oluşmasına neden olur [18]. Nişasta granüllerinin enzimatik hidrolizi iki şekildedir; birincisi nişastanın yüzeyinden merkezine doğru olan sentripetal hidroliz, ikincisi ise granülün dış yüzeyinde etki gösteren sentrifugal hidrolizdir [19]. Nişastayı işlemede kullanılan jelatinizasyon ve sıvılaşma basamakları olmaksızın ham nişastayı hidroliz eden amilazlar farklı fungal kaynaklardan izole edilmiştir [20]. Çeşitli funguslardan elde edilen ve ham nişastayı hidroliz edebilen amilazların pH, sıcaklık, molekül ağırlığı, termostabilitesi ve diğer fiziko-kimyasal parametreleri benzerlik ve farklılıklar gösterebilmektedir.

Proteazlar genel olarak; proteinler arasındaki peptid bağlarının parçalanmasını sağlayan biyokatalizör olarak tanımlanabilirler ve bu enzimler metabolizmada, gen ekspresyonunun regülasyonunda, patojenitede ve transportta büyük protein moleküllerinin küçük moleküllere hidrolizini sağlamaktadırlar [21]. Peptid bağlarının su varlığında proteazlar tarafından hidrolizi proteoliz olarak isimlendirilmektedir ve ürün olarak proteinler, peptid fragmentleri ve serbest amino asitler oluşur [22]. Proteaz enzimi canlılarda bulunan büyüme ve çoğalma için gerekli olan bir enzimdir. Bir fizyolojik düzenleyici olan proteazlar gebeliğin başlaması, doğum, sindirim, büyüme ve gelişme, yaşlılık ve apoptozis gibi olaylarda başrolü oynarlar [23].

Proteazlar, mikroorganizmalar tarafından hücre içi ve hücre dışı olarak sentezlenebilirler. Hücre içi enzimler sporulasyon, farklılaşma, enzim ve hormonların olgunlaşması, protein katlanması gibi hücresel ve metabolik süreçlerde görev yapmaktadırlar. Hücre dışı olanlar ise hücre dışında hidrolitik ürünlerin hücre içine alınmasına imkân sağlamak gibi rolleri vardır. Bu enzimler aynı zamanda protein parçalanmasını temel alan pek çok ticari alanda da kullanılmaktadır [21]. Proteazlar, ticari olarak üretilen enzimlerin en önemli grubunu oluşturmuş olup, deterjan, içki, et, fotoğraf, deri ve süt endüstrilerinde kullanılırlar [24]. En büyük kullanım alanı çamaşırlardan protein bazlı lekelerin uzaklaştırılmasına yardımcı olmak için kullanıldığı deterjan sektörüdür [25]. Deri endüstrisinde ise deriden kılların

uzaklaştırılması ve derinin tabaklanmasında halen bu amaçla kullanılan toksik kimyasalların yerini alması yeni bir gelişme olup biyoteknolojik açıdan da proteazların önemini artırmıştır [26].

Enzimler; İşleme süresinin azalması, düşük enerji girişi, maliyet etkinliği, toksik olmayan ve çevre dostu özellikler nedeniyle çeşitli endüstrilerde daha çok tercih edilip (ör. gıda, tarım, kimyasallar ve farmasötik ürünler) kullanımını da hızla artırmaktadır. Fungal enzimlerin endüstriyel uygulamaları alanları da Tablo 2.2.' de verilmektedir.

Tablo 2.2 Fungal Enzimlerin Endüstriyel Uygulama Alanları [27].

ENZİM	FONKSİYONU	MİKROORGANİZMA
Asit proteinaz	Süt pıhtılaşması	<i>Aspergillus sp.</i>
Lipaz	Hızlı peynir olgunlaşması Hamurun havalandırılması	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i>
Katalaz	Peynir işleme	<i>Aspergillus niger</i>
Amilaz	Ekmek mayalaması Tat düzenleyici	<i>Aspergillus sp.</i>
Glukoz Oksidaz	Hamur güçlendirmesi	<i>Aspergillus niger</i>
Pektinaz	İçeceklerde Depektinizasyon	<i>Aspergillus oryzae</i>
Proteaz	Sis oluşumunu kısıtlamak Leke çıkarma	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i>
A-amilaz	Nişasta hidrolizi	<i>Aspergillus sp.</i>
Endoglukozidaz	Diş ve diş eti bakımı	<i>Mucor hiemalis</i>

Enzim aktivite tayininde kullanılan yöntemleri yedi başlık altında toplayabiliriz.

- Spektrofotometrik yöntem,
- Monometrik yöntem,
- Thunberg yöntemi,
- Elektrot yöntemi
- Polimerik yöntem,
- Kromatografik yöntem,
- Kimyasal tayin yöntemi,

2.1. Spektrofotometrik Yöntem

Birçok enzim substratı veya koenzimi, ultraviyole ışıktaki bir tepe değeri göstererek, absorbanı vermektedir. Substratın kaybolması ya da ürünün meydana gelişi gibi koenzimdeki değişiklik spektrofotometre yöntemi ile tayin edilir. Spektrofotometrik yöntem; kolaylığı ve hassas olması nedeniyle diğer yöntemlere göre daha çok tercih edilir. Bu yöntemde optik dansite değişimi, belirli miktardaki enzim ünitesini verir [28].

Çözeltiden çıkan ışık şiddetinin çözültüye giren ışık şiddetine oranı (I/I_0), Transmittans (**T**) olarak tanımlanır. Transmittans, genellikle (**% T**) olarak bilinir. Bir maddenin rengi, o maddenin gözümüze ulaşan görünür bölgedeki elektromanyetik ışınlarıdır. Bu ışınlar, saydam maddeler için maddenin içinden geçip giden saydam olmayanlar için ise yansıyan ışınları oluşturur. Çözelti içindeki madde miktarını çözültüden geçen veya çözültünün tuttuğu ışık miktarından faydalanarak ölçme işlemine **fotometri**, ölçümde kullanılan aletlere ise **fotometre** adı verilir. Analiz edilen numune üzerine ışık huzmesinin bir kısmını filtre yardımı ile ayıran aletler fotometre olarak isimlendirilirler. Yarıklar ya da prizmalar aracılığı ile bu seçiciliği yapan aletler de spektrofotometre olarak isimlendirilirler [29].

Funguslar tüm habitatlarda yaşayabilen kozmopolit canlılardır. Yaşam ve beslenme tarzlarına uygun olarak pek çok enzimi ve diğer organik bileşiği üretebilme kabiliyetine sahiptirler. Bugüne kadar funguslardan lektinler, nükleazlar, proteazlar, polisakkaritler ve polisakkarit - protein kompleksleri izole edilmiştir [30].

1974 yılında, Hwa L. Wang, Jonet B. ve arkadaşları soya fasulyesi fermentasyonunda kullanılan fungustaki asit proteaz üretimi ile ilgili bir çalışmada, 3 türün (*Rhizopus oligosporus*, *Mucor dispensersus*, *Actinomucor elegans*) proteaz üretimi koşullarını araştırılmışlardır. Katı substrat olarak; buğday kepeği, buğday, ve soya fasulyesi kullanılmıştır. En iyi proteaz üretim ortamının buğday kepeği olduğu belirlenmiştir [31].

Altı farklı makrofungus türü ile yapılan bir araştırmada makrofungusların amilolitik, ksilanolitik ve proteolitik aktiviteleri incelenmiştir. Çalışma sonunda *Lycophyllum shimeji* ve *Pleurotus sajor-caju* yüksek aktivite gösteren türler olarak belirlenmiştir [32].

2000 yılında Edson Luiz Zagrando Figueira ve Elisa Yoko Hirooka Toksikojenik fungus olan *Fusarium moniliforme* ve *Aspergillus flavus*'un mikotoksijenik suşu tarafından misel artışı amilaz üretimi için kültür ortamı çalışması yapılmıştır. Nişasta, gliserol, buğday kepeği veya mısır içeren ortamlar değerlendirmeye alınarak, mısır ile oluşturulan ortamın en yüksek amilaz üretimi tespit edilmiştir [33].

2004 yılında Sumitra Romochandran ve arkadaşları *Aspergillus oryzae* türü ile substrat ortamlarına ilave edilerek amilaz üretimi tayini gerçekleştirmişlerdir [34].

Bir başka çalışmada *Aspergillus oryzae* ve *A. sojae* suşlarından elde edilen proteazlar ile ızgaralık etler üzerinde gevrekleştirme işlemi yapılmıştır ve bu proteazların gevrekleştirmeye yardımcı oldukları tespit edilmiştir [35].

2007 yılında Cajsja M.R. Nugren, Johan ve arkadaşları, ektomikorizal fungusların farklı türlerinin hücre dışı proteaz aktivitesini saptamak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Kuzey ormanı ekosistemlerinde, orman ağaçları azot alımı için ektomikorizal (ECM) mantarlara büyük ölçüde bağımlıdır. Bu çalışmada; kültüre edilemeyen 32 tür ele alınıp, proteaz aktivitesi için süt tozu plakaları üzerindeki büyümeleri gözlemlenmiştir. Bu türlerden *Rusulla chlorides*, *Amanita muscaria*,

Lactorius deterrimus ve *Lactarius quieticolor* türlerinde proteaz aktivitesi olduğu belirlenmiştir [36].

Penicillium chrysogenum ve *Staphylococcus xylosus* türlerinin proteolitik aktivitesinin incelendiği bir araştırmada *P. chrysogenum*'un kuru kürlenmiş et ürünlerinin olgunlaştırılması sırasında proteolize önemli bir katkısının olduğu tespit edilmiştir [37].

Farklı bir çalışmada; *Lentinus citrinus* türü ile lignoselülozik (odunsu) atıklar üzerinde katı kültür fermentasyonu yöntemi ile proteaz üretimi gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucunda bu türün önemli derecede proteaz üreticisi olduğu saptanmıştır [38].

2017 yılında yayınlanan bir araştırmada *Cordyceps militaris*'den izole edilen bir fibrinolitik enzimin biyokimyasal özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır [39].

Tatsumi ve ark. 2016 yılında yayınladıkları bir araştırmada shiitake (*Lentinula edodes*) üzerinde polisakkarit degrade edici enzim üretimi gerçekleştirmeye çalışmışlardır [40].

Tez çalışmamız ile bugüne kadar haklarında buna benzer bir çalışma yapılmamış olan ülkemize ait mikrobiyal kaynaklar kullanılmış ve enzimatik aktivite yönünden değerlendirme imkânları olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmamızda daha önce bir TÜBİTAK projesi (104T236) kapsamında elde edilen ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Bölümü'nde korunan 20 makrofungus suşuna ait misel kültürü enzim üretim potansiyelleri yönünden incelenmiştir. Kullanılan organizmaların isimleri ve kod numaraları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 Çalışma Kapsamında Miselleri Kullanılan Makrofungus Suşları ve Koleksiyon Numaraları

Sayı	Makrofungus Türü	Kod Numarası
1	<i>Postia stiptica</i> (Pers.) Jülich	MCC-13
2	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm	MCC-41
3	<i>Meripilus giganteus</i> (Pers.) P. Karst.	MCC-08
4	<i>Inocybe leiocephala</i> D.E. Stuntz	MCC-17
6	<i>Stropharia inuncta</i> (Fr.) Quel.	MCC-59
7	<i>Armillaria mellea</i> (Vahl.) P. Kumm.	MCC-20
8	<i>Pleurotus sajor-caju</i> (Fr.) Singer	MCC-Saj
9	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	MCC-LE
10	<i>Paxillus involutus</i> (Batsch) Fr.	MCC-52
11	<i>Pleurotus eryngii</i> (DC.) Quel	MCC-50
12	<i>Russula fellea</i> (Fr.) Fr.	MCC-43
13	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	MCC-55
14	<i>Inocybe flocculosa</i> var. <i>crocifolia</i> (Herink) Kuyper	MCC-35
15	<i>Paxillus involutus</i> (Batsch) Fr.	MCC-37
16	<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	MCC-52
17	<i>Fomes fomentarius</i> (L.) Fr.	MCC-19
18	<i>Stropharia inuncta</i> (Fr.) Quel.	MCC-14
19	<i>Tricholoma caligatum</i> (Viv.) Ricken	MCC-11
20	<i>Pleurotus djamor</i> (Rumph. Ex Fr.) Boedijn	MCC-25

Bu organizmaların enzim üretim potansiyelleri iki farklı enzim yönünden belirlenmeye çalışılmıştır. Bu enzimler; amilaz ve proteazdır. Organizmalar iki gruba ayrılarak çalışılmıştır. Çalışma kapsamında öncelikle uzun süredir stok kültür olarak +4°C'de tutulan kültürlerin aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Aktivasyon işleminin ardından tüm grup üyeleri çalışılan enzimler yönünden bir tarama testine tabi tutulmuşlardır. Tarama testleri katı ortam besiyerlerinde yapılmıştır. Her bir enzim için katı besiyerindeki tarama testinin nasıl yapılacağı aşağıda verilmiştir. Katı ve sıvı ortamlara aşılama için; Kirk's bazal ortamında geliştirilmiş misel kültürlerinden 6 mm çapında misel kaplı diskler aseptik koşullarda çıkarılarak inokulum olarak kullanılmıştır [41]. Tüm tarama testleri üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Amilaz Testleri

Aktivasyon işlemini takiben organizmalar %0,5 pepton, %0,3 yeast ekstrakt, %1,0 çözünür nişasta, %0,3 NaCl, %0,1 K₂HPO₄, %0,02 MgSO₄.7H₂O ve %1,5 agar içeren besiyerine aşılanmıştır. Aşılanan Petri kapları 27 – 30°C'de 5-7 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda organizmaların geliştiği Petri kaplarına 0,1 N Lugol reaktifi ilave edilmiştir. Amilaz enzimi üreten organizmalar besiyerindeki nişastayı parçaladıkları için kolonilerin etrafında boyanmayan şeffaf zonlar meydana gelmiştir. Nişasta bulunan bölgelerde ise renk koyu mavi – siyah olarak kalmıştır. Nişastayı parçalayan organizmalar sıvı kültür denemeleri için işaretlenerek ayrılmıştır [42].

Tez çalışmamız kapsamında çalışılacak iki farklı enzimden amilaz için; öncelikle kolorimetrik ölçüm işlemlerinde kullanılacak nitrofenol standartları hazırlanmıştır. Bu işlem için 96 kuyucuklu plakaya sırasıyla 0, 2, 4, 6, 8 ve 10 µl 2mM nitrofenol standardı eklenmiş ve üzerlerine (50µl)'a tamamlayacak şekilde steril saf su eklenerek sırasıyla 0 (kör), 4, 8, 12, 16 ve 20 nmol standartlar hazırlanmıştır. Daha sonra süpernatant kısım 96 kuyucuklu plakaya aktararak kuyucuklardaki örnek miktarı amilaz analiz tamponu ile (50µl)'ye tamamlanmıştır. Pozitif kontrol için (5µl) amilaz pozitif kontrol solüsyonu da bir kuyucuğa eklenmiş ve üzeri tampon ile tamamlanmıştır. Eşit miktarda amilaz analiz tamponu ve amilaz substrat karışımı içeren temel reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Örnek içeren her bir kuyucuğa bu karışımdan 100 µl eklenerek çalkalayıcıda karışmaları sağlanmıştır. 3 dakikalık

çalkalamanın ardından karışımın absorbans değeri 405 nm’de ölçülmüştür. Bu değer başlangıç değeri olarak alınmıştır. Plaka 25⁰C’de ve karanlıkta inkübasyona alınmış ve örneklerin absorbans değerleri her 5 dakikada bir 405 nm’de ölçülmeye devam edilmiştir. Ölçüm işlemi en aktif örneğin absorbans değerinin en yüksek nitrofenol standardı olan 20 nmol’lük standardın ölçüm değerini aştığı ana kadar devam etmiştir. En son ölçülen absorbans değeri final değer olarak alınmıştır. Örneklerin amilaz aktivite değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır [43].

B x Örnek dilüsyon faktörü

Amilaz aktivitesi : ----- = U/ml

Reaksiyon zamanı x V

V: kuyucuğa eklenen örnek miktarı (µl)

Reaksiyon zamanı: Final ve başlangıç absorbans değerleri arasındaki zaman (dakika)

B: Final ve başlangıç absorbans değerleri arasındaki (nmol) nitrofenol farkı

Bir ünite amilaz; pH 7.2’de ve 25 ⁰C sıcaklıkta, 1 dakikada ethylidene-pNP-G7 den 1.0 µmol nitrofenol oluşturan amilaz miktarı olarak hesaplanmıştır.

3.2. Proteaz Testleri

Proteaz aktivitesi için katı ortamdaki denemeler bileşiminde (litrede) 0,2g Na₂HPO₄, 0.12g KH₂PO₄, 0,1 g MgCl₂, 0.12g CaCl₂, 0.12g Na₂CO₃, 0.36g glikoz ve 15g agar bulunan bazal besiyerine protein kaynağı olarak 10 g kazein ilave edilmesi ile hazırlanan besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Bu besiyerine aşıl原因an kültürler inkübasyon süresi sonunda incelenmiştir. Petri kaplarında gelişen kolonilerin etrafındaki açık zonlar kültürün proteaz enzim aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. Bu kültürler ileriki denemeler için işaretlenmiştir [44].

Katı kültür tarama testlerinde enzim ürettiği belirlenen tüm organizmalar sıvı kültürde enzim üretim miktarlarının belirlenmesi denemelerine alınmıştır. Sıvı kültür denemeleri 500ml’lik erlenlerde 200ml sıvı besiyeri ile gerçekleştirilmiştir. Her bir enzim için katı kültür denemelerinde de sıcaklıkta ve dönüş hızı 150rpm’e ayarlı orbital-horizontal çalkalayıcı üzerinde inkübasyona alınmıştır. Denemeler süresince

24 saatlik periyotlar ile sıvı besiyerlerinden aseptik koşullarda örnek alınarak enzim miktar analizleri yapılmıştır. Bu amaçla alınan besiyeri örneğinin santrifüjlenmesi ile hücreler çöktürülmüş ve elde edilen süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır [45].

Kültür süpernatandındaki proteaz enzim analizi spektrofotometrik metot kullanılarak yapılmıştır. Kısaca; öncelikle tripsin kullanılarak standart hazırlanmış ve bu standart, örneklerin enzim aktivitesi hesaplamalarında kullanılmıştır. Tripsin stok solüsyonu 50mg/ml olacak şekilde analiz tamponu içinde hazırlanmıştır. Bu solüsyondan 0,5mg/ml'den başlayarak farklı dilüsyonlar yine analiz tamponu içinde hazırlanıp tripsin standartları elde edilmiştir. Bu standartlar 450nm de ölçülerek standart grafiği elde edilmiştir. Daha sonra, 100µl süksinlenmiş kazein solüsyonu kuyucuklara eklenmiştir. Analiz tamponu da 100µl olarak kuyucuklara aktarılmıştır. 50µl süpernatant örneği hem kazein solüsyonu üzerine hem de analiz tamponu üzerine aktarılmıştır. Plakalar 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir kuyucuğa 50µl TNBSA çalışma solüsyonu eklenmiştir. 20 dakika daha oda sıcaklığında bekletilmiştir. Kuyucuklarda ki örneklerin absorbans değerleri 450nm de ölçülmüştür. Kazein içeren ve içermeyen kuyucuklarda ki ölçüm değerleri tripsin standardı ile hazırlanan ölçüm değerleri ile karşılaştırılarak örneklerin proteaz aktivite değerleri hesaplanmıştır [46].

Ayrıca çalışmanın son bölümünde enzim üreten organizmaların optimum gelişim parametreleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla farklı karbon kaynağı içeren katı besiyerlerine aşılana organizmaların gelişimi misel büyüme hızlarının düzenli ölçülmesi ile ve farklı pH ve sıcaklık değerleri kullanılarak yapılmıştır [47].

3.3. Çalışmada Kullanılan Ekipmanlar



Şekil 3.3.1. Etüv



Şekil 3.3.2. Spektrofotometre



Şekil 3.3.3. Otoklav



Şekil 3.3.4. Hassas Tartı



Şekil 3.3.5. Karıştırıcı

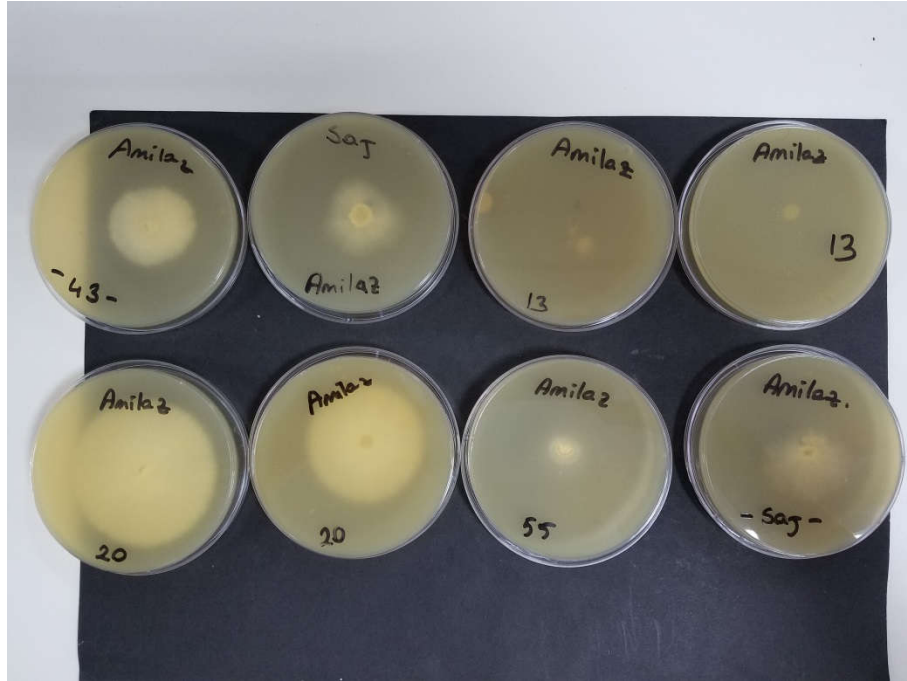
4. BULGULAR

4.1. Makrofungus Misellerinin Katı Besiyerinde Amilaz Enzim Aktivitesi Açısından Değerlendirilmesi

Çalışmamız kapsamında kullanılan 20 adet makrofungus suşuna ait misellerden katı besiyerinde beş tanesi amilaz enzimi için pozitif olarak belirlenmiştir. Bu beş makrofungus suşunun isimleri ve katı besiyerinde oluşturdukları zon çapları Tablo 4.1.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1.1. Amilaz Enzim Aktivitesi Gösteren Türler ve Zon Çapları Gösterimi

TÜR ADI	ZON ÇAPI (mm)
<i>Armillaria mellea</i>	25,0
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	20,0
<i>Russula fellea</i>	20,0
<i>Lentinula edodes</i>	7,0
<i>Postia stiptica</i>	3,0



Şekil 4.1.1. Amilaz Enzim Aktivitesi Gösteren Türler

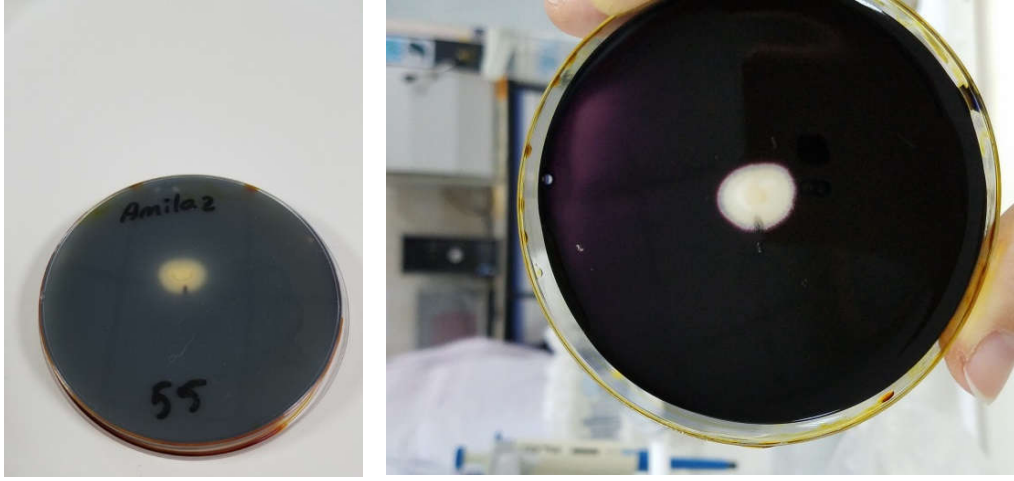
Amilaz enzimi için yapılan katı besiyeri tarama testlerinde en yüksek zon çapını 25 mm ile *Armillaria mellea* miselleri göstermiştir. Bu fungusu 20 mm zon çapı ile *Pleurotus sajor-caju* ve *Russula fellea* takip etmiştir (Tablo 4.1.1). Bu organizmalara ait Petri kabı görüntüleri ise Şekil 4.1.2 – 4.1.6.'da verilmiştir.



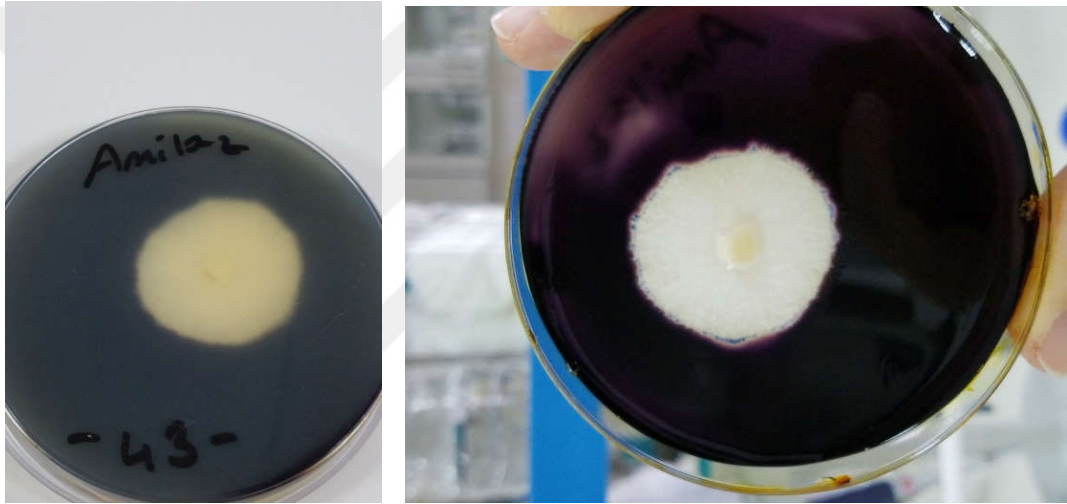
Şekil 4.1.2. *Armillaria mellea* (Petri üst ve alt görüntüleri)



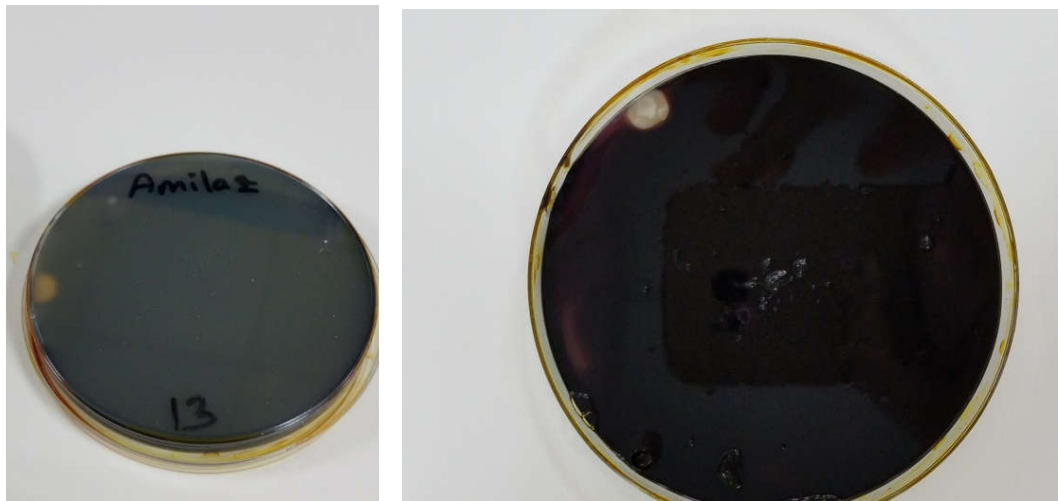
Şekil 4.1.3. *Pleurotus sajor-caju* (Petri üst ve alt görüntüleri)



Şekil 4.1.4. *Lentinula edodes* (Petri üst ve alt görüntüleri)



Şekil 4.1.5. *Russula fellea* (Petri üst ve alt görüntüleri)



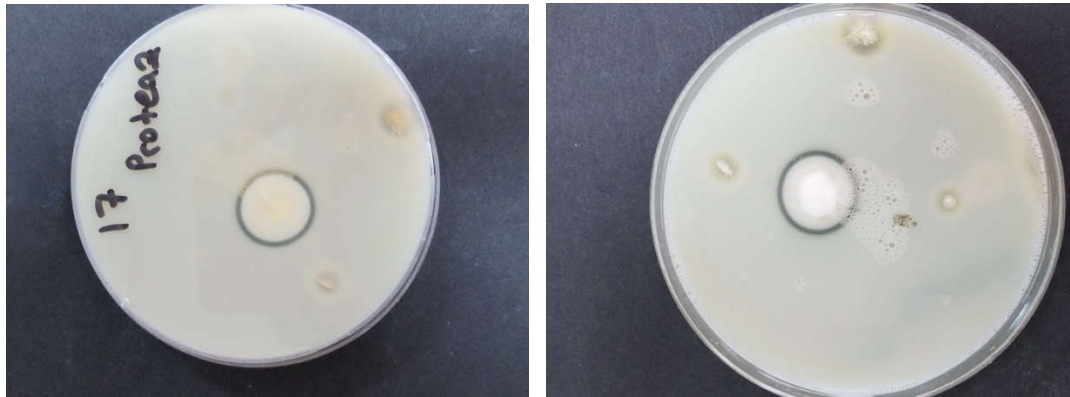
Şekil 4.1.6. *Postia stiptica* (Petri üst ve alt görüntüleri)

4.2. Makrofungus Misellerinin Katı Besiyerinde Proteaz Enzim Aktivitesi Açısından Değerlendirilmesi

Çalışmamız kapsamında kullanılan 20 adet makrofungus suşuna ait misellerden katı besiyerinde on tanesi proteaz enzimi için pozitif olarak belirlenmiştir. Bu on makrofungus suşunun isimleri ve katı besiyerinde oluşturdukları zon çapları Tablo 4.2.1’de verilmiştir.

Tablo 4.2.1. Proteaz Enzim Aktivitesi Gösteren Türler ve Zon Çapları Gösterimi

TÜR ADI	ZON ÇAPI (mm)
<i>Meripilus giganteus</i>	25,0
<i>Paxillus involutus</i>	24,0
<i>Armillaria mellea</i>	18,0
<i>Pleurotus eryngii</i>	15,0
<i>Lentinula edodes</i>	10,0
<i>Stropharia inuncta</i>	10,0
<i>Lentinula edodes</i>	10,0
<i>Pleurotus ostreatus</i>	10,0
<i>Inocybe leicocephala</i>	10,0
<i>Postia stiptica</i>	3,0

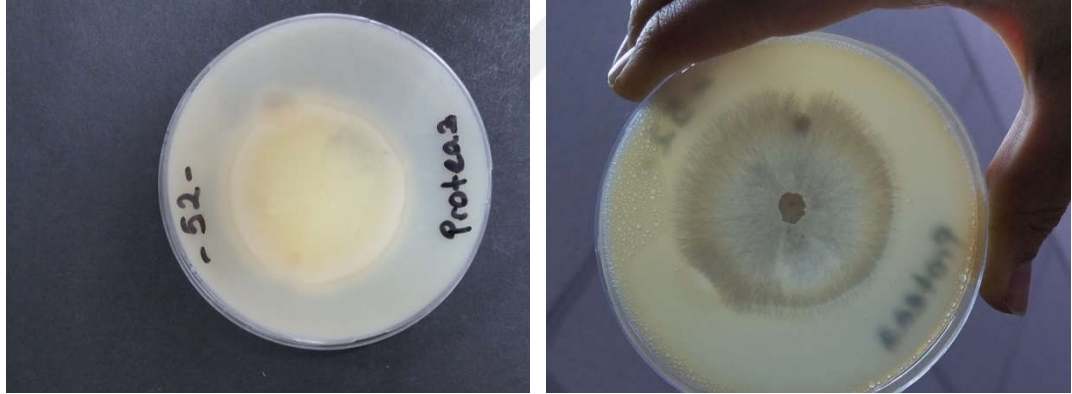


Şekil 4.2.1. *Inocybe leicocephala* (Petri üst ve alt görüntüleri)

Proteaz enzimi için yapılan katı besiyeri tarama testlerinde en yüksek zon çapını 25 mm ile *Meripilus giganteus* miselleri göstermiştir. Bu fungusu 24 mm zon çapı ile *Paxillus involutus* ve 18 mm zon çapı ile *Armillaria mellea* takip etmiştir (Tablo 4.2.1). Bu organizmalara ait Petri kabı görüntüleri ise Şekil 4.2.1 – 4.2.10’da verilmiştir.



Şekil 4.2.2. *Lentinula edodes* (Petri üst ve alt görüntüleri)



Şekil 4.2.3. *Paxillus involutus* (Petri üst ve alt görüntüleri)



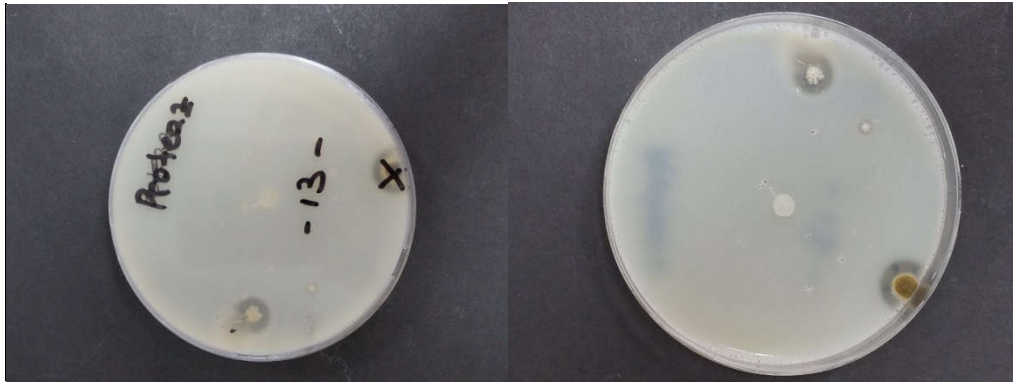
Şekil 4.2.4. *Pleurotus eryngii* (Petri üst ve alt görüntüleri)



Şekil 4.2.5. *Armillaria mellea* (Petri üst ve alt görüntüleri)



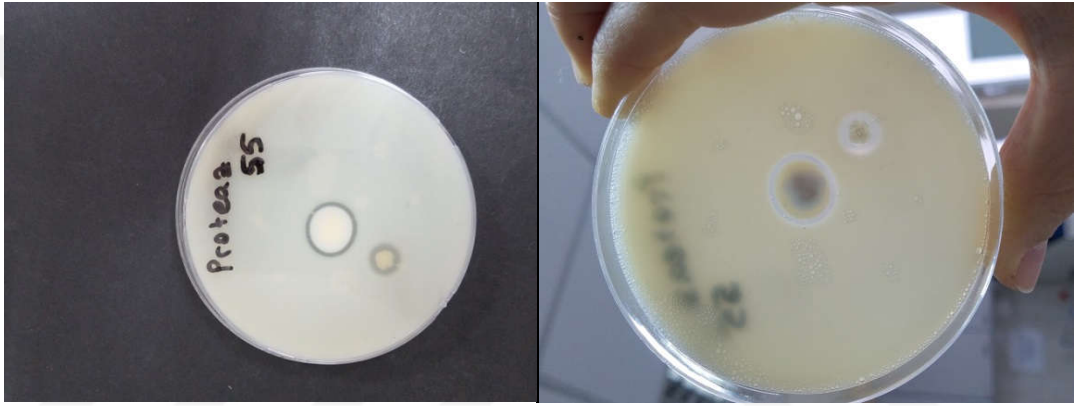
Şekil 4.2.6. *Pleurotus ostreatus* (Petri üst ve alt görüntüleri)



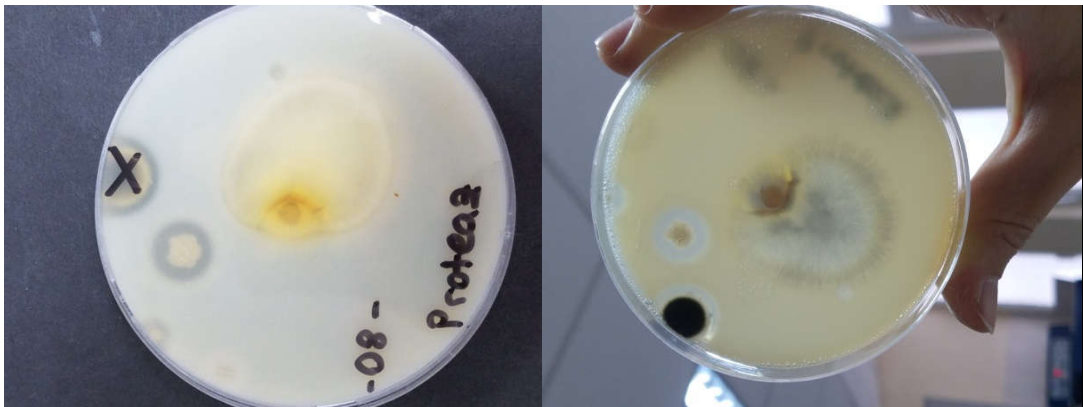
Şekil 4.2.7. *Postia stiptica* (Petri üst ve alt görüntüleri)



Şekil 4.2.8. *Stropharia inuncta* (Petri üst ve alt görüntüleri)



Şekil 4.2.9. *Lentinula edodes* (Petri üst ve alt görüntüleri)



Şekil 4.2.10. *Meripilus giganteus* (Petri üst ve alt görüntüleri)

4.3. Makrofungus Misellerinin Sıvı Besiyerinde Amilaz Enzim Aktivitesi Ölçüm Değerleri

Sıvı besiyerlerinde gerçekleştirilen ve üretilen amilaz enzim miktarının belirlenmesine yönelik testlerin 6. gününde elde edilen değerler ise Tablo 4.3.1’de verilmiştir.

Tablo 4.3.1. Makrofungus Misellerinin Amilaz Enzimi Üretim Değerleri

Makrofungus Türü	Amilaz Miktarı (U/ml)
<i>Armillaria mellea</i>	22.50
<i>Lentinula edodes</i>	12.63
<i>Postia stiptica</i>	11.69
<i>Russula fellea</i>	9.58
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	8.30

Bu sonuçlara göre katı besiyerinde yapılan enzim tarama testlerinde en yüksek zon çapını oluşturan *Armillaria mellea* sıvı besiyeri denemelerinde de en yüksek enzim üretim değerine sahip olarak tespit edilmiştir. Bu organizma 22.50 U/ml amilaz üretim değerine sahipken, *Lentinula edodes* 12.63, *Postia stiptica* ise 11.69 U/ml ile ikinci ve üçüncü sırada yer almışlardır (Tablo 4.3.1). Bu iki fungusun enzim üretim değerleri katı besiyeri denemeleri ile paralellik göstermemiştir. Bu da katı besiyeri denemelerinin tek başına enzim üreten organizma tespiti için yeterli olmadığı ve sıvı besiyeri denemelerinin mutlaka tamamlayıcı testler olarak yapılması gerektiğini göstermiştir.



Şekil 4.3.1. Sıvı Besiyeri Ortamı

4.4. Makrofungus Misellerinin Sıvı Besiyerinde Proteaz Enzim Aktivitesi Ölçüm Değerleri

Sıvı besiyerlerinde gerçekleştirilen ve üretilen proteaz enzim miktarının belirlenmesine yönelik testlerin 6. gününde elde edilen değerler ise Tablo 4.4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.4.1. Makrofungus Misellerinin Proteaz Enzimi Üretim Değerleri

Makrofungus Türü	Proteaz Miktarı (U/ml)
<i>Meripilus giganteus</i>	37.69
<i>Paxillus involutus</i>	29.30
<i>Lentinula edodes</i>	21.68
<i>Pleurotus eryngii</i>	18.70
<i>Pleurotus ostreatus</i>	16.50
<i>Armillaria mellea</i>	12.45
<i>Stropharia inuncta</i>	11.53
<i>Inocybe leicocephala</i>	9.91
<i>Lentinula edodes</i>	9.30
<i>Postia stiptica</i>	7.13

Bu sonuçlara göre katı besiyerinde yapılan enzim tarama testlerinde en yüksek zon çapını oluşturan *Meripilus giganteus* sıvı besiyeri denemelerinde de en yüksek enzim üretim değerine sahip olarak tespit edilmiştir. Bu organizma 37.69 U/ml proteaz üretim değerine sahipken, *Paxillus involutus* 29.30, *Lentinula edodes* ise 21.68 U/ml ile ikinci ve üçüncü sırada yer almışlardır (Tablo 4.4.1). *Lentinula edodes* bu enzim için de katı besiyeri denemelerine göre daha yüksek bir performans sergilemiştir.

4.5. Enzim Üreticisi Makrofungusların Gelişim Parametrelerinin Belirlenmesi

Proje kapsamında incelenen amilaz ve proteaz enzimleri yönünden diğer kültürlerle göre daha aktif oldukları saptanan *Armillaria mellea* ve *Meripilus giganteus*'un farklı karbon kaynakları, sıcaklık ve pH değerlerine göre misel gelişim hızları ise sırasıyla Tablo 4.5.1 ve Tablo 4.5.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.5.1. Farklı Karbon Kaynakları, Sıcaklık ve pH Değerlerinin *Armillaria mellea*'nın Misel Gelişimi Üzerine Etkileri (mm)

Gün	Karbon Kaynakları		Sıcaklık (°C)		Ph	
			(Sükroz içeren besiyerinde)		(Sükroz + 25°C'de)	
14	Fruktoz	82 ± 1.029	15	42 ± 1.877	4.5	55 ± 2.961
	Glikoz	80 ± 1.454	20	71 ± 1.407	5.0	69 ± 2.122
	Galaktoz	79 ± 1.312	25	85 ± 1.302	5.5	77 ± 1.286
	Sükroz	85 ± 1.692	30	80 ± 1.362	6.0	85 ± 1.469
	Maltoz	66 ± 1.390	35	40 ± 2.137	6.5	80 ± 1.087
	Laktoz	70 ± 1.880			7.0	72 ± 2.139
	Ksiloz	76 ± 1.708			7.5	65 ± 2.732
	Arabinoz	50 ± 1.848			8.0	57 ± 2.778

Tablo 4.5.2. Farklı Karbon Kaynakları, Sıcaklık ve pH Değerlerinin *Meripilus giganteus*'un Misel Gelişimi Üzerine Etkileri (mm)

Gün	Karbon Kaynakları		Sıcaklık (°C)		pH	
			(Fruktoz içeren besiyerinde)		(Fruktoz + 25°C'de)	
10	Fruktoz	85 ± 1.254	15	40 ± 1.421	4.5	62 ± 1.739
	Glikoz	78 ± 1.625	20	74 ± 1.365	5.0	76 ± 0.869
	Galaktoz	80 ± 1.457	25	85 ± 0.856	5.5	85 ± 1.520
	Sükroz	70 ± 1.865	30	82 ± 1.012	6.0	80 ± 0.627
	Maltoz	62 ± 1.568	35	39 ± 1.652	6.5	78 ± 1.847
	Laktoz	68 ± 1.874			7.0	64 ± 2.550
	Ksiloz	80 ± 1.054			7.5	60 ± 3.217
	Arabinoz	52 ± 1.965			8.0	58 ± 2.203

Tablo 4.5.1 ve 4.5.2'de verilen koloni gelişim değerlerine göre *Armillaria mellea* miselleri; karbon kaynağı olarak sükroz içeren besiyerinde, 25°C'de ve pH 6.0'da optimum gelişim göstermiştir. *Meripilus giganteus* miselleri ise; fruktoz içeren besiyerinde, 25°C'de ve pH 5.5'de optimum koloni gelişimi sergilemiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda kültür koleksiyonunda yer alan yirmi farklı makrofungus suşuna ait miseller amilaz ve proteaz enzimlerini üretim potansiyelleri açısından incelenmişlerdir. Çalışma katı besiyerinde gerçekleşen enzim üretimi tarama testi ve sıvı besiyerinde gerçekleşen enzim miktarı belirlenmesi testi olmak üzere iki ana kısımdan oluşmuştur. Katı besiyeri tarama testlerinde amilaz için beş, proteaz için on makrofungus pozitif olarak işaretlenmiştir. Sıvı besiyeri denemelerinde amilaz enzimi üretimi açısından *Armillaria mellea*, proteaz enzimi açısından ise *Meripilus giganteus* en yüksek üretim değerlerini vermişlerdir. Çalışmamız sonunda ayrıca bu iki makrofungusa ait misellerin optimum gelişim değerleri sıcaklık, pH ve karbon kaynakları bakımından incelenmiştir.

Lee ve ark. [48]; Healy ve ark. [49] çalışmalarında *Armillaria mellea*'dan izole ettikleri proteazların özelliklerini araştırmışlardır. Çalışmamızda ise *A. mellea* hem proteaz hem de amilaz üreticisi olarak belirlenmiştir. Pelaez ve ark. [50] ile Rehman ve ark. [51] çalışmalarında *A. mellea*'nın aynı zamanda bir ligninolitik enzim olan lakkaz yönünden de iyi bir üretici olduğunu göstermişlerdir.

Kalyoncu ve ark. [47], çalışmalarında 8 farklı makrofungus suşuna ait miselleri; Minimal kültür ortamı, Patates Dekstroz Agar, Hagem ortamı ve Malt Ekstrat Agar ortamlarına aşılıyarak, misellerin zaman içinde ne kadar büyüme gösterdiklerini tespit etmeye çalışmışlardır. Farklı içerikli besiyerlerine aktarılan makrofungus miselleri farklı büyüme değerleri sergilemiştir. Bu çalışmada *Meripilus giganteus* miselleri en hızlı gelişimi Patates Dekstroz Agar besiyerinde göstermiştir. Çalışmamız da ise *Meripilus giganteus* için optimum gelişim parametreleri fruktoz içeren besiyerinde, 25⁰C'de ve pH 5.5'de olarak belirlenmiştir.

Kalmış ve ark. [52] çalışmalarında ligninolitik enzim üreticisi makrofunguslar üzerine bir inceleme yapmışlardır. Bu araştırmada; çalışmamızda da kullanılan ve enzim üreticisi olduğu belirlenen *Meripilus giganteus* ve *Pleurotus ostreatus*'un enzim üretim değerleri kullanılan diğer organizmalara göre daha yüksek bulunmuştur.

Grimrath ve ark. [53] çalışmalarında bizim tarafımızdan da kullanılan ve yüksek enzim üretim değerleri elde ettiğimiz *Armillaria mellea* ve *Meripilus*

giganteus'un yüksek proteaz aktivitesine sahip olduklarını rapor etmişlerdir. Yine Schmidt ve ark. [54] *Meripilus giganteus*'tan izole ettikleri lakkaz enziminin özelliklerini içeren bir çalışma yapmışlardır.

Jonathan ve Adeoyo [55] 2011 tarihli çalışmalarında on farklı makrofungus suşunu amilaz ve selülaz enzimleri açısından incelemişlerdir. Bu çalışmada en iyi amilaz enzim üreticisinin *Agaricus sp.* suşu olduğu belirtilmiştir. Amilaz enzim üreticisi olan *Agaricus sp.*'nin farklı karbon kaynaklarına, sıcaklık derecelerine ve pH isteklerine göre misel gelişimi üzerine yaptıkları denemelerde 25°C sıcaklıkta, pH; 5.8'de ve glikoz içeren ortamda en verimli misel gelişimi gösterdiğini belirlemişlerdir. Çalışmamızda ise amilaz enzim aktivitesi yüksekliği gösteren *Armillaria mellea*'nın 25°C sıcaklıkta, pH; 5.5'de ve sükroz içeren besiyerinde optimum misel gelişimi olduğu tespit edilmiştir.

Özkan ve ark. [56], ülkemizden izole edilen *Pleurotus ostreatus*'a ait misellerin biyoprotein üretimi için en uygun gelişim koşullarını belirlemeye çalışmışlardır. Çalışma sonunda makrofungusun optimum sıcaklık isteğinin 30°C, pH isteğinin ise 8.0 olduğu belirlenmiştir. Bu değerler çalışmamızda elde ettiğimiz optimum gelişim değerlerine göre yüksek bulunmuştur. Fungusların asidik ortamları daha çok tercih etmelerine rağmen bu çalışmada kullanılan makrofungusun pH 8.0'da iyi bir gelişim göstermesinin toplandığı habitatın kimyasal toprak yapısı ile ilgili olabileceği değerlendirilmiştir.

Krupodorova ve ark. [57], çalışmalarında 30 farklı makrofungusun amilaz, lipaz, lakkaz, üreaz ve proteaz aktivitelerini incelemişlerdir. Bu çalışmada tüm incelenen makrofungusların amilaz ürettiği, proteaz içinse sadece altı makrofungusun üretici olarak belirlendiği belirtilmiştir. Bu çalışma ile çalışmamız arasında altı makrofungus türü benzerlik göstermektedir. Benzerlik gösteren makrofunguslar *Pleurotus ostreatus*, *P. eryngii*, *P. djamor*, *Lentinula edodes*, *Ganoderma lucidum* ve *Fomes fomentarius*'tur. *Lentinula edodes* türü her iki çalışmada da proteaz ve amilaz üreticisi olarak saptanmıştır.

Khaund ve Joshi [58], 2014 tarihli çalışmalarında on farklı makrofungusta amilaz, selülaz, proteaz, tirozinaz ve lakkaz enzim incelemesi yapmışlardır. Bu çalışmada kullanılan makrofunguslar arasında yer alan *Inocybe sp.* amilaz üretiminde

ilk sırayı almıştır. Çalışmamızda kullanılan *Inocybe leicocephala* ise amilaz yönünden negatif proteaz yönünden ise pozitif olarak tespit edilmiştir.

Gutierrez – Soto ve ark. [59], çalışmalarında yetmiş dört yerli makrofungus suşunda amilaz, ksilanaz, lakkaz ve selülaz enzimlerinin incelemelerini yapmışlardır. Bu çalışmada kullanılan *Armillaria sp.*'nin amilaz enzim aktivitesi yönünden iyi olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda da kullanılan *Armillaria mellea* en yüksek amilaz enzimi üreticisi olarak saptanmıştır.

Balaes ve ark. [60] yaptıkları meta analizde ligninaz üreticisi makrofungusları değerlendirmişlerdir. Bu amaçla fungus enzimleri hakkındaki 101 araştırmayı inceleyen yazarlar çalışmamızda da farklı düzeylerde amilaz ve proteaz üreticisi olarak değerlendirdiğimiz *Armillaria mellea*, *Fomes fomentarius*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Meripilus giganteus*, *Pleurotus ostreatus* ve *Postia stiptica*'nın literatürde farklı enzimleri üreten organizmalar olarak rapor edildiğini belirtmişlerdir.

Funguslar ekolojik rolleri gereği çok farklı enzimleri üretme potansiyeline sahiptirler. İnsan hayatını kolaylaştırıcı etkileri nedeni ile enzimlere olan talep ve dolayısı ile maliyet giderek artmaktadır. Pek çok sektörde kullanılan farklı enzimlerin tedarikinde dışa bağımlılığı azaltmanın temel yolu yerel kaynakların kullanıma alınmasıdır. Ülkemize ait biyolojik kaynakların bu maksatla incelenmesi ve yüksek verimli organizmaların belirlenmesi büyük önem arz etmektedir. Tez çalışmamız ile ülkemizden elde edilen makrofunguslara ait misel koleksiyonundaki bireylerin endüstride sık kullanılan iki farklı enzim açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla gerçekleştirilen denemeler neticesinde her bir enzim için yüksek üretim potansiyeline sahip organizmalar tespit edilmiştir. Çalışmamız ile ülkemize ait kaynakların ekonomik değerleri ön plana çıkarılarak kullanılmalrı ve takip eden süreçte korunmaları amacıyla yapılacak başka çalışmalara öncülük edilmesi de hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda elde edilen verilerin ileriki çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKÇA

- [1] Karaca, O.B., Güven, M. Mikrobiyolojik kaynaklı proteolitik ve lipolitik enzim kullanımının beyaz peynirlerin özellikleri ve olgunlaşma hızları üzerine etkileri. Gıda Dergisi. 2004, 29 (3), 239–248.
- [2] Tamer, A.Ü. , Gücin F., Solak H. Mikolojiye Giriş, Manisa/Türkiye 2005, 207.
- [3] Balkan, B., Katı substrat fermentasyonu ile ham nişastayı parçalayan yeni bir fungal amilaz üretimi, saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD / Edirne. 2008, [Doktora Tezi].
- [4] Cowan, D., Industrial enzyme technology. Trends in Biotechnology. 1996, 14(6), 177 – 178.
- [5] Telefoncu, A., Enzimoloji. Ege Üniversitesi Yayınevi, İzmir. 1997, 144s.
- [6] Karaoğlu, M., Yüksek fruktozlu mısır şurubu. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mühendisliği Dergisi, Erzurum. 2011, 33. Sayı, 12 s.
- [7] Poyrazoğlu, A.G. Nişasta endüstrisi atık sularının bitki yetiştirilmesinde kullanım olanaklarının araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana. 2007, 68s. (5). [Yüksek Lisans Tezi].
- [8] Özcan, S., Modern Dünyanın vazgeçilmez bitkisi mısır: Genetiği değiştirilmiş (transgenik) mısırın tarımsal üretime katkısı. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 2009, 2(2): 01-34.
- [9] Wambutt, R., Riesenber, D., Kruger, M., Schultze, M. Formation of extracellular α - amylase by *Bacillus subtilis* in relation to guanosine polyphosphates. zeitschrift für allgemeine mikrobiologie. 1984, 24 (8), 575 – 579.
- [10] Öztürk A., Çopur Ö.U., Mantar bileşenlerinin teröpatik etkileri. Dergi Park Akademi. 2009, Bahçe 38 (1): 19-24.
- [11] Karakaya, D., Makrofungusların antimikrobiyal aktiviteleri ve diğer tıbbi etkileri. Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilimdalı Kayseri. 2012, 47s. [Bitirme Ödevi]
- [12] Yardımcı, E. *Geobacillus subterraneus* ile proteaz üretimi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü / Eskişehir. 2014, [Yüksek Lisans Tezi].

- [13] Tolan, M. Mikrobiyal kökenli proteaz üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik ABD. Tokat. 2015, [Yüksek Lisans Tezi].
- [14] Vihinen, M., Mantsala, P., Microbial amyolytic enzymes. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 1989, 24, 329 – 418.
- [15] Windish, W.W., Mhatra, N.S. Microbial amylase. Adventure Applied Microbiology. 1965, 7, 273 – 304.
- [16] Upadek, H., Kottwitz, B. Application of amylases in detergents. Enzymes. 1997, 203 – 212.
- [17] Tatar, S., Termofil moderately halofilik *Bacillus sp.* suşlarından amilaz enzim üretimi ve endüstriyel kullanım olanaklarının araştırılması; Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 2007, 9-11. [Yüksek Lisans Tezi].
- [18] Crabb, W.D., Mitchinson, C. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. Trends Biotechnology. 1997, 15, 349 – 352.
- [19] Sarıkaya, E., Higasa, T., Adachi, M., Mikami, B. Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. Process Biochemistry. 2000, 35, 711 – 715.
- [20] Okolo, B.N., Ire, F.S., Ezeogu, L.I., Anyanwu, C.U., Odibo, J.C. Purification and some properties of a novel raw starch digesting amylase from *Aspergillus carbonarius*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2000, 81, 329 – 336.
- [21] Tekin, N. Türkiye kaynaklı *Bacillus spp.*lerin alkalen proteaz üretim kapasiteleri ve enzimlerin kısmen karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 2008, [Yüksek Lisans Tezi].
- [22] Wiseman, A. Handbook of enzyme biotechnology. 1987, Second Edition. 373 p.
- [23] Sarı, E. *Bacillus circulans* M34'ten proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 2011, [Yüksek Lisans Tezi].
- [24] Anwar, A., Saleemuddin, M. Alkaline protease: a review. Bioresource Technology. 1997, 64, 175 – 183.
- [25] Dey, G., Mitra, A., Banerjee, R., Maiti, B.R. Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology. Biochemical Engineering Journal. 2001, 7, 227 – 231.

- [26] Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998, 62, 597 – 635.
- [27] Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. and Mehta, P.Kumar. Mikrobial enzymes: Industrial progress in 21st Century. 2016, 3 *Biotechnology Dec*; 6(2): 174.
- [28] Türe, Dr. C., Özata A., Enzim aktivitelerinin tayininde kullanılan yöntemler. Nisan 2018, [www.biyologlar.com – 24.08.2018].
- [29] Aksoy, E. Spektrofotometre nedir? Çalışma prensipleri nelerdir? 2017. [prosafty.com.tr/spektrofotometre-nedir-calisma-prensibi-nasildir – 24.08.2018].
- [30] Wnag, X., Ng, T.B. Pleureryn, a novel protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001, 289, 750 – 755.
- [31] Hwal, W., Janet, B. etc. Acid protease production by fungi used in soybean food fermentation, *American Society for microbiology Applied and Enviromental microbiology*. 1974, Vol.27, No:5 906-911.
- [32] Buswell, J.A., Chang, S. Biomass and extracellular hydrolytic enzyme production by six mushroom species grown on soybean waste. *Biotechnology Letters*. 1994, 16 (12), 1317 – 1322.
- [33] Figueira Edson, L. Z. and Hirooka Elisa Y., Culture medium for amylase production by toxigenic Fungi. 2000, 43(5), 461-467.
- [34] Romachandran, S., Patel Anıl, K., Madhavan, K., etc. Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. *Brazilian archives of Biyology and tecnology*. 2004, 47(2), 309-317.
- [35] Gupta, A., Khare, S.K. A protease stable in organic solvents from solvent tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource Technology*. 2006, 1788 – 1793.
- [36] Nugren Cajsa, M.R., Edqvist, J., Elfstrand, N. etc.. Detection of extracellular protease activity in different species and genera of ectomycorrhizal fungi volume. May 2007, 17 Pp: 241-248.
- [37] Uğuz, Ş. Pastırmadaki proteolitik değişmelere tuz miktarının etkisi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği ABD, Ankara. 2007, [Yüksek Lisans Tezi].
- [38] Machado, A.G., Teixeira, M.F., Kirsch, L.S., Campelo, M.L., Oliveira, M.A. Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state

fermentation og lignocellulosic waste from tropical region. Saudi Journal of Biological Sciences. 2016, 23(5), 621 – 627.

[39] Liu, X., Kopperapu, N., Li, Y., Deng, Y., Zheng, X. Biochemical characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Cordyceps militaris*. International Journal of Biological Macromolecules. 2017, 793 – 801.

[40] Tatsumi, E., Konishi, Y., Tsujiyama, S. Application of residual polysaccharide-degrading enzymes in dried shiitake mushrooms as an enzyme preparation in food processing. Biotechnology Letters. 2016, 38(11), 1923 – 1928.

[41] Kalyoncu, F., Oskay, M., Sağlam, H., Erdoğan, T.F., Tamer, A.Ü. Antimicrobial and antioxidant activities of mycelia of 10 wild mushroom species. Journal of Medicinal Food. 2010, 13(2), 415 – 419.

[42] Silambarasan, S., Abraham, J. Comparative analysis on immobilized cells of *Aspergillus oryzae* and *Bacillus cereus* in production of amylase by solid state and submerged fermentation. European Journal of Experimental Biology. 2013, 3(3), 178 – 183.

[43] Cui, L., Liu, Q.H., Wang, H.X., Ng, T.B. An alkaline protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2007, 75(1), 81 – 85.

[44] Gole, A., Dash, C., Soman, C., Sainkar, S.R., Rao, M., Sastry, M. On the preparation, characterization and enzymatic activity of fungal protease. Bioconjugate Chemistry. 2001, 12(5), 684 – 690.

[45] Kathiresan, K., Manivannan, S. α -amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. African Journal of Biotechnology. 2006, 5(10), 829 – 832.

[46] Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R. Advances in microbial amylases. Biotechnology and Applied Biochemistry. 2000, 135 – 152.

[47] Kalyoncu, F., Kalmış, E., Solak, M.H. Bazı makrofungus türlerine ait misellerin farklı kültür ortamlarındaki gelişim hızlarının belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2008, 12 (2), 109 – 114.

[48] Lee, S.Y. and etc., Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Armillaria mellea* Protein Expression and Purification. 2005, 10-17.

- [49] Healy, V. and etc., The lysine-specific proteinase from *Armillaria mellea* is a member of a novel class of metalloendopeptidase located in basidiomycetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999, 60-63.
- [50] Pelaes, F., Martinez, M.J., and Martines, A.T., Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycological Research*. 1995, 99(1), 37-42.
- [51] Rehman, A.U. and Thurston, C.F., Purification of laccase I from *Armillaria mellea*. *Journal of General Microbiology*. Printed in Great Britain. 1992, 1252-1257.
- [52] Kalmış E. Ve ark., Ligninolytic enzyme activities in mycelium of some wild and commercial mushrooms. *African Journal of Biotechnology Academic Journals*. 2008, Vol. 7(23) pp. 4314-4320.
- [53] Grimrath, A. and etc., Koji fermentation based on extracellular peptidases of *Flammulina velutipes*. *Eur Food Res. Technology*. 2011, 415-424.
- [54] Schmidt, G. and etc., A surfactant tolerant laccase of *Meripilus giganteus*. *World J. Microbiol Biotechnol*. 2012, 1623-1632.
- [55] Jonathan Adeoyo, S., Richard, O., Effect of environmental and nutritional factors on mycelial biomass yield of ten wild Nigerian mushrooms during cellulase and amylase production. *Ejeafche*. 2011, 10(9), 2891-2899.
- [56] Özkan, C., Yamaç, M., Yıldız, Z., *Pleurotus ostreatus* makrofungusu ile derin kültür koşullarında biyoprotein üretiminin optimizasyonu. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*. 2013, 35-42, [Araştırma makalesi].
- [57] Krupodorova, T., Ivanova, T., Barshteyn, V., Screening of extracellular enzymatic activity of macrofungi. *Instute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine*. 2014, 3(4), 315-318.
- [58] Khaund, P., Joshi, S.R., Enzymatic profiling of wild edible mushrooms consumed by the ethnic tribes of India. *The Korean Society for Applied Biological Chemistry and Springer*. 2014, 57(2), 263-271.
- [59] Gutierrez – Soto, and etc., Native macrofungi that produce lignin-modifying enzymes, cellulases, and xylanases with potential biotechnological applications. *Bioresources*. 2015, 10(4), 6676-6689.

[60] Balaes, T., Petre, C.V., Ungureanu,C., Mardari, C., Tanase, C., Ligninolytic enzyme system in ecological adaptation of lignicolous macrofungi. Applied Ecology and Enviromental Research. 2017, 15(1): 207-224.



ÖZGEÇMİŞ

GÖKÇE CANAN ALTAYLI

gkccananaltayli@hotmail.com

0506 633 42 42

GENEL BİLGİLER

Eğitim Lisans / 2013 Haziran Mezunu
Doğum Tarihi 16.02.1991
Sürücü Belgesi B Sınıf / 2010 (Aktif olarak kullanıyorum)

EĞİTİM BİLGİLERİ

2014- **Celal Bayar Üniversitesi**
Fen Bilimleri Enstitüsü- Yüksek Lisans (Temel Endüstriyel Mikrobiyoloji Bölümü-
Tez Aşaması)
2009 - 2013 **Celal Bayar Üniversitesi**
Fen Edebiyat Fakültesi – Biyoloji Bölümü
2005 - 2009 **Karşıyaka Gazi Lisesi**
1998 – 2005 **Zübeyde Hanım İlköğretim Okulu**

STAJ- İŞ DENEYİMLERİ

**Kasım 2013- Ağustos 2018 İzmir MedicalPark Hastanesi- Mikrobiyoloji ve
Biyokimya Laboratuvarı** (Biyolog olarak çalıştım)
**May. 2012 – Ekim 2012 Celal Bayar Üniversitesi – Tıp Fakültesi- Patoloji
Laboratuvarı**
Stajyer- Kısmi Zamanlı Öğrenci
**Tem. 2012- Agst. 2012 MedicalPark İzmir Hastanesi –Mikrobiyoloji ve
Biyokimya Laboratuvarı**
Stajyer
Eyl. 2011- Ekm 2011Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi – Patoloji Laboratuvarı
Stajyer

NİTELİKLER

Yabancı Dil **İngilizce:** **Okuma** – İyi , **Yazma** – Orta , **Konuşma** –Orta.
Bilgisayar Bilgileri MS Ofis Programları (Word, Excel, Powerpoint, Outlook).
İlgi Alanları Kitap okuma, Sinema, Tiyatro, Opera ve Bale, Yüzme,
Seyahat

BAŞARILARI:

3-4 Şubat Temel İlk Yardım Eğitimi (İlk Yardımcı) Sertifikası
3– 5 Temmuz 2017 Manisa Celal Bayar Üniversitesi
1st INTERNATIONAL EURASIA MYCOLOGY CONGRESS
Nisan 2017 Manisa Elginkan Vakfı(ÜEMTEM) Stratejik Pazarlama Yönetimi
Mart 2016 Karşıyaka American House Dil Okulları – A2 seviyesi
20-23 Ekim 2015 Çukurova Üniversitesi
X. Türkiye Yemeklik Mantar Kongresi (Katılım Belgesi)
31 Mart 2013 Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu (EBİLTET)
Kanser Biyolojisi ve Genetiği Sempozyumu (Katılım Belgesi)
30 Nisan 2011 Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu (EBİLTET)
Geleneksel 3. Kök Hücre Sempozyumu (Katılım Belgesi)
27 Ekim 2011 Türkiye Soroptimist (İş ve Meslek Kadınları) Kulüpleri
Federasyonu Teşekkür Belgesi
29 Ekim 2005 Türk Hava Kurumu Genel Başkanlığı
Model Uçak ve Model Roket Sertifikası Başlangıç C seviyesi

YURTDIŞI SEYAHAT DENEYİMLERİ:

2011 Temmuz: Yunanistan (Atina)
2012 Aralık: Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti
2018 Mayıs Amerika Birleşik Devleti