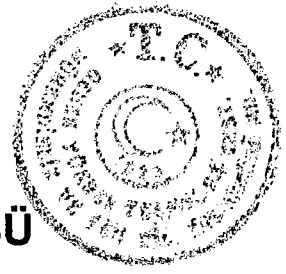


T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ  
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



77729

**TÜRKİYE'NİN DOMİNANT  
MİKOFLORASINDAKİ *PENICILLIUM*  
TÜRLERİNDE BAZI ENZİMATİK  
AKTİVİTELERİN BELİRLENMESİ**

Ceyda PEMBEÇİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

77729

**DANIŞMAN**

Yrd. Doç. Dr. Aziz TANRISEVEN

**GEBZE 1998**



Bu tez çalışması, G.T.Y.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 01-09-1998 tarih ve 98/24 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

*A. Tanrıseven*

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Aziz TANRISEVEN  
(Tez Danışmanı)

*Seminur Topal*

ÜYE : Doç. Dr. Şeminur TOPAL

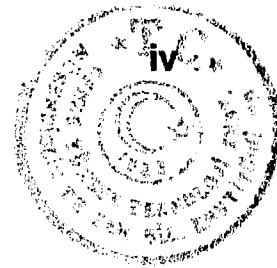
ÜYE : Prof. Dr. Yavuz SEZEN

*Yavuz Sezen*

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
22/10/1998... tarih ve 98/31... sayılı kararı.



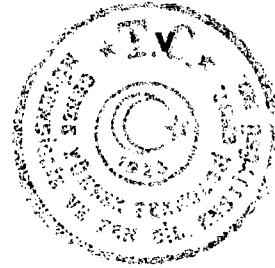


## ÖZET

Bu çalışmada Türkiye'nin tarımsal mikoflorasının baskın üyelerinden olan *Penicillium* spp. kültürlerinin proteaz ve amilaz üretme yetenekleri kalitatif olarak belirlenmiştir. Bu amaçla 41 ayrı türde toplam 1006 adet *Penicillium* spp. kültürü taranmıştır. Proteaz aktivitelerini belirlemek için "Derin Kültürle Opasite Kapasitesi", amilaz aktivitelerini belirlemek için ise "Diffüzyon İle Zon Kontrolü" teknikleri kullanılmıştır.

Araştırma sonucunda incelenen *Penicillium* sp. kültürlerinden 773 adedi proteolitik ve 481 adedi ise amilolitik aktivite açısından pozitif olarak saptanmıştır. İncelenen kültürler arasında amilolitik aktivitesi tartışılabilir ( $\pm$ ) olanlar 363 adet, negatif olanlar ise 162 adet olarak bulunmuştur. Buna göre taraması yapılan *Penicillium* kültürlerinden %77'si proteaz, %48'i amilaz üretme yeteneğine sahiptir.

İncelenen *Penicillium* türlerinin ilgili enzimatik potansiyellerinin belirlenmesi hem endüstriyel hem de bilimsel alandaki çalışmalara temel oluşturacak niteliktedir.

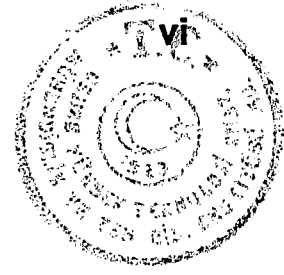


## SUMMARY

In this research, qualitative screening of protease and amylase producing abilities of *Penicillium* sp. which is a dominant culture in Turkish agricultural mycoflora were determined. For this reason 1006 *Penicillium* sp. was screened. Methods used for enzyme determination cover "Opacity Capacities in Deep Culture Technique" for protease, "Clear Zone in Diffusion Technique" for amylase.

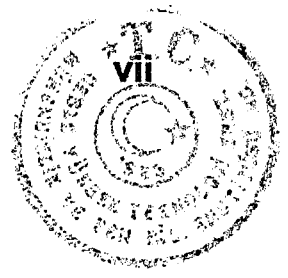
Totally 1006 *Penicillium* sp. were analysed for protease and amylase activities. It was observed that 773 culture showed proteolytic activity, 481 of them has positive amylolytic activity. Among all the cultures 363 of them have moderate amylolytic activity, 162 of them doesn't have any amylolytic activity. According to these results 77% protease and 48% amylase producing abilities were determined in 1006 mould culture. Determination of enzyme producing potentials of *Penicillium* spp. will base on industrial and scientific research areas.

# TEŞEKKÜR



Tez konumun seçilmesinde ve çalışmamın ilk aşamasından son aşamasına kadar yönlendirilmesinde, engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Doç. Dr. Şeminur TOPAL'a, çalışmamın tüm aşamalarının gerçekleşmesinde gerekli olan laboratuvar, sarf malzemesi ve diğer benzeri ihtiyaçların karşılanmasındaki katkılarından dolayı TÜBİTAK MAM Gıda Bilimi ve Teknolojileri Araştırma Enstitüsü (GBTAE)'ne ve Enstitü Müdürü Doç. Dr. Güner ÖZAY'a, enzimatik aktivite analiz aşamasında değerli bilgilerini, tecrübesini, hoşgörüsünü ve yardımlarını esirgmeden sunan Sayın Dr. Mehmet BATUM'a, tezimin hazırlanması aşamasındaki katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Aziz TANRISEVEN'e, fakülteadaki yardımlarından dolayı Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdülkadir AKÇİN'e, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını hiçbirzaman esirgemeyen TÜBİTAK MAM GBTAE teknisyenlerine, çalışmamın ORBA Biyokimya A.Ş.'deki aşamasındaki yardımlarından dolayı ORBA çalışanlarına, her türlü destek ve yardımlarından dolayı öncelikle ağabeyime, anneme, babama ve tüm dostlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER



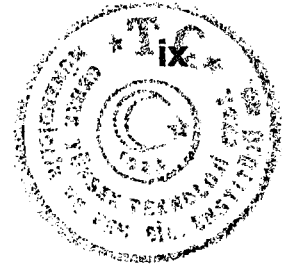
	<u>SAYFA</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	ix
FOTOĞRAFLAR	x
ÇİZELGELER	xi
1. GİRİŞ	1
2. KONU İLE İLGİLİ YAYIN VE ÇALIŞMALAR	5
2.1. Genel Bilgiler	5
2.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması	6
2.1.2. Enzim Kaynakları	7
2.1.3. Proteazlar	9
2.1.3.1. Proteazların Üretiminde Kullanılan Kaynaklar ve Uygulama Alanları	10
2.1.4. Amilazlar	12
2.1.4.1. Kullanım Alanları	14
3. MATERYAL VE METOD	17
3.1. Materyal	17
3.2. Metod	24
3.2.1. Enzimatik Aktivitesi Belirlenecek Küf Kültürlerinin Transfer İşlemleri	24
3.2.2. Proteaz Üretme Yeteneklerinin Araştırılması	25
3.2.3. Amilaz Üretme Yeteneklerinin Araştırılması	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	29
5. SONUÇ	42
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	47



## SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
°C	Derece Santigrat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
d.H <sub>2</sub> O	Distile Su
FDA	Gıda ve İlaç Teşkilatı
GBTAE	Gıda Bilimi ve Teknolojisi Araştırma Enstitüsü
GMBAE	Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü
GRAS	Normal koşullarda güvenli kabul edilen
MA	Malt Agar
MAM	Marmara Araştırma Merkezi
NATO	Kuzey Atlantik Savunma Paktı
PDA	Patates Dekstroz Agar
pH	Ortamdaki hidrojen iyonu konsantrasyonu
RNA	Ribo Nükleik Asit
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu
U	(Ünite) Standart koşullar altında dakikada 1µmol substratı dönüşüme uğratan enzimin aktivitesidir
U/ml	Ünite / millilitre
YNB	Yeast Nitrogen Base

# ŞEKİLLER

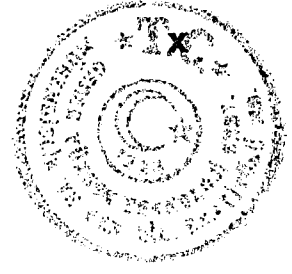


<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Proteaz aktivitesinin analiz basamakları	26
3.2. Amilaz aktivitesinin analiz basamakları	28
4.1. Proteolitik aktivite taraması yapılan <i>Penicillium</i> kültürlerinin 3. ve 7. günlerdeki berraklık derinliği ölçümlerinin ortalama değerleri	34
4.2. Proteolitik aktivite taraması yapılan <i>Penicillium</i> kültürlerinin 3. gün berraklık derinliği ortalaması ile 7. gün berraklık derinliği ortalaması değerleri	35





# FOTOĞRAFLAR



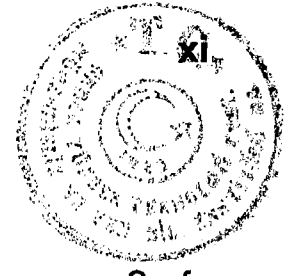
## Fotoğraf

## Sayfa

4.1. Proteolitik aktivite taramaları sonucunda denenen farklı kültürlerin kontrole karşılık görüntüleri	32
4.2. Amilolitik aktiviteye sahip birkaç kültürün aktivite testi sonucundaki görüntüleri	38



# ÇİZELGELER



## Çizelge

## Sayfa

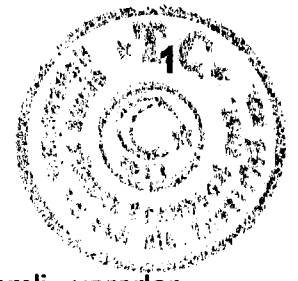
- 4.1. Berraklık derinliğine göre proteolitik aktivite ölçüm sonuçları
- 4.2. Opasite durumuna göre amilolitik aktivite analiz sonuçları

30

39



# 1.GİRİŞ



Günümüzün gelişen teknolojisi ile birçok yönden önemli yararlar sağlamamızın yanısıra, bunun getirdiği birçok sorun ile doğal kaynaklar gün geçtikçe azalmaktadır. Bunun önemini bilen ve çok iyi kavrayan bilim adamları alternatif potansiyel kaynaklar bulma çabası içindedirler.

Bilindiği üzere Türkiye, coğrafi konumu gereği önemli düzeylerdeki biyolojik çeşitliliğe sahip bir ülkedir ve aynı zamanda özgün ekolojik koşullara bağlı olarak, florası da özeldir. Bu kaynaklarımızın ekolojik dengesi bozmadan kullanım alanlarını geliştirerek daha da önem kazanmasını sağlayabilmek mümkündür. Böylece yapılan çalışmalar hem kültürel hemde ekonomik gelişmemiz için önemli bir sonuç olacaktır.

Özellikle son zamanlarda artan bir hızla önem kazanan biyoteknoloji, tüm biyolojik zenginliklerden en üst düzeyde yararlanabilmemiz için pekçok araştırmaya ortam hazırlayan bir bilim dalıdır. Ayrıca, biyoteknoloji var olan teknolojilerin daha ucuza maledilmesi, daha kaliteli olması ve aynı zamanda yaşadığımız çevreye zarar vermeden uygulanabilmesi için de incelemeler yapmaktadır.

Biyoteknolojinin konularından biri de enzim üretimidir. Enzimler, mikrobiyal hücrelerin primer metabolitlerinden olup kimyasal reaksiyonlarda biyolojik katalizör olarak rol oynarlar. Enzim, kelime anlamı ile; biyolojik aktiviteye sahip ve kimyasal reaksiyonları katalizleyen özel proteinlerdir. Enzimler canlı hücreler tarafından özel biyolojik koşullarda sentez edilmektedir, fakat aktivite göstermeleri için mutlaka hücre içinde bulunmaları gerekmez (Gözükara, 1989). Enzim kullanımı çok eski tarihlere dayanmaktadır. Hatta insanlık tarihinin başlangıç dönemlerinden bu yana işlevleri bilinmeden de kullanılmışlardır (Dağışan, 1997).



Bazı alkollü içeceklerin hammaddesi olan şekerin nişastadan üretiminde kullanılan amilaz, peynir üretiminde sütü pıhtılaştırma, mide mukozası ve eti yumuşatan papaya suyu, enzimlerin eski dönemlerden beri kullanımlarına sadece birkaç örnektir. Pankreas, mide mukozası, malt ve papaya meyvesi gibi hayvansal veya bitkisel kaynaklardan elde edilen çeşitli enzimatik ürünler; tekstil, deri, gıda, alkollü içecek ve diğer endüstrilerde kullanılmaya başlanmıştır. Biyokatalitik enzimlerin keşfi ve işlevlerinin saptanmasından sonra benzer sonuçları veren daha iyi, daha ucuz ve daha elverişli enzim kaynakları aranmaya başlanmıştır. Bir yandan enzimlerin endüstriyel üretiminde kaydedilen gelişmeler ve sürekli olarak iyileştirilen yöntemler, diğer yandan enzimatik yöntem ve uygulamaların daha iyi kavranıp kontrol edilmesi çok sayıda enzimin kullanıma sunulmasına ve ticari üretilmeye yol açmıştır. Enzimler bitkisel ve hayvansal kaynakların yanında çeşitli mikroorganizmalardan da üretilmektedir. Teknik ve ekonomik avantajları nedeniyle mikrobiyal enzimlerin önemi gittikçe artmaktadır. Yüksek yapılı bitki ve hayvan hücreleri özel fonksiyonlara hizmet eder ve bu özel fonksiyonları kapsayan reaksiyonları katalizlemesi için gerekli olan enzimleri üretirler. Mikrobiyal hücreler ise metabolizması için gerekli olan çok sayıda enzimi üretebilirler. Mikrobiyal hücrelerin 2500'den fazla farklı enzimi üretebilecek kapasiteye sahip oldukları çeşitli araştırmalarla ortaya konulmuştur (Underkofler, 1976).

Hayvansal ve bitkisel kaynaklar, birçok farklı kullanım alanları olduğu için zamanla sınırlı kalmaktadır. Hem hayvansal hemde bitkisel kaynaklar mevsimsel üretime sahiptir. Çevresel şartlar kopya edilemediğinden sonuçta elde edilen enzimlerin kalitesi birbirinden farklı olmaktadır. Buna karşın mikrobiyal kaynaklar, sınırsız kaynaklardır. Mikroorganizmalar çok hızlı çoğalırlar ve gelişimleri sırasında kısıtlı miktardaki kaynaklarla yaşamlarını sürdürebilirler; diğer bir ifadeyle ekonomiktir. Mikrobiyal yolla enzim üretimi kullanılabilir toprak alanı, iş gücü, iklim, mevsim şartları v.b. birtakım kısıtlayıcı faktörlere bağlı değildir. Uygun suş seçimi ve kullanılan mikroorganizmaların optimum gelişme şartları sağlandığı sürece standart ve



ekonomik bir enzim üretimi için en uygun olan kaynaklardır (Underkofler, 1976, Topal, 1982; 1988).

Bu mikrobiyal kaynaklar arasında küfler de önemli bir yere sahiptirler. Küfler; primer metabolitlerinden olan enzimleri ile endüstriyel açıdan önemli bir kaynak olabilmektedirler. Birçok mikroorganizma gruplarında olduğu gibi, küflerde de yetenekleri mevcut olanlar için kontrollü koşullar yaratıldığında primer metabolitlerinin üretimi teşvik edilebilmektedir. Filamentli küfler; saprofit veya patojen türleriyle önemli zararlara neden olabilmeleri yanında geri kazanımlı ekosistemde çok etkin rollere sahiptirler. Primer metabolizma ürünleri hem anabolik hem de katabolik biyokimyasal reaksiyonları kapsamaktadır (Topal ve ark., 1998).

Dünya genelinde mevcut endüstriyel enzim pazarı 1.4 milyar Amerikan Doları dolayındaki tutarla endüstride egemen iken, yılda %10'un üzerinde pazar ağı artışı ve %4-5 dolayında satış artışı ile yaygın tüketim alanlarındadır. Gıda, ve deterjan endüstrileri endüstriyel enzim üretiminin %75'ini kullanmaktadırlar (Cowan, 1995, Topal ve ark., 1998). Enzim kullanımı açısından gıda endüstrisi tek başına %50'lik bir paya sahiptir. Gıda endüstrisinde ve diğer alanlarda yaygın olarak kullanılan enzimlerden proteaz; unlu ürünler, et, peynir, deterjan, bira, deri endüstrileri ve tıpta teşhis ve tedavide kullanılmaktadır. Amilaz ise biracılık ve damıtık içki üretiminde, tekstil endüstrisinde, unlu ürünlerde (ekmekçilik) ve nişasta endüstrisi gibi alanlarda kullanılmaktadır (Eskin et al, 1971, James and Simpson, 1996, Topal ve ark., 1998).

Endüstriyel enzim pazarının yarısı Avrupa Topluluğu ülkelerinin elindedir. ABD ve Japonya pazardan yaklaşık %15'erlik pay almakta, kalan %20'lik pay da çeşitli ülkelerdeki küçük üreticiler tarafından paylaşılmaktadır (Batum, 1997a).

Bilinen enzim türlerinin sayılarının binlerle ifade edilmesine karşın; endüstriyel kullanım, dolayısıyla üretim 50'den az enzim türünü



kapsamaktadır. Birinciliği %75-80 ile hidrolazlar (amilaz, proteaz, lipaz, sellülaz gibi) almaktadır. Endüstriyel hidrolazlar içinde en fazla paya sahip olan, %59'la proteaz enzimidir. İkinci sırada ise içinde amilazların da bulunduğu karbohidrazlar %28 paya sahiptir. %13'lük pay ise lipaz ve diğer enzimleri kapsar (Godfrey and Reichelt, 1983, Löffler, 1986). Kullanılan mikroorganizma türleri de, yasal otoritelerin halk sağlığını koruyucu düzenlemelerine paralel olarak, özellikle gıda endüstrisi enzimlerinde son derece kısıtlı kalmaktaydı. Gen mühendisliğinin endüstriyel enzimolojiye uygulanmaya başlanmasıyla mikroorganizmalarla çeşitli tür enzimlerin üretimi giderek yaygınlaşmaktadır. Böylece daha önce fermantasyonu sakıncalı görülen veya ekonomik olmayan bazı türlerin ve hatta memelilerin genleri klonlanarak yeni proseslerin yaygınlaşması sağlanmıştır (Batum, 1997a).

Bu çalışmada Türkiye'nin mikoflorasının baskın üyelerinden biri olan filamentli küflerden *Penicillium* türlerinden pekçok alanda yararlanma olasılığı gözönüne alınarak, primer metabolitlerinden olan amilaz ve proteaz açısından taranması yapılmış, elde edilecek sonuçların endüstriyel uygulamalar ve diğer bilimsel araştırmalar için temel oluşturması hedeflenmiştir. Çalışma kapsamlı bir araştırma olan Türkiye mikoflorasının enzimatik aktivitelerinin belirlenmesi projesinin (Topal ve ark., 1998), bir kısmını kapsamaktadır.



## 2. KONU İLE İLGİLİ YAYINLAR VE ÇALIŞMALAR

### 2.1. Genel Bilgiler

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen protein yapısında olan ve biyolojik aktiviteye sahip katalizörlerdir. Enzimler diğer katalizörlerden farklı olarak 3 önemli özelliğe sahiptir (Kazan, 1997, Gözükara, 1989):

1) Enzimler hızlı çalışmaktadır (Bazı enzimlerin bir dakikada milyonlarca molekülü etkilediği bilinmektedir).

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: Normal laboratuvar koşullarında çok yüksek sıcaklıklarda ve fazla enerji harcanmasını gerektiren birçok kimyasal reaksiyon, enzimler sayesinde daha az enerji ile ve hatta vücut ısısında katalizlenebilirler. Enzimler, inorganik katalizörlere oranla aktivasyon enerjisini daha etkin bir şekilde düşürmektedirler.

Enzim alanında yapılan ilk çalışmalar sindirim enzimleri ile ilgili olup 1760 ile 1825 yılları arasında kapsamaktadır. 19. yüzyılın başlarına kadar fermantasyonla alkol üretimi gibi bazı yöntemlerin yaşayan mikroorganizmaların faaliyeti sonucu olduğu düşünölmekteyken, 1833 yılında şekeri parçalayan aktif bir madde kısmen izole edilmiş ve diastaz (güncel



karşılığıyla amilaz) ismi verilmiştir. Daha sonra bu ve benzeri aktif maddeler ferment olarak isimlendirilmiştir. Liebig, ferment adı verilen bu maddelerin canlı organizmalardan elde edilen cansız maddeler olduğu görüşünü ileri sürmüştür. 1878 yılında Kuhne ferment kelimesi yerine enzim kelimesinin kullanılmasını önermiş ve kabul görmüştür (Kazan, 1997).

Enzimler hakkındaki bilgiler eskilere dayanmakla birlikte, mikrobiyal yolla üretimleri yakın geçmişte önem kazanmıştır. Yaşayan hücrelerden aktif enzimin ayrılabilceği ilk kez 1897'de Buchner tarafından gösterilmiş ve mayanın alkol fermantasyonunun başlangıcında katılması yerine, yaşayan hücre olmadan maya özütünden yararlanılmıştır. Yine küf enzimlerinin ilk kez ticari kullanımları 20. yüzyılın başında, bakteriyel enzimlerin kullanımı ise 1.Dünya Savaşı'ndan sonra olmuştur (Topal, 1988).

### **2.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması**

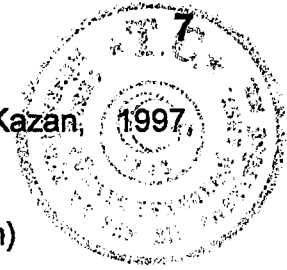
Enzimler sınıflandırılırken temel olarak iki bölümde incelenirler (Topal, 1985):

**Endoenzimler (İntraselüler Enzimler):** Hücre içinde meydana gelen enzimlerdir. Canlı hücrede hücre metabolizması için gerekli gıda absorpsiyonunda ve transformasyonunda önemli roller oynarlar. Bu esnada büyük ölçüde hücrede kullanılan enerji açığa çıkar.

**Eksoenzimler (Ekstraselüler Enzimler):** Hücre tarafından üretilip dışarıya salgılanırlar. Bunlar hücre duvarının etrafından bulunduğu ortama salgılanırlar ve ortamın protein, yağ, karbonhidrat gibi organik maddelerini parçalayarak hücreden bağımsız rol oynarlar .



İşlevlerine göre enzimler 6 gruba ayrılmaktadır (Kazan, 1997; Gözükara, 1989):



- Oksiredüktazlar (Oksidasyon/Redüksiyonu katalizleyen)
- Transferazlar (Bir atom veya grubunu iki molekül arasında transfer edenler.)
- Hidrolazlar (Hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen)
- Liyazlar (Substratta bir grubun uzaklaştırıldığı reaksiyonları katalizleyen)
- İzomerazlar (İzomerizasyon reaksiyonları katalizleyen)
- Ligazlar (Sentetazlar)

### 2.1.2. Enzim Kaynakları

Enzim üretim kaynakları;

1) Bitkisel ve Hayvansal Kökenli Olanlar: Bitkisel enzimlerden en fazla bilinenleri proteolitik enzim olarak; bromelain, fisin, papain olup, tahıllardan elde edilen amilolitik enzimler ve özel turunçgil enzimlerdir. Ticari olarak üretilen başlıca hayvansal enzimler pankreatin, pepsin, rennin, tripsin, kimotripsin, katalaz ve lipazdır (Reed, 1966, Godfrey and Reichelt, 1983).

2) Mikrobiyal Kökenli Olanlar: Uygun mikroorganizma ve suşların seçimi ve iyi bir planlama ile çok sayıda enzim üretimi mümkün olmaktadır. Genellikle mikrobiyal enzimlerin atmosferik basınçta, 3-9 gibi geniş pH aralığında, birçoğunun da ağırlıklı olmak üzere 45-55 °C lerde (bir grubunda 25-90 °C arasında) çalışabilmesi bir avantajdır. Ayrıca etki spesifikliği nedeniyle doğru kullanımda istenilen son ürünün hedeflenen doğrultuda elde edilebilmesi, arzulanan önemli özelliklerdendir. Yatırım masrafının da nisbeten düşük olması gibi üstünlükleriyle günümüzde pekçok mikrobiyal enzim üretim ve kullanımı gerçekleştirilmektedir. Bu enzimler arasında; takasidaz, amilaz, invertaz, pektinaz, glikoz oksidaz, lipaz, klaritinaz, fosfodiesteraz, glikoz izomeraz, laktaz, penisilinaçilaz sayılabilmektedir (Topal, 1982; 1988).



Hayvansal ve bitkisel dokulardan izole edilen enzimlerin yerini alan mikrobiyal kaynaklı enzimlere örnek vermek gerekirse (Kennedy, 1987);

- Amilaz ve endo  $\beta$ -glukanaz arpa veya buğday maltından saflaştırılırken, halen *Bacillus* ve *Aspergillus* türlerinden üretilmekte ve bira, damıtık içki, unlu ürünler ve tekstil endüstrisinde kullanılmaktadır.

- Bitki ve hayvan proteazı yerine *Aspergillus* ve *Thermoactinomyces spp.*'den üretilen proteazlar etin yumuşatılması ve soğuğa dayanıklı bira yapımında kullanılmaktadır.

- Pankreatik proteaz, yerine *Aspergillus* ve *Bacillus spp.* proteazı deterjan yapımı ve derinin yumuşatılmasında kullanılmaktadır.

- Buzağıdaki chymosin yerine *Mucor renneti* peynir için kullanılmaktadır (Kennedy, 1987, Topal 1982; 1985; 1988).

Prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmalardan seçilmiş türler önemli bir enzim kaynağı olarak kullanılmaktadır. Fakat mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin gıda endüstrisinde kullanılabilmesi için FDA (Food and Drug Administration - Gıda ve İlaç Yöneticileri) tarafından belirlenen GRAS (normal koşullarda güvenli kabul edilen) listesinde olması gerekir (Batum, 1997a).

Buraya kadar 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 enzimlerinde mevcut olması kesinlikle bir dezavantajdır. Bu durumlarda istenilen enzim, zor ve masraflı olan yöntemlerle saflaştırılmaktadır. Differansiyel 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).

Mikroorganizmalar biyolojik çeşitliliğe sahip olup enzim konsantrasyonları deneysel olarak veya genetik manüplasyonlarla artırılabilir. Buna göre aşağıdaki örnekler verilebilir (Kennedy, 1987).

- Buzağıdan elde edilen "prokimosin", *E. coli* ve *Sacch. cerevisiae* tarafından sentezlenebilir.
- Fibrinolitik enzim olan "Ürokinaz" normalde insan idrarında bulunurken, genetik manipulasyonlarla *E.coli* hücrelerinden üretilmiştir.
- Amilazlar ve endo  $\beta$ -glukonazlar arpa ve buğday maltından saflaştırılırken, günümüzde *Bacillus* türleri ve birçok farklı küf tarafından üretilmektedir.
- Bitki ve hayvan proteazları yine birçok küf tarafından üretilmekte ve çeşitli endüstriyel alanda kullanılmaktadır.

### 2.1.3. Proteazlar

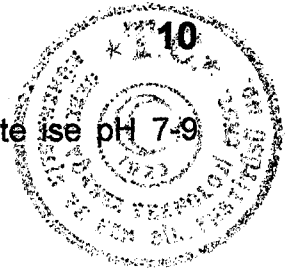
Proteazlar endüstriyel enzim pazarının önemli bir payını oluşturmaktadır. Proteazlar; serin proteaz (alkali proteaz) (alkali pH), metalloproteaz (nötr pH), sistein proteaz (asidik pH), aspartik proteaz (asidik pH) olmak üzere dörde ayrılırlar (Fogarty, 1983, Priest, 1992).

#### Alkali Proteazlar (Serin Proteazlar)

Bu tip proteazlar birçok bakteri tarafından salgılanmaktadır. Bu küçük enzimler en fazla pH 9-11 arasında aktiftirler. Hayvansal enzimlerden tripsin'e benzer. Alkali ortam seven basiller tarafından salgılanan serin proteazlar günümüzde yüksek pH'lı deterjan formüllerinde kullanılmaktadır (Priest, 1992).

#### Metalloproteazlar

Az miktarda metal atomu içerirler. Nötr pH'ya yakın ortamlarda bulunur. Bunların ısıya dayanıklılığı serin proteazlara nazaran daha düşüktür.  $Ca^{+2}$  ile



stabil hale gelir, maksimum aktivite pH 7-8, maksimum stabilite ise pH 7-9 arasındır (Kennedy, 1987, Priest, 1992).

#### Sistein Proteazlar

Sistein proteazların 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 (Priest, 1992, Fogarty, 1983).

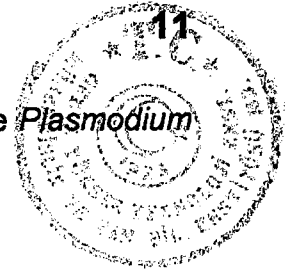
#### Asit Proteazlar

Bu proteazların optimal pH'sı 2-5 aralığındadır. Hayvansal enzimlerden pepsin ve renin'e benzer. Asit proteazların izolasyonu için en büyük kaynak küflerdir. Pepsin benzeri asit proteaz doğal olarak *Aspergillus*, *Paecylomyces*, *Rhizopus*, *Penicillium* ve *Trametes* gibi küflerce sentezlenmektedir. Rennin benzeri asit proteazlar, pepsin benzeri asit proteazlar ile optimum pH'ları, stabilizasyonu ve inhibitörlere karşı hassasiyetleri gibi birden fazla ortak özelliği paylaşırlar. Asit proteazların rennin benzeri aktivitesi *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus candidus* ve *Basidiomycetes fulva* gibi çeşitli mikroorganizmalardan elde edilmektedir (Matsubara and Feder, 1971, Kennedy, 1987).

#### 2.1.3.1. Proteazların Üretiminde Kullanılan Kaynaklar ve Uygulama Alanları

Proteaz, gıda ve bununla bağlantılı endüstriler için gittikçe artan bir öneme sahiptir ve bunların elde edilebilirliği rekombinant DNA teknolojisinin kullanılmasıyla gittikçe artmıştır.

Ticari olarak proteaz üretiminde kullanılan başlıca kültürler: *Bacillus sp.*, *E.coli*, *Pseudomonas sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Streptomyces sp.*, *Candida sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Clostridium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Endothia parasitica*,



*Mucor sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Paecylomyces sp.* ve *Plasmodium sp.*'dir (Fogarty, 1983).

FDA tarafından yenilebilen bitki ve hayvan dokularından ve *B.subtilis*, *A.oryzae*, *A.niger*, *S.cerevisiae* ve *Kluyveromyces fragilis* tarafından üretilen proteazlar kullanıma uygun bulunmuştur. Bunların dışındaki kaynaklardan üretilen proteazlar gıda katkısı olarak kullanılmadan önce toksik olup olmadığı belirlenmelidir. Diğer mikroorganizmalardan elde edilen proteolitik enzimlerin gıdalarda kullanımı için listenin FDA tarafından sürekli genişletilmekte olduğu gözlenmektedir. Bunlardan bazıları; *P.roquoferti*, *P.caserilium*, *M.miechi*, *M.pusillus*, *E.parasitica*, *B.liquiformis* ve *B.cereus*'dur (Löffler, 1986).

Yüksek alkalik toleranslı serin proteazlar yeni yeni deri endüstrisinde kullanılmaya başlanmıştır. Sığır derisinden kılların ayrılması için geleneksel olarak sülfid ve sönmüş kireç kullanılmaktadır. Enzim yardımı ile kıl giderme işleminde alkali proteazlar kireçle beraber kullanılırlar. Böylece toksik olan sülfid kullanımı önlenmiş olur (Priest, 1992). Deriye uygulanan ikinci işlem ise kıldan arındırıldıktan sonra derinin yumuşatılmasıdır. Bu işlem için genel olarak pankreas salgıları kullanılmaktadır. Ancak alkali proteazlar hayvansal salgılara göre deriyi daha çabuk yumuşatırlar (Priest, 1992, Batum, 1997b). Ayrıca serin (alkali) proteazlar biracılıkta biranın soğutulması işleminden sonra meydana gelen "Protein Sisi"nin ortadan kaldırılması ve etlerin yumuşatılması işlemlerinde de kullanılır. Her iki uygulamada da ürünün bozulmasını engellemek için enzime özellikle gereksinim duyulmaktadır (Kennedy, 1987). Tipik bir et yumuşatma karışımı %2 ticari papain veya %5 küf kökenli proteaz, %15 dekstroz, %2 monosodyum glutamat ve tuz içermektedir (Underkofler, 1976).

Bakteriyel alkali proteazlarının en büyük uygulama alanı son yıllarda büyük deterjan üreticileri tarafından etkin madde olarak çamaşır deterjanlarına dahil edilmesidir. Proteolitik enzimler yıllardır kuru temizlemede, süt, yumurta, kan gibi proteince zengin lekelerle karşı etkin madde olarak



kullanılmışlardır. Enzimatik etki sonucu kirler, kuru temizlemede uygulanan solventlerin yaptığı gibi kolayca çözülebilen bileşiklere parçalanmaktadır (Underkofler, 1976).

Metalloproteazlar ekmekçilikte kullanılmaktadırlar. Yüksek miktarda buğday proteini (gluten) içeren hamurların mekanik olarak işlenmesi ve arzu edilen kabarmanın (hacim artışının) eldesi oldukça zordur. Bu nedenle proteazlara ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle bisküvi ve kraker yapımında düşük gluten içeren unlar tercih edilmeye çalışılmakta, ancak bunun yeterli olmadığı durumlarda proteaz tipi enzimlerle bu ihtiyaç giderilebilmektedir. Bu enzimler ekmeğin besin değerini etkilemeden, unun yapısında bulunan gluteni hidroliz etmekte ve hamurun kolay işlenebilirliğini sağlamaktadırlar (Godfrey and Reichelt, 1983, Dağaşan, 1997). Ayrıca biracılıkta fermantasyon işlemi sırasında azot miktarını artırmada da kullanılmaktadırlar. Yine balık yemi işlemede de yararlanılmaktadır.

Asit proteazlar en çok peynir endüstrisinde kullanılmaktadır. Peynir üretiminde genellikle kullanılmakta olan asit proteazlardan rennin henüz süt emme çağında bulunan geviş getiren hayvanların dördüncü midesi olan şirdenden özütleme yolu ile elde edilen bir maddedir. 1960'lı yıllarda ABD'de yaşanan dana renninin kıtlığı, yerine kullanılacak enzimatik madde arayışına yol açmıştır. Bu nedenlerle renninin mikrobiyal yolla eldesi araştırılmış, sonucunda da *Mucor miechei*, *Mucor pusillus* ve *Endothia parasitica*'dan elde edilmesi gerçekleştirilmiştir (Fogarty, 1983, Topal, 1982; 1985, Priest, 1992).

#### 2.1.4. Amilazlar

Amilolitik enzimler küf ve bakterilerce doğal olarak sentezlenebilir. Amilaza, amiloz ve amilopektindeki  $\alpha$ -(1.4) glukosidik bağları hidroliz ettiği için bu isim verilmiştir (Kennedy, 1987, Gözükara, 1989).



$\alpha$ -Amilaz: Nişasta hidrolizleyen enzimlerin en önemlisidir. Bu enzim iç bağlara atak yapar, amiloz, amilopektin ve glikojende bulunan  $\alpha$ -(1.4) bağlarını hidrolize eder (Smith and Berry, 1975, Dubois, 1980, Gözükara, 1989).

Doğada çok yaygın olan  $\alpha$ -amilazlar hayvan, bitki, küf ve bakteri gibi kaynaklardan elde edilmektedir. Optimum pH'sı 5-7 arasındadır. Farklı kaynaklardan elde edilen  $\alpha$ -amilaz türlerinin sıcaklığa karşı dayanıklılıkları farklı olup, hidroliz derecesinde de çok farklı sonuçları vermektedirler. Örneğin bakteri kaynaklı  $\alpha$ -amilaz, 80°C'den daha yüksek sıcaklıklarda bile aktivitesini kaybetmezken, küf kökenli  $\alpha$ -amilaz 60°C'de çok hızla inaktive olmaktadır (Cowan, 1995). Fungal enzimler genelde düşük pH optimumuna sahiptirler. Bakterilerinkinden farklı olarak, fungal enzimler glikoprotein yapısındadırlar (Priest, 1992). Fungal  $\alpha$ -amilazlar düşük ısıl stabiliteye sahiptir. 20 °C civarında denatüre olurlar. İlk ticari mikrobiyal  $\alpha$ -amilaz üretimi *A. oryzae* ile olmuştur (Kennedy, 1987).

Glukoamilaz (Amiloglukosidaz): Bu enzim amilopektin, amiloz ve glikojendeki  $\alpha$ -(1.4) bağlarını hidrolizlemekte, sonucunda da  $\beta$ -glukoz serbest kalmaktadır. Glukoamilaz;  $\alpha$ -(1.6),  $\alpha$ -(1.3) ve daha yavaş da olsa  $\alpha$ -(1.4) bağlarını hidrolize edip, nişastayı tamamen glikoza dönüştürebilmektedir (Cowan, 1995).

Bazı bakterilerinde glukoamilaz sentezlemelerine rağmen, endüstriyel enzimlerin yaygın üretimi *Aspergillus* ve *Rhizopus* türlerinden yapılmaktadır. Diğer fungal amilazlar gibi termostabildir (Optimum sıcaklık 60°C), düşük pH'da (4.5-5 arası) aktiftir ve yaklaşık %5-20 karbonhidrat içeren glikoprotein yapıdadır (Kennedy, 1987, Priest, 1992).

$\beta$ -amilaz:  $\beta$ -amilaz daha çok yüksek bitkiler tarafından üretilen bir şekerleştirici enzim olup, nişasta molekül zincirlerinin indirgeyici olmayan



uçlarından sırayla maltoz birimlerini koparmaktadır. Nişastadaki  $\alpha$ -(1.6) bağlarını parçalayamaz.  $\beta$ -amilaz nişastadan maltoz ve dekstrin oluşturur (Priest, 1992, Smith and Berry, 1975, Cowan, 1995).

#### 2.1.4.1. Kullanım Alanları:

$\alpha$ -amilaz ve glukoamilaz enzimleri endüstriyel bağlamda nişastadan şeker veya oligosakkarit eldesinde kullanılır. En önemli uygulama alanları arasında fermantasyon, ekmek üretimi olmak üzere çeşitli gıda endüstrisinde, kağıt ve tekstil kaplamasında kullanılan modifiye nişasta üretimi, tekstil ürünlerinin nişasta atıklarından arındırılması ve sindirim sistemini destekleyen ilaçların üretimi sayılabilir. Endüstriyel kullanım alanları incelendiğinde aşağıdaki bilgilere ulaşılmaktadır (Smith and Berry, 1975, Kristiansen and Bu'Lock, 1980, Priest, 1992):

- Ekmek Yapımı Alanında: Undaki parçalanmış nişasta granüllerinin enzimatik hidroliziyle, maya fermantasyonu için gerekli şekerin oluşumu ekmek yapımında önem taşımaktadır. Buğday unu ve malta eklenen  $\alpha$ -amilaz nişastanın dekstrine çevrilmesini sağlar. Un yetersiz miktarda endojen amilaz içerdiğinde doğrudan un ile birlikte fungal  $\alpha$ -amilazın da eklenmesi gerekir.  $\alpha$ -amilaz doğrudan una ilavé edilmekte ve unun yapısında bulunan nişastadan maltozun üretimini sağlamaktadır. Üretilen maltoz, fermantasyon sırasında maya hücrelerinin ihtiyacı olan karbon gereksinimlerini karşılamakta, ayrıca nişastanın yapısal değişiminden kaynaklanan ekmeğin bayatlaması gecikmektedir (Smith and Berry, 1975, Dubois, 1980, West, 1988, Dağışan, 1997).

Nitekim, ekmeğin kabarmasında yeterli  $\alpha$  ve  $\beta$ -amilaz aktivitesine bağlıdır. Buğday ununun  $\alpha$ -amilazı hasat zamanındaki iklim değişikliklerine göre değişim gösterir. Hasat bazı buğday tohumlarının filizlenmesinden ve  $\alpha$ -amilaz aktivitesinin önemli bir ölçüde yükselmesinden itibaren yapılır. Fungal





$\alpha$ -amilazlar bu alanda birçok yönden bakteriyel  $\alpha$ -amilazlardan üstündür. Örneğin; sıcaklık stabilitesi daha yüksektir, pişirmenin erken safhalarında hızla inaktive olmazlar ve nişastanın jelatinize olduğu sıcaklığa kadar aktivitelerini sürdürürler (Smith and Berry, 1975).

- Bira ve Alkollü İçki Üretimi Alanında: Geleneksel yöntemlerle maya ile şekerin alkole dönüşümü tahıl nişastasından bağımsızdır. Bu arpa maltındaki  $\alpha$ -amilaz ve  $\beta$ -amilazın hareketi ile oluşur. Pratikte fungal enzimler çok fazla kullanılmamaktadır. Glukoamilaz bira yapımında ve damıtmada hammaddelerin fermantasyonunun sağlanmasında kullanılır. Böylece tonlarca ürün elde edilir (Kennedy, 1987).

- Şurup Üretimi Alanında: Şekerleştirici  $\alpha$ -amilaz ve glukoamilaz nişastadan şurup (glikoz, maltoz, maltotrioz, fruktoz v.b. şurupların) üretiminde kullanılırlar (Kristiansen and Bu'Lock, 1980).

- Tekstil Endüstrisinde; Özellikle bakteriyel amilaz, çirilenmiş nişastayı kısa süre içinde suda eriyebilen dekstrinlere çevirebilme özelliğinden dolayı, yaklaşık 70-80 yıldır pamuklu dokuma endüstrisinde kullanılmaktadır. Pamuklu ipliklerin dokuma sırasında kopmalarını önlemek için nişasta içerikli bir banyodan geçirilip, kurütularak sağlamlaştırılır. Dokuma işleminden sonra ham bezi hidrofile etmek, boya ve apre gibi işlemlere hazırlamak için bu nişasta kolasının alınması gereklidir. "Haşıl sökme" denen bu işlem, beze zarar vermeden en kolay şekilde amilaz enzimi kullanılarak yapılmaktadır (Batum, 1997b, Priest, 1992).

- Deterjan Sektöründe; Amilaz enzimlerinin lekeli çamaşır veya kapların temizlenmesinde deterjan katkısı olarak kullanımı son yıllarda giderek artmıştır (Priest, 1992).

Endüstriyel üretimler için mikrobiyal kaynaklardan yararlanmak üzere saf test kültürleri seçilmektedir. Bu seçimde, potansiyel suşlar hedef alınmakta ve üretime yönelik temel basamaklar izlenmektedir. Kontrollü ortamlarda, aseptik ve hijyenik çalışma esastır. Amaca göre saflaştırma yöntemleri uygulanabilir böylece mikrobiyal enzim üretimi gerçekleştirilmiş olur (Underkofler, 1976).

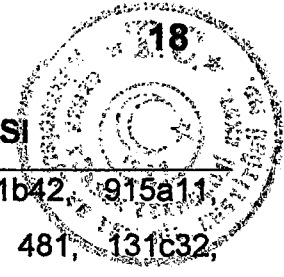


### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında TÜBİTAK MAM Gıda Bilimi ve Teknolojisi Araştırma Enstitüsü (GBTAE)'ndeki Türkiye'nin tarımsal mikoflorasından, Doç. Dr. Şeminur TOPAL tarafından oluşturulmuş küf koleksiyonundaki (Topal 1984; 1989; 1998) 1006 adet *Penicillium* cinsi saf küf kültürleri kullanılmıştır. Bu kültürler 1980'li yıllarda TÜBİTAK MAM Gıda Bölümünde gerçekleştirilmiş olan, NATO destekli "Gıdalarda Küfler ve Mikotoksinler" projesi kapsamında Türkiye'nin 9 tarımsal bölgesinden tahıl, tahıl ürünleri ve diğer çeşitli gıdalardan izole edilmiş ve koruma altına alınmış olan 41 farklı türdeki *Penicillium* kültürleridir (Topal 1989; 1996; 1997). Kullanılan kültürlere ait türler ve suş numaraları aşağıda verilmiştir.

KÜF TÜRÜ	SUŞ NUMARASI
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> ( <i>P.ver.var. cyclopium</i> )	3141, 88b33, 3123, 6122, 282, 23c, 3571, 1884a24, 1060d1, 957a22, 1751a24, 1913a12, 114a11, 1744a12, 1763a2, 1285d6, 129c4, 92f3, 148c11, 5145, 260d1, 1924d7, 233, 115f4, 1924d2, 1883d3, 1909d3, 1755d2, 1469d1, 141b13, 114e8, 1133d2, 132c24, 1906d2, 3961, 1918d2, 1754a4, 6125, 1884a1, 4282, 2341, 483, 1017d5, 1781a31, 567c2, 3174, 274b3, 1771a42, 145e5, 144c11, 140b41, 2581, 1910a11, 1915d1, 89a32, 1890d2, 88f1, 1758a1, 1773a22, 1923d2, 88a35, 381c15, 182, 1641d4, 1971, 2461, 83c21, 1160d2, 1806a11, 1045d2, 115d4, 1872, 6153, 7154, 1671, 1563, 283, 1764a12, 519d5,

**KÜF TÜRÜ****SUŞ NUMARASI***Penicillium aurantiogriseum*

4721, 2251, 1787d6, 261b42, 915a11,

*(P.ver.var. cyclopium) (devam)*1925d6, 152d3, 1759a23, 481, 131c32,  
2093, 1435a14, 1922a24, 4089, 182c31,  
153c17, 114b12, 1131, 1373d2, 298c15,  
250f2, 2094, 136c42, 1112, 1023, 1168d3,  
1021, 1912a12, 1911a2, 31b13=e1,  
1305a21, 84b31, 1743a24, 1431, 3751,  
1972, 6127, 147f2, 1775d6, 1912a12,  
1790a1, 4452, 242b21, 7156, 4161, 4641,  
6141, 38e4, 130c4, 1384d3, 165f6, 38a13,  
4156, 9132, 4392, 1241, 799, 8134,  
1041d4, 1776d6, 1251, 1166d2, 2261,  
1874, 4184, 4995, 1894a14, 2883, 967a1,  
4391*P. bilalii*

915a12

*P. brevicompactum*718b43, 147c31, 1285d7, 1059a24,  
1751a21, 33c12, 1009a41, 1753a42, 4291,  
4361, 1766a32, 130c24, 1758a32, 141c43,  
298c22, 1244a2, 1664a23, 927a11, 89b33,  
1791a12, 1759a24, 131a31, 1061d1,  
918a11, 144a21, 1796a21, 75b9, 1793a11,  
1799a3, 1767a12, 1435a21, 1750a22,  
217a13, 569d3, 1373a11, 129c3, 916a12,  
1757a11, 143c42, 1753a3, 146a31*P. camembertii*

566f1, 116b25

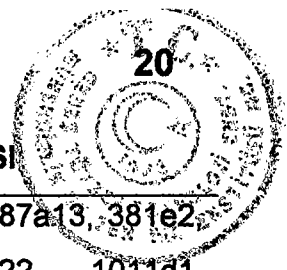
*P. chrysogenum*1812a32, 1649d3, 268b11, 1215a41,  
1345d1, 1676a13, 32b11=e1, 274d2,  
1445d1, 92c23, 280a13, 1891a31, 1541,  
4451, 894, 8132, 2344, 1434a11, 1911a12,  
4362, 1914a11, 916a11, 1909d1, 1780a4,  
1004d7, 484, 137b47, 1715d8, 131b22,  
1925d2, 182b22, 3173, 3832, 1013d2,

## KÜF TÜRÜ

## SUŞ NUMARASI

*P. chrysogenum* (devam)

1741a15, 312d1, 981d3, 1231d2, 217b43,  
94c21, 81a34, 33d4, 1061d3, 568c12,  
9133, 1785a35, 4993, 1672d1, 88b31,  
89c3, 280a14, 82d1, 1915d3, 1916d2,  
145e6, 1001d6, 1900a22, 198b33, 1919d2,  
1791a4, 82a2, 82c1, 1621a22, 140b43,  
1751a31, 88a33, 89a21, 145c12, 1226a12,  
218f7, 1244a1, 927d4, 1057d3, 272b13,  
83a25, 1045d1, 1435a13, 1910a13, 3394,  
88b34, 1895a16, 38c4=b41, 1668a41,  
1583, 1485d3, 1807a32, 31b12, 268c1,  
1770a32, 1805a32, 1060d5, 1413, 155b43,  
140c3, 1886a4, 918a12, 92a23, 194c2,  
1305a22, 93b33, 1185a11, 1545, 2682,  
3971, 944d2, 1922a22, 299b31, 1166d1,  
1762a31, 1218a12, 92e1, 1188a12,  
155b11, 40d2, 1922a21, 83b31, 568f2,  
1430d2, 1159d1, 568b32, 912d2, 93a21,  
1672d4, 1798a31, 1224a41, 1785a34,  
1207a41, 934a21, 918d1, 33d3, 1345d6,  
32f2, 88a44, 1641d1, 1341, 1542, 4426,  
3842, 147d1, 1160d3, 1895a13, 1646d1,  
1914a12, 1168d4, 144f3, 274f4, 1008d3,  
1345d3, 47b23, 1779a25, 8131, 1652a13,  
2101, 1678d1, 294a12, 1801a14, 1797a22,  
1810a3, 93c22, 1049d1, 32b11, 1454d4,  
1912a11, 1331d4, 1159d2, 2606, 1014a14,  
145a15, 3073, 1373d1, 6123, 1341d2,  
1135, 141a23=c42, 307a12, 129b15,  
1648a21, 1924d1, 3693, 147c13, 242c31,  
1741a14, 94d1, 1013d3, 1217d3, 4994,  
1775d12, 142a3, 566f10, 1166a13, 81a32,

**KÜF TÜRÜ****SUŞ NUMARASI***P. chrysogenum* (devam)

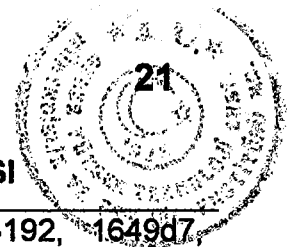
941a1, 1620d3, 1655a14, 1887a13, 381e2,  
1897a11, 1786a34, 84b22, 1011d1,  
114a12, 1216d5, 486, 1168d1, 1808a4,  
116a1, 1786a31, 1794a42, 33a1, 1786a22,  
1294d3, 43b26, 1346d2, 294d3, 1777b34,  
3121, 1543, 139c14, 1350d4, 1562, 1664,  
1546, 1916d4, 242e2, 145e4, 42c31,  
917a1, 3075, 3392, 3743, 1600d1, 1715d6,  
4153, 1790d1, 1694d2, 132a11, 313b33,  
1771a3, 566d1, 1782a23, 209c42, 1787d1,  
927a15, 1898a22, 2262, 3473, 1600d4,  
1252d2, 1778a12, 1113, 968d3, 70b31,  
4991, 4692, 569f4, 1772a3, 130b41,  
1889a24, 1694d7, 1285d13, 317c11,  
567b3, 5141, 184a1, 1384d4, 148b13,  
1294d1, 1797a22, 88c21, 88b24, 1917d1,  
1773a21, 23e4, 366b22, 1303d3, 1918d1,  
381a32, 313b31, 139e1, 1154d1, 1789a21,  
1621d2, 1337d3, 1649d2, 4972, 1881a12,  
1285d10

*P. citrinum*

1780a11, 31b22, 519d2, 1003a11, 328d2,  
2792, 299b33, 1166a11, 71b4, 294c41,  
218f1, 147f1, 1331d3, 1891a11, 1902a41

*P. commune**(P.ver.var. melanocolorum)*

1345d5, 4282, 40e2=e1=d3, 4363, 5143,  
143b41, 2462, 219c42, 4185, 142b2,  
116b23, 2121, 1330a22, 1756a4, 131c22,  
5142, 1330a21, 1881a3, 94c11, 9123, 971,  
299c3, 129b11, 1655a12, 1747a33,  
1751a32, 1771a41, 1742a3, 1430d5,  
1887a11, 81a22, 6126, 141b21, 142a21,  
662, 1885a31, 3113, 116a4, 1761a31,  
33d5, 924d3, 796, 1813a32, 3122, 205c41,

**KÜF TÜRÜ****SUŞ NUMARASI**

<i>P. commune</i> (devam)	1142a23, 38a3, 517a22, 3192, 1649d7,
<i>(P.ver.var. melanocolorum)</i>	130e1, 1760a14, 1758a34, 136b32, 1794a43, 88a41, 718b44, 1768a21, 135a33, 968d2, 1373a12, 1918d3, 1434d1, 173, 4081, 1664a21, 280b24, 1893a12, 1773a1, 4101, 916a13, 1903a21, 1645, 145b24, 1742a42, 1919d4, 1750a12, 1797a21, 3742, 3281, 1814a31, 268d2, 88d, 82a11, 32f4, 33a2, 1017d4, 1924d5, 277c21, 1762a33, 1272a3, 272c12, 1811a14, 944d4, 139b32, 1135a31, 1664a22, 1230d1, 566e2, 110e4, 128a4, 1294d2, 317f4, 1745a42, 1818a42, 140a22, 2252, 116b21
<i>P. concentricum</i>	1013, 4366, 4085
<i>P. corylophilum</i>	1143a41, 1883d2, 1623a1, 94c13, 1574a12, 130b1, 570c3, 93f36, 547b3, 136c36, 567a2, 481a21, 1305d1, 1003a21, 1178a1, 94b44, 129e4, 1783a31, 130c210, 1617d2, 1778a4, 1265a2, 1170a3, 137b41, 1492a12, 1204a2, 182b11, 985a15, 1920a1, 1800a17, 92d2, 1207a31, 1784d2, 94c12, 116b24, 1218a15, 1801a12, 985a11, 1252d3, 1794a25, 1783a41, 93b34
<i>P. cyaneum</i>	1009a1
<i>P. decumbens</i>	1815a11, 1899a42
<i>P. digitatum</i>	1574a11
<i>P. echinulatum</i>	242b44, 7101, 116b22, 4281, 7152, 1432, 1644, 218e1, 9134, 5144
<i>P. expansum</i>	317a22, 92b23, 1785a31, 3474, 6145, 32b3, 1781a41, 895, 1430d3, 1911a13, 2191, 1321a3=a2, 1454d2, 1014a13, 40e3,

## KÜF TÜRÜ

## SUŞ NUMARASI

<i>P. expansum</i> (devam)	94a2, 154e3, 1321a3, 300c11, 284, 7155, 148d1, 1749a13, 38d, 917a4, 1896a15, 381c13, 1353a4, 1330a24, 1366a4, 23b1, 1287a31, 547f, 1620d1, 915a22, 1788d3, 718b22, 1741a12, 38a11, 1260a12, 143e, 2192, 1648a26, 31f4
<i>P. frequentans</i>	92c36, 1001a13, 92a32, 141b11, 1207d5, 139a21, 1224a42, 166d1, 92a22, 1789a3
<i>P. funiculosum</i>	999d3, 294c21, 312e2, 718d2, 141a17
<i>P. granulatum</i>	2881, 1014a11, 130b32, 1337d5, 1676a11, 3112, 4722, 1885a2, 1345, 594, 1888a32
<i>P. griseofulvum</i>	150e4, 1789a13, 129c13, 1777a21, 1811a16, 1897a12, 1922a25, 1798a23, 135b22, 300e2, 1893a22, 1757a33, 1060d2, 1781a23, 75b2, 944d3, 129b41, 1774d8, 1660a2, 1920d2, 132d, 40f5, 1054d1, 1207d3, 1621d1, 294d2, 1921a11, 1916d1, 1791a22, 1910a12, 1783a32, 974a4, 136c35, 1768a22, 1912a13
<i>P. griseoroseum</i>	3592, 3752, 2991
<i>P. hirsutum</i> ( <i>P. ver. var. corymbiferum</i> )	1896a14, 1906d1, 1797a3, 1485d4, 1133d1, 3691, 3282, 141a22, 1900a23, 1895a14, 1435a11, 1894a13, 268b15, 152d2, 1804a14, 1017d3, 165f5, 298e6, 2463, 1664a11, 1747a34, 1925d5, 3172, 328c21, 261b33, 1787d4, 6124, 1655a15, 1344, 1342, 33f5, 1648a24, 1774d7, 3193, 4293, 1873, 1133, 88c23, 1891a16, 1012, 1346d1, 1795a23, 1185a4, 4183, 23e1, 1766a31, 1751a33, 1673, 1913a11, 272a32, 1788d2, 1881a13, 1384a11, 1904a1, 8133, 491, 7105, 4162, 139a22,





KÜF TÜRÜ	SUŞ NUMARASI
<i>P. hirsutum</i> (devam) ( <i>P.ver.var. corymbiferum</i> )	717d6, 3744, 1916d3, 963d1, 242a3, 23c41, 117a31, 4883, 292, 4262, 172, 4263, 132c14, 4082, 1330a23, 1001d2, 1919d3, 792, 482, 1759a13, 1341d1, 1318a12, 1746a13, 134c32, 1750a32, 1154d4, 145b22, 5147, 7106, 4671, 1890d1, 2791, 280b31, 144a42, 9131, 291, 2256, 1344, 4365, 1898a1, 4154, 2102, 1469a14
<i>P. implicatum</i>	1758a23, 1430d7, 1765a11, 1807a11, 317f3, 1788d4, 1017d2, 960a11, 1808a24
<i>P. janthinellum</i>	1649d6
<i>P. jensenii</i>	1882a42
<i>P. lividum</i>	1143a3, 1009a42, 1178a2, 1265a31, 1218a14, 1030a3, 1215a43, 931a12, 1244a3, 1003a22, 1492a21, 1373a21, 1457a21, 1589a2
<i>P. megasporum</i>	1204d1, 794
<i>P. miczynskii</i>	1469a11, 1166d3, 1384d1, 1204d2
<i>P. nalgiovense</i>	1649d4, 162c1, 1922a35, 1648a28, 298e1, 1544, 970d4, 144f2, 1060d3, 117b33, 918d3, 1676a23, 1142, 132a22, 970d3
<i>P. ochraceum</i>	4391, 1791, 924d5
<i>P. olsonii</i>	1715d1, 1168d2, 137d6
<i>P. paraherquei</i>	136c43, 132c22, 130e2, 131b33, 110b22
<i>P. puberulum</i>	43b42
<i>P. roqueforti</i>	1757d1, 1795a4, 515c22, 982a3, 268a13, 1792a25, 50a3
<i>P. rubidurum</i>	110d2
<i>P. rugulosum</i>	912d3, 1754a32, 159b4, 1811a12, 140a12, 298c14, 1755a34
<i>P. spinulosum</i>	1159d8, 1746a22

KÜF TÜRÜ	SUŞ NUMARASI
<i>P. sublateritium</i>	1030a1
<i>P. thomii</i>	1652a12, 1141d4, 1895a11
<i>P. variabile</i>	1744a35, 260f7, 1755a32, 185e3
<i>P. verrucosum</i> ( <i>P.ver.var. verrucosum</i> )	2092, 1895a12, 1435a16, 75b8, 927a13, 1676a22, 891, 293, 171, 1254, 5146, 134a42, 129a25, 153a11, 6151, 4292, 1739, 1732, 973, 916a2, 1318a13, 1011, 3111, 1252, 795, 4151, 4083, 2681, 92c21, 1760a11, 4725, 7153, 2582, 317c14, 2253, 1759a33, 1759a, 136b22, 1134, 1662, 924d2, 1345d2, 7123
<i>P. viridicatum</i>	1623, 1469a15, 181, 1014a12, 661, 924d1
<i>P. waksmanii</i>	194c31, 1648a27

### 3.2. Metod

Ağırlıklı olarak Türkiye'nin tarımsal mikoflorasını oluşturan *Penicillium* cinsine ait küfler, primer metabolizma ürünlerinden olan iki enzim (proteaz, amilaz) açısından kalitatif olarak taranmış ve deneysel çalışmaların tümü TÜBİTAK MAM, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Araştırma Enstitüsünün Mikrobiyoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.1. Enzimatik Aktivitesi Belirlenecek Küf Kültürlerinin Transfer İşlemleri

Saf olarak TÜBİTAK MAM GBTAE laboratuvarlarında korunan *Penicillium* sp. kültürleri yatık malt agarlı (MA) ortamda saklanan formlarından, patates dekstroza agar (PDA) ortamına 3 nokta ekimiyle inoküle edilmiş ve 26°C de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası

kültürlerin saflığı kontrol edilerek  $-18^{\circ}\text{C}$ 'deki derin dondurucularda saklanmıştır (Smith and Onions, 1994).

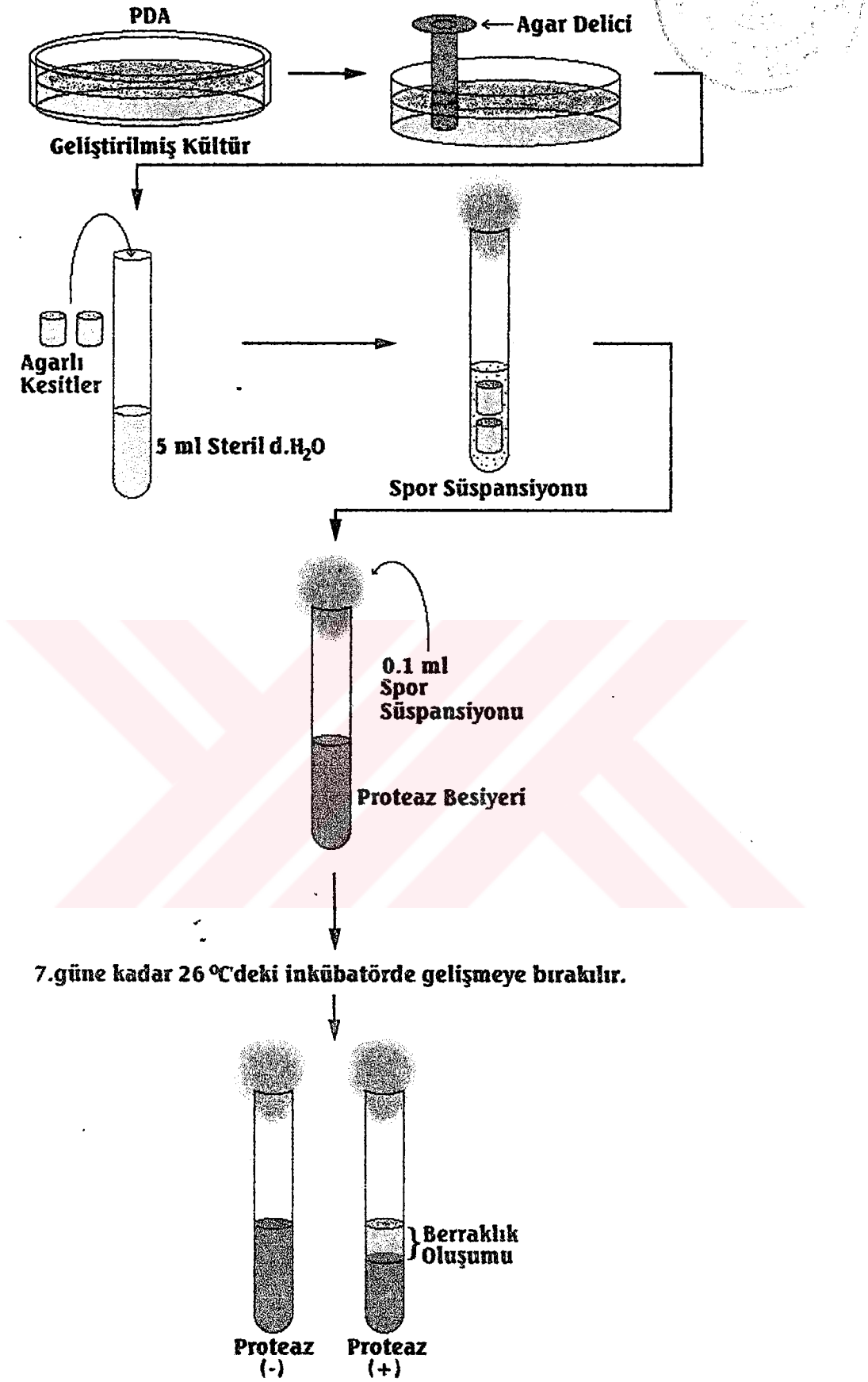
### 3.2.2. Proteaz Üretme Yeteneklerinin Araştırılması

Kültürlerin proteolitik aktivitelerinin belirlenebilmesi için özgün bir besiyeri kullanılmıştır. Bunun için %0.1  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , %0.05  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , %0.05 KCl, %1.6 agar, musluk suyu içinde çözündürülüp,  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 1.5 atm basınç altında 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.  $60^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğuduktan sonra üzerine final konsantrasyonu %4.8 olacak şekilde yağsız süttozu çözeltisi distile su ( $\text{d H}_2\text{O}$ ) ile hazırlanmış ve aynı şartlarda sterilize edilmiş, aseptik olarak ilave edilmiştir. Bu karışım steril test tüplerine 15'er ml olacak şekilde aseptik olarak dağıtılıp, dik olarak dondurulmuştur. Hazırlanan besiyerinin üzerine her bir kültür için 0.1 ml spor süspansiyonu inoküle edilerek,  $26^{\circ}\text{C}$ 'de 7 güne kadar gelişmeye bırakılmıştır (Paterson and Bridge, 1994, Campenhout, 1995, Batum, 1996).

Spor süspansiyonu PDA ortamında 3.2.1.'de verildiği şekilde geliştirilen kültürlerden agar delici ile 1 cm çapında iki adet agarlı blok kesilip, 5 ml'lik steril distile su içine atılarak ve aseptik koşullarda homojenize edilerek hazırlanmıştır (Campenhout, 1995).

Değerlendirme için aşağıdaki yol izlenmiştir:

Test kültürü proteaz enzimi üretebiliyorsa, diğer bir ifadeyle test pozitif ise; besiyerinde bulunan ve bulanıklığı sağlayan süt kazeinini parçalayarak berraklık meydana getirmektedir. Test negatif ise kültür, kazeini parçalayamadığı için besiyeri bulanıklılığını korumaktadır (Şekil 3.1.). Değerlendirme, oluşan berraklığın derinliği cetvel yardımı ile ölçülerek yapılmıştır. Bu ölçümler 3. günden itibaren başlanarak 7. güne kadar sürdürülmüştür (Batum, 1996).

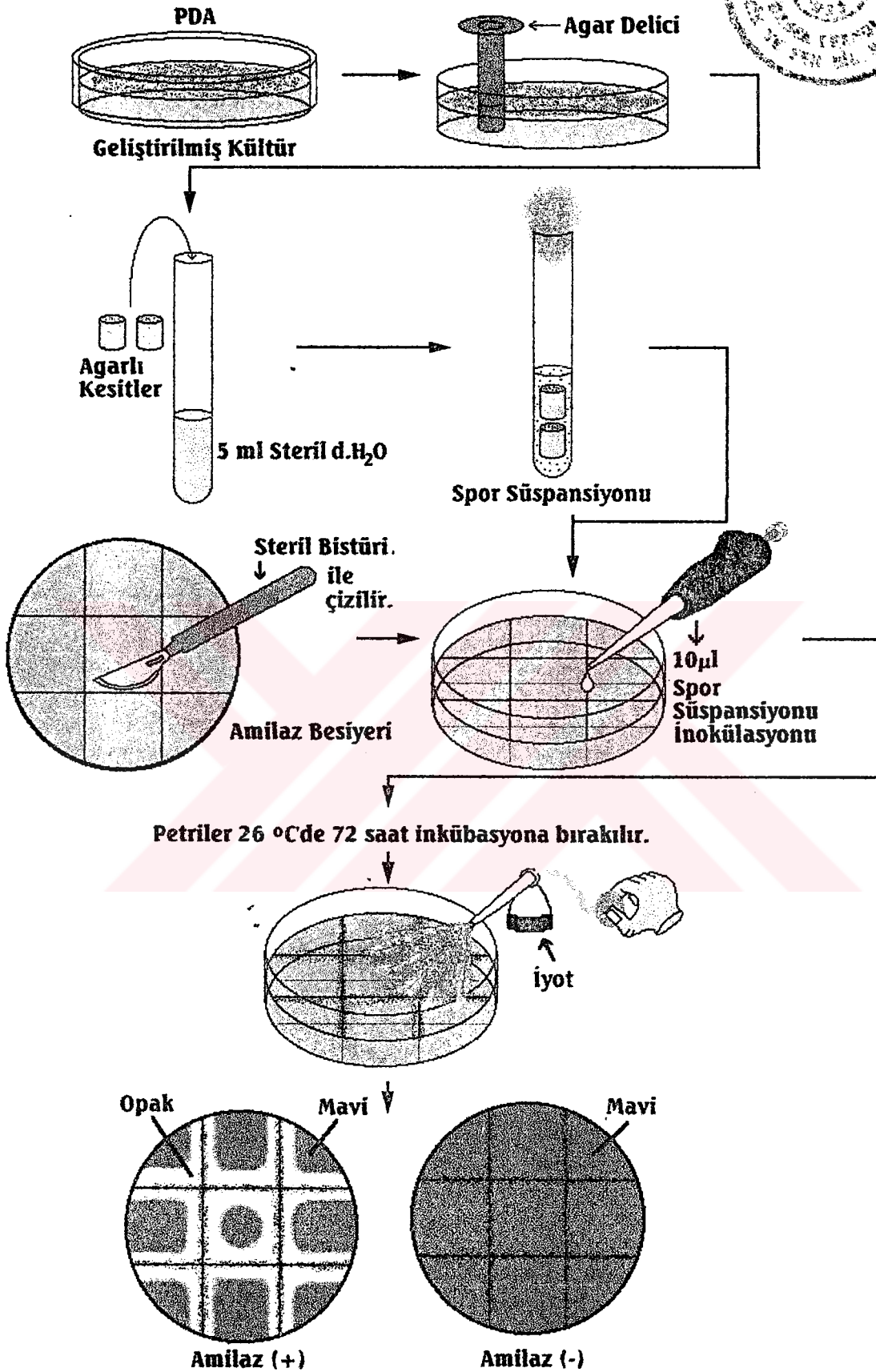


Şekil 3.1. Proteaz aktivitesinin analiz basamakları

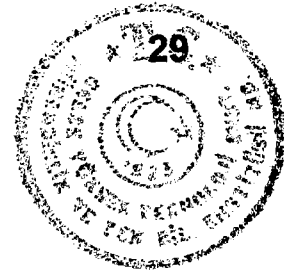
### 3.2.3. Amilaz Üretme Yeteneklerinin Araştırılması

Kültürlerin amilolitik aktivitelerinin belirlenebilmesi için kullanılan özgün amilaz besiyeri; %2 agar, %0.15 bile salt (safra tuzu), %1 çözünebilir nişasta, %0.67'lik yeast nitrogen base (YNB)'den oluşmaktadır. Besi ortamı hazırlamak için nişasta d.H<sub>2</sub>O içinde kaynatılarak çözündürülmüş, 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 katı konsantrasyon YNB'den son konsantrasyon %0.67 olacak şekilde eklenip karıştırılmıştır. Petrilere aseptik koşullarda dökülüp katılaşmaya bırakılmıştır. Petride katılaştıktan besiyerleri yine aseptik koşullarda steril bistüri veya öze yardımı ile birbirine paralel iki çizgi olacak şekilde dikey ve yatay olarak çizilmiştir. Bu çizgilerin birbirini kestikleri noktalara 10 µl spor süspansiyonu (3.2.2.'e göre hazırlanan) inoküle edilmiş ve 26-28 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır (Paterson and Bridge, 1994, Campenhaut, 1995).

72 saat sonra inkübasyondan alınan petrillerdeki kültürün üzerine %0.3'lük iyot püskürtülmüştür. Bunun sonucunda besiyeri içeriğinde bulunan nişasta ile iyot reaksiyona girerek mavi renk oluşumu gözlenmiştir. Sonuçta eğer enzim üretme yeteneği pozitif ise; ortamdaki nişasta, enzim varlığında parçalanmış olduğundan kültürün ürediği alanın etrafı beyaz renk olmakta, diğer alan ise mavi renkte kalmaktadır. Eğer amilaz enzimi sentezlenmemişse petrinin tamamında mavi renk gözlemlenmektedir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Amilaz aktivitesinin analiz basamakları



## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Çalışmada *Penicillium* cinsinden 1006 adet 41 farklı türde kültür proteolitik ve amilolitik aktiviteleri açısından kalitatif taramaya alınmıştır. Proteaz enzimi üretme yeteneklerinin araştırılmasıyla elde edilen bulgular Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Taramaların değerlendirilmesi aşamasında Çizelge 4.1.'de görüldüğü üzere 3 aşama kullanılmıştır. Bu değerlendirmeler formüle edildiğinde;

$$\text{3. günün ölçümleri ortalaması} = \frac{\text{Kültürün 3. gün berraklık derinliği ölçümlerinin toplamı}}{\text{Toplam Kültür adedi}}$$

$$\text{7. günün ölçümleri ortalaması} = \frac{\text{Kültürün 7. gün berraklık derinliği ölçümlerinin toplamı}}{\text{Toplam Kültür adedi}}$$

$$\text{3. ve 7. günlerin ölçümleri ort.ları} = \frac{\text{Kültürün 3. gün ve 7. gün berraklık derinliği ölçümleri ortalamasının toplamı}}{\text{Toplam Kültür adedi}}$$

Proteaz aktivitesi için birçok kaynaktan elde edilen bilgilerden yola çıkarak referans olarak alınan *Penicillium roqueforti*'nin sonuçları ile Çizelge 4.1.'deki sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir (Löffler, 1986, Charazanowska, 1993, Durand-Poussereau and Fevre, 1996). Bu değerlendirmede 3. ve 7. günlük berraklık derinliği ölçümlerinin ortalama değeri 4 mm ve üzerinde olanlar, enzim üretme yeteneği bakımından pozitif sayılmıştır.



Çizelge 4.1. Berraklık derinliğine göre proteolitik aktivite ölçüm sonuçları

İNCELENEN <i>PENICILLIUM</i> TÜRLERİ	TOPLAM SUŞ SAYISI (adet)	3.GÜNÜN DERİNLİK ÖLÇÜMÜ					7.GÜNÜN DERİNLİK ÖLÇÜMÜ					3. VE 7. GÜNLERİN DERİNLİK ÖLÇÜMLERİNİN ORTALAMASI				
		ORTALAMA (mm)	MIN (mm)	* ADET	MAKS (mm)	** ADET	ORTALAMA (mm)	MIN (mm)	* ADET	MAKS (mm)	** ADET	ORTALAMA (mm)	MIN (mm)	* ADET	MAKS (mm)	** ADET
<i>Penicillium aurantogriseolum</i>	149	1	0	124	7	4	7	0	22	19	3	4	0	22	13	3
<i>Penicillium bilalei</i>	1	0	0	1	0	1	9	9	1	9	1	5	5	1	5	1
<i>Penicillium brassicae</i>	41	2	0	1	8	1	14	2	2	19	4	5	1	2	14	1
<i>Penicillium eschschertii</i>	2	2	0	1	4	1	9	5	1	12	1	6	3	1	8	1
<i>Penicillium elysii</i>	203	3	0	89	10	4	13	0	1	21	1	8	0	1	15	4
<i>Penicillium glaucum</i>	12	3	0	4	9	1	14	4	1	23	1	9	2	1	16	1
<i>Penicillium commune</i>	108	0	0	99	9	1	3	0	52	15	1	2	0	52	10	2
<i>Penicillium concentricum</i>	3	1	0	2	3	1	4	0	1	11	1	3	0	1	7	1
<i>Penicillium cyclopium</i>	42	4	0	5	8	3	18	10	3	22	14	11	5	2	15	1
<i>Penicillium cycloatum</i>	1	0	0	1	0	1	11	11	1	11	1	5	6	1	6	1
<i>Penicillium digitatum</i>	2	4	0	1	7	1	15	10	1	20	1	9	5	1	14	1
<i>Penicillium digitatum</i>	1	0	0	1	0	1	6	6	1	6	1	3	3	1	3	1
<i>Penicillium echinatum</i>	10	1	0	9	4	1	13	3	1	22	1	7	2	1	13	1
<i>Penicillium expansum</i>	44	1	0	35	8	1	5	0	14	23	1	3	0	14	16	1
<i>Penicillium fulvum</i>	0	1	0	6	5	1	10	2	1	17	1	5	1	1	10	2
<i>Penicillium funiculosum</i>	5	0	0	5	0	5	3	0	1	7	2	2	0	1	4	2
<i>Penicillium granulatum</i>	11	0	0	10	2	1	4	0	2	10	10	2	0	2	6	1
<i>Penicillium glaucum</i>	35	4	0	6	9	3	16	0	1	22	2	10	0	1	16	1
<i>Penicillium griseocephalum</i>	3	0	0	3	0	3	7	3	1	11	1	4	2	1	6	1
<i>Penicillium jensenii</i>	102	1	0	84	7	1	7	0	12	20	1	3	0	12	14	1
<i>Penicillium implicatum</i>	9	0	0	9	0	9	4	0	3	14	1	2	0	3	7	2
<i>Penicillium jensenii</i>	1	2	2	1	2	1	10	10	1	10	1	5	6	1	6	1
<i>Penicillium jensenii</i>	1	0	0	1	0	1	5	5	1	5	1	3	3	1	3	1
<i>Penicillium lividum</i>	14	1	0	8	2	2	14	12	1	16	2	7	6	1	9	3
<i>Penicillium melaleucum</i>	2	0	0	2	0	2	8	6	1	9	1	4	3	1	5	1
<i>Penicillium miczynski</i>	4	0	0	4	0	4	5	0	1	10	1	3	0	1	5	1
<i>Penicillium nigrogriseum</i>	15	3	0	4	9	1	13	2	1	20	1	5	1	1	15	1



Çizelge 4.1. (Devamı) Berraklık derinliğine göre proteolitik aktivite ölçüm sonuçları

İNCELENEN <i>PENICILLIUM</i> TÜRLERİ	TOPLAM SUŞ SAYISI (adet)	3.GÜNÜN DERİNLİK ÖLÇÜMÜ					7.GÜNÜN DERİNLİK ÖLÇÜMÜ					3. VE 7. GÜNLERİN DERİNLİK ÖLÇÜMLERİNİN ORTALAMASI				
		ORTALAMA (mm)	MİN (mm)	* ADET	MAKS (mm)	** ADET	ORTALAMA (mm)	MİN (mm)	* ADET	MAKS (mm)	** ADET	ORTALAMA (mm)	MİN (mm)	* ADET	MAKS (mm)	** ADET
<i>Penicillium ochrosporum</i>	3	1	0	1	2	1	10	7	1	14	1	5	4	1	8	1
<i>Penicillium oxysporum</i>	3	4	0	1	9	1	15	6	1	23	1	10	3	1	16	1
<i>Penicillium parvum</i>	5	2	0	1	4	2	11	2	1	18	1	7	1	1	11	1
<i>Penicillium rubrum</i>	1	0	0	1	0	1	10	10	1	10	1	5	5	1	5	1
<i>Penicillium roqueforti</i>	7	0	0	7	0	7	8	0	1	11	1	4	0	1	6	1
<i>Penicillium rubrum</i>	1	0	0	1	0	1	14	14	1	14	1	7	7	1	7	1
<i>Penicillium rugosum</i>	7	1	0	5	3	1	8	3	3	17	1	4	2	3	10	1
<i>Penicillium spinulosum</i>	2	0	0	2	0	2	8	0	1	15	1	4	0	1	8	1
<i>Penicillium strobilium</i>	3	0	0	2	1	1	8	2	1	14	1	4	1	1	8	1
<i>Penicillium subterreum</i>	1	2	2	1	2	1	11	11	1	11	1	7	7	1	7	1
<i>Penicillium thymum</i>	3	3	0	1	4	2	16	14	1	17	1	9	7	1	11	1
<i>Penicillium variable</i>	4	0	0	4	0	4	7	4	1	11	1	3	2	1	6	1
<i>Penicillium verrucosum</i>	43	1	0	27	5	1	6	0	14	18	1	3	0	14	10	2
<i>Penicillium virens</i>	6	0	0	5	1	1	8	3	2	12	1	4	2	2	6	3
<i>Penicillium wakschii</i>	2	2	0	1	4	1	8	0	1	15	1	5	0	1	10	1

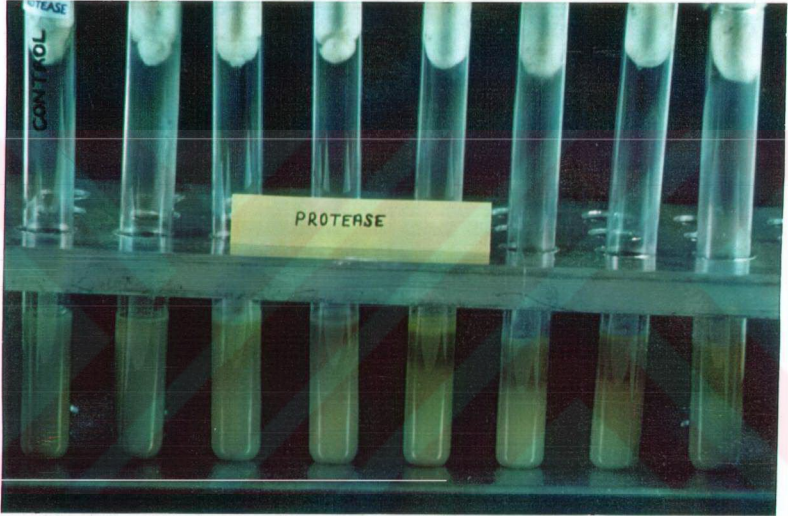
\* Minimum değere sahip olan kültür adedi.

\*\* Maksimum değere sahip olan kültür adedi.

Koyu renkli hücreler ; proteolitik aktivitesi pozitif olanları (3. ve 7. günlerin berraklık derinliği ortalamasının ortalaması >= 4 mm olanları) göstermektedir. Pozitif olan toplam kültür sayısı 773'dür.



Denemelerde türler arasındaki farklılıkların yanısıra, herbir türün kendi aralarında da farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Buna göre, kendi aralarında bile en yüksek ve en düşük değere sahip türler saptanmıştır (Fotoğraf 4.1.).



Fotoğraf 4.1. Proteolitik aktivite taramaları sonucunda denenen farklı kültürlerin kontrole karşılık görüntüleri.

Soldan sağa doğru;

Tüp 1: Kontrol tüpü.

Tüp 2: Proteolitik aktivite göstermeyen kültürün bulunduğu tüp (berraklık gözlenmiyor).

Tüp 3,4,5,6,7,8: Birbirlerinden farklı proteolitik aktiviteye sahip olan kültürlerin bulunduğu tüpler.

Çizelge 4.1.'e göre 3. gün berraklık derinliği ölçümlerinden elde edilen en düşük değer 574 suшта, "0 mm" olup, en yüksek değer 10 suшта "10 ve 9 mm" olarak belirlenmiştir. 7. gün berraklık derinliği ölçümlerinde ise; en düşük değer 127 suшта "0 mm" olup, en yüksek değer 18 suшта "23 ve 22 mm" olarak gözlenmiştir. Üçüncü ve yedinci günlük ölçümlerin ortalamasında ise en düşük değer 127 suшта "0 mm" olup, en yüksek değer 9 suшта "16 ve 15 mm" olarak elde edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde kültürlerden 773 adedinin (%77'si) proteaz pozitif sonuç verdiği gözlenmiştir.

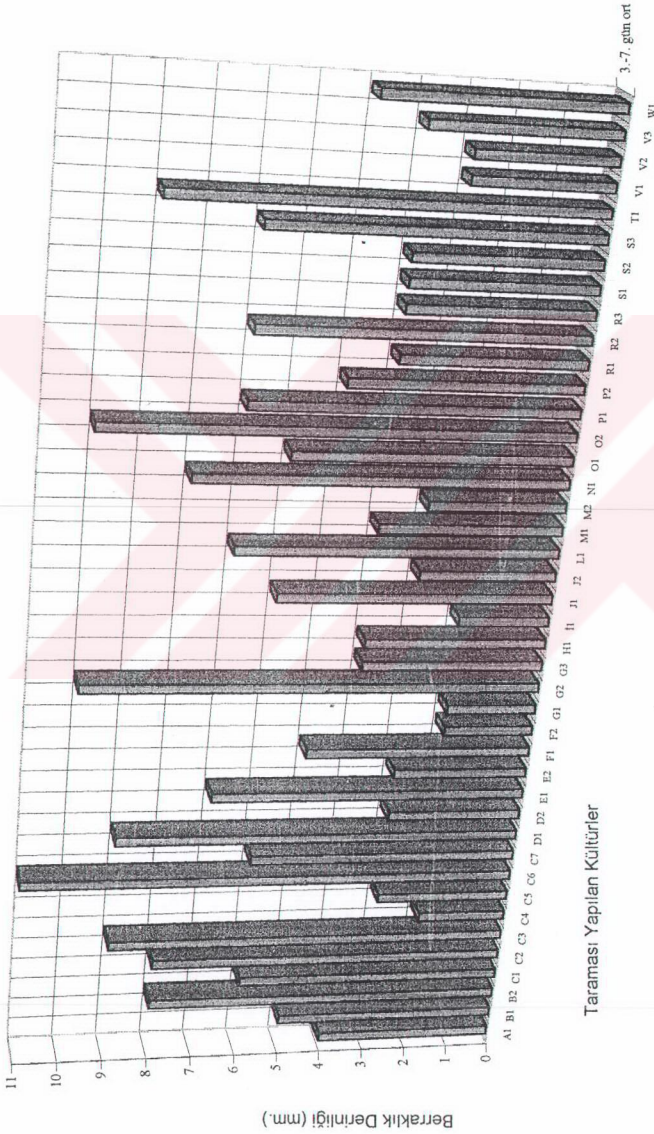
Yapılan değerlendirme sonuçları Şekil 4.1.'de grafiklenmiştir. Bu kültürlerin aralarında da en yüksek aktiviteye sahip olanı ise grafikte görüldüğü üzere *P.corylophilum*'dur. Yüksek aktivite değerleri bakımından bunun ardından sırasıyla: *P.griseofulvum*, *P.olsonii*, *P.citrinum*, *P.thomi*, *P.decumbens*, *P.brevicompectum*, *P.chrysogenum* ve *P.nalgivense* kültürleri saptanmıştır.

*P.commune*, *P.concentricum*, *P.digitatum*, *P.funiculosum*, *P.granulatum*, *P.implicatum*, *P.jensenii*, *P.miczynski*, *P.variable* ve *P.verrucosum* ise proteolitik aktivite açısından negatif sonuç vermiştir.

Çizelge 4.1.'in sonuçlarına göre yapılan değerlendirmede 3. ve 7. günlerin ortalamaları Şekil 4.2.'de grafiklenmiştir. Grafiği incelediğimizde 3. günün berraklık derinliği ortalaması en yüksek olanlar: *P.corylophilum*, *P.decumbens*, *P.griseofulvum* ve *P.olsonii*'dir. 7. günün ölçümlerinde ise en yüksek olanı *P.corylophilum*'dur.

Benzer bir çalışmada Chrazanowska ve arkadaşları (1993); küflerde proteazların belirlenebilmesi için *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Mucor*'u içeren genustardan oluşan 100 tür üzerinde çalışmışlardır. Bunun sonucunda özellikle *Penicillium* türlerinin asit proteaz açısından oldukça zengin, alkali ve nötral proteazlar açısından fakir olduğu bildirilmiştir. Çeşitli

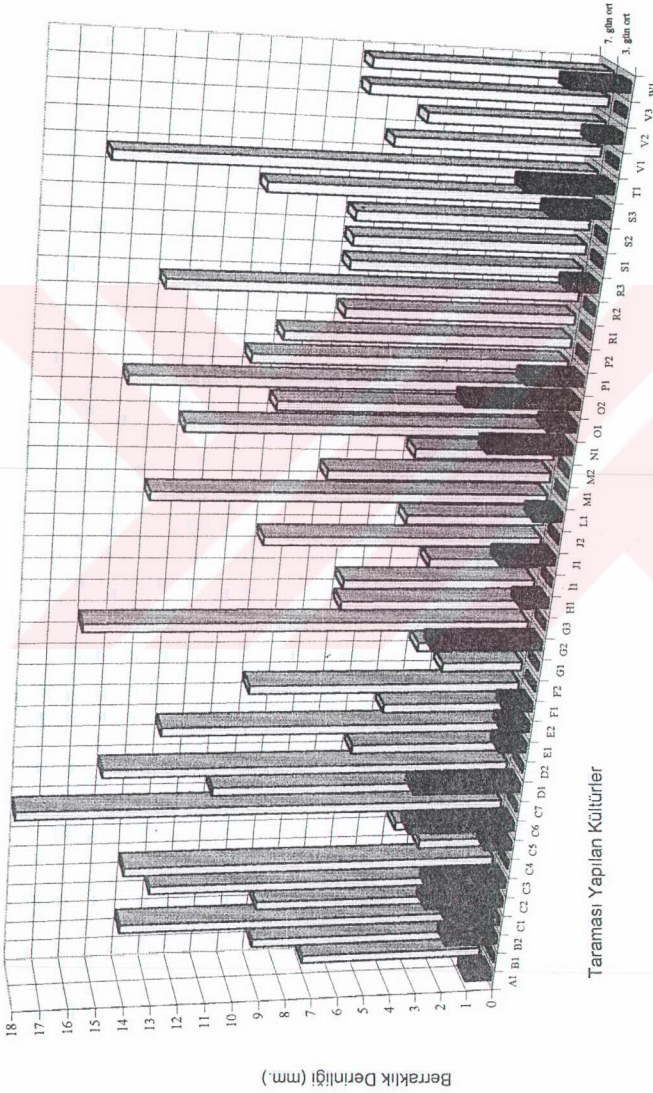




Şekil 4. 1. Proteolitik aktivite taraması yapılan *Penicillium* kültürlerinin 3. ve 7. günlerdeki

berraklık derinliği ölçümlerinin ortalama değerleri.

- (A1)*Penicillium aurantogriseum* B1P-biladi B2P-brevicompatum C1P-camamberti C2P-cirsogenum C3P-clitrimum C4P-commune C5P-concentricum C6P-corylophyllum C7P-cyanum D1P-decumbens D2P-digitatum E1P-echinulatum E2P-expansum F1P-frequentans F2P-funiculosum G1P-gravidatum G2P-griseofolium G3P-grisorosetum H1P-hirsutum I1P-implicatum J1P-janthinellum L1P-lividum M1P-megasporum M2P-miczynski N1P-nalgiowense O1P-ochraceum O2P-obsonii P1P-paraherquei P2P-puberulum R1P-ropaeiforme R2P-rubidum R3P-rugulosum S1P-spinulosum S2P-ateckii S3P-sablatierii T1P-thomii V1P-variable V2P-verrucosum V3P-viridicatum W1P-wakonani)



Şekil 4.2. Proteolitik aktive taraması yapılan *Penicillium* kültürlerinin 3. gün berraklık derinliği ortalaması ile 7. gün berraklık derinliği ortalaması değerleri.

(A1) *Penicillium aurantiogriseum* B1; B1a1) *B2.P. brevicompactum* C1P; canamberti C2P; chrysogenum C3P; citrinum C4P; commune C5P; concentricum C6P; corylophilum C7P; cyanum D1P; decumbens D2P; digitatum E1P; echinulatum E2P; expansum F1P; frequentans F2P; funiculosum G1P; granulatum G2P; griseofibum G3P; griseoroseum H1P; hirsutum I1P; implicatum J1P; janthinellum L1P; lividum M1P; megasporum M2P; mitisynski N1P; nealioense O1P; ochraceum O2P; olsonii P1P; parabeurqueti P2P; puberulum R1P; roqueforti R2P; rubidum R3P; rugulosum S1P; spinulosum S2P; steckii S3P; sublateritium T1P; thomii V1P; variable V2P; verrucosum V3P; viridicatum W1P; waksmani)

ortamlarda geliştirilen 10 farklı *Penicillium* türüyle (*P.decumbens*, *P.chrysogenum*, *P.piscaricum*, *P.lilacinum*, *P.spinulosum*, *P.cyclopium*, *P.camamberti* (2 adet), *P.roqueforti*, *P.candidum*) yapılan bu çalışmada proteaz biyosentezi 5 farklı besiyeri kullanılarak incelenmiştir. Proteolitik aktivite durumu hemoglobinin pH 3.2'deki ve kazeinin pH 7.0'daki denatürasyonu ile ölçülmüştür. Glukozu karbon kaynağı, kazeini azot kaynağı olarak kullanan ve ekstrasellüler proteaz üreticisi olan bu türlerin aktivite durumları üç grupta değerlendirilmiştir. Buna göre proteaz aktivitesi 35 U/ml (Ünite/ml) ve üzerinde olanlar düşük, 50 U/ml ile 60 U/ml arasında olanlar orta, 80 U/ml yakınındakiler ise yüksek olarak kabul edilmektedir. *Penicillium* türlerinin yüksek verimlilikte ekstrasellüler proteolitik enzimleri asidik veya nötral pH'da sentezleyebildiği bulunmuştur. Sonuçta, *P.piscaricum*, *P.cyclopium*, *P.candidum*, *P.camamberti* en aktif türler olarak belirlenmiştir (Chrazanowska et al, 1993).

Mikrobiyal enzimlerin peptid bağlarını hidrolizleme durumuna göre sınıflandırılmasında; *P.janthinellum*'un karboksil proteaz, *P.roqueforti* 'nin nötral proteaz, *P.notatum*'un ise ekstrasellüler proteaz üreticisi olduğu belirlenmiştir. Serin karboksipeptidazlar *Penicillium sp.*'den ve mayalardan izole edilmiştir (Fogarty, 1983).

Yapılan çeşitli çalışmalarla *P. janthinellum*'da pepsin benzeri enzimin (penicilliopepsin) doğal olarak bulunduğu belirlenmiş ve saflaştırılmıştır (Matsubara and Feder, 1971, Fogarty, 1983, Rainbow and Rose, 1963). Endüstriyel olarak peynircilik sektörüne yönelik konuyla ilgili birçok araştırma yapılmış olup, laktik asit bakterileri ve diğer mikroorganizma kökenli proteazların, peynir mayasında farklı etkilerinin olup olmadığı incelenmiştir. Bu kapsamda steril telemeye ilave edilen değişik kökenli enzim çözeltilerinin etkileri de araştırılmıştır. *Penicillium caseicolum* kökenli nötr proteazın ve *P.roqueforti* kökenli asit proteazın düşük miktarda aminoasit üretim yetenekleri yanında özellikle çözünür azot miktarını artırarak peynircilikte etkili oldukları belirlenmiştir (Fogarty, 1983).



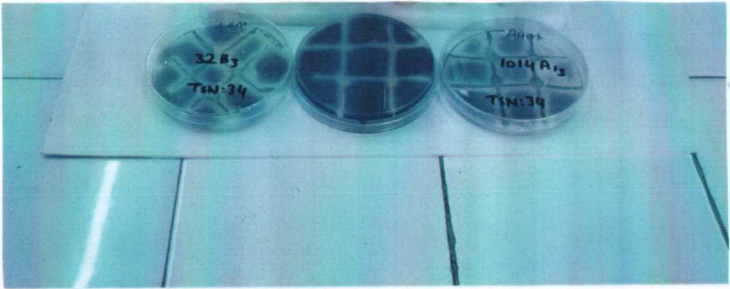
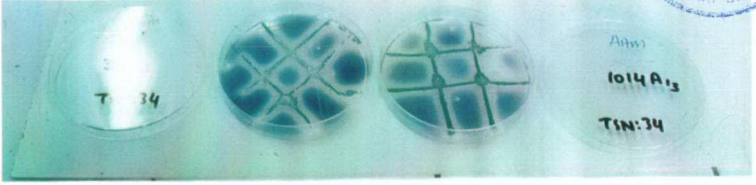
Çok sayıda çalışmada çeşitli proteazlar için *Aspergillus* sp.'lerinin potansiyel kaynak oldukları ve endüstriyel üretimde kullanılan başlıca suşlar arasında yer aldıkları bildirilmiştir (Rainbow and Rose,1963, Matsubara and Feder, 1971, Smith and Berry, 1975, Fogarty, 1983, Godfrey and Reichelt, 1983, Kennedy, 1987, Malathi and Chakraborty, 1991, Batum, 1997a).

*Penicillium cyaneafulum*'un pH 8.2-8.5 arasında en iyi alkalın proteaz ürettiği fakat kazein üzerindeki optimal aktivitesinin pH 9.5-11.0 arasında olduğu bulunmuştur (Rainbow and Rose,1963).

Amilolitik aktivite açısından yine 1006 adet *Penicillium* sp. kültürü denemeye alınmış sonuçlar Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Çizelge 4.2.' ye göre; 481 suş (+) pozitif, 363 suş ( $\pm$ ) tartışılabilir, 162 suş (-) negatif sonuç vermiştir. Deneme sonucunda amilaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirilen kültürlerin görünümleri Fotoğraf 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2.'ye göre amilaz enzim potansiyeli açısından kendi aralarında en yüksek orana sahip olanlar ( $\geq$ %60): *P.aurantiogriseum*, *P.bilalii*, *P.commune*, *P.concentricum*, *P.cyaneum*, *P.echinulatum*, *P.expansum*, *P.frequentans*, *P.funiculosum*, *P.granulatum*, *P.hirsitum*, *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* 'dir. Hiç amilolitik aktivite göstermeyenler *P.griseoroseum*, *P.puberulum* ve negatiflik oranı yüksek olanlar ise *P.griseofulum*, *P.lividum*'dur.

Amilolitik aktivitesi tartışılabilir durumda olanlar diğer bir ifade ile çok az bir aktivite gösterenler ise; *P.citrinum*, *P.corylophilum*, *P.digitatum*, *P.janthinellum*, *P.rubidurum* ve *P.thomii* türleri olarak saptanmıştır.



Fotoğraf 4.2. Amilolitik aktiviteye sahip birkaç kültürün aktivite testi sonucundaki görüntüleri.



Çizelge 4.2. Opasite durumuna göre amilolitik aktivite analiz sonuçları

İNCELENEN <i>PENICILLIUM</i> TÜRLERİ	TOPLAM SUŞ SAYISI (adet)	AMİLAZ (+)		AMİLAZ (+/-)		AMİLAZ (-)	
		ADET	ORAN (%)	ADET	ORAN (%)	ADET	ORAN (%)
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	149	115	77	34	23	0	0
<i>Penicillium bialii</i>	1	1	100	0	0	0	0
<i>Penicillium brevicompactum</i>	41	20	49	21	51	0	0
<i>Penicillium camamberti</i>	2	1	50	1	50	0	0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	287	46	16	148	51	93	33
<i>Penicillium citrinum</i>	12	1	8	11	92	0	0
<i>Penicillium commune</i>	108	71	66	30	28	7	6
<i>Penicillium concentricum</i>	3	3	100	0	0	0	0
<i>Penicillium corylophyllum</i>	42	9	21	29	69	4	10
<i>Penicillium cyaneum</i>	1	1	100	0	0	0	0
<i>Penicillium decumbens</i>	2	1	50	1	50	0	0
<i>Penicillium digitatum</i>	1	0	0	1	100	0	0
<i>Penicillium echinulatum</i>	10	10	100	0	0	0	0
<i>Penicillium expansum</i>	44	26	60	18	40	0	0
<i>Penicillium frequentans</i>	10	7	70	3	30	0	0
<i>Penicillium funiculosum</i>	5	5	100	0	0	0	0
<i>Penicillium granulatum</i>	11	9	82	1	9	1	9
<i>Penicillium griseofulvum</i>	35	4	11	3	9	28	80
<i>Penicillium griseoroseum</i>	3	0	0	0	0	3	100
<i>Penicillium hirsitum</i>	102	76	75	23	23	3	2
<i>Penicillium implicatum</i>	9	7	78	1	11	1	11
<i>Penicillium janthinellum</i>	1	0	0	1	100	0	0
<i>Penicillium jensenii</i>	1	1	100	0	0	0	0
<i>Penicillium lividum</i>	14	1	7	2	14	11	79
<i>Penicillium megalosporum</i>	2	2	100	0	0	0	0
<i>Penicillium miczynski</i>	4	3	75	1	25	0	0
<i>Penicillium nalgiovense</i>	15	3	20	7	47	5	33
<i>Penicillium ochraceum</i>	3	2	67	0	0	1	33
<i>Penicillium olsonii</i>	3	2	67	1	33	0	0
<i>Penicillium paraherquei</i>	5	1	20	2	40	2	40
<i>Penicillium puberulum</i>	1	0	0	0	0	1	100
<i>Penicillium roqueforti</i>	7	3	43	4	57	0	0
<i>Penicillium rubidurum</i>	1	0	0	1	100	0	0
<i>Penicillium rugulosum</i>	7	6	86	1	14	0	0
<i>Penicillium spinulosum</i>	2	2	100	0	0	0	0
<i>Penicillium steckii</i>	3	2	67	1	33	0	0
<i>Penicillium sublateralitium</i>	1	1	100	0	0	0	0
<i>Penicillium thomii</i>	3	1	33	2	67	0	0
<i>Penicillium variable</i>	4	2	50	2	50	0	0
<i>Penicillium verrucosum</i>	43	29	67	12	28	2	0
<i>Penicillium viridicatum</i>	6	5	83	1	17	0	0
<i>Penicillium waksmani</i>	2	2	100	0	0	0	0
<b>TOPLAM</b>	<b>1006</b>	<b>481</b>	<b>%48</b>	<b>363</b>	<b>%36</b>	<b>162</b>	<b>%16</b>

Amilolitik aktivite açısından da pekçok çalışma yapılmaktadır. Konuyla ilgili bir grup çalışmada, *Aspergillus* ve *Penicillium spp.*'lerden oluşan 360 suşta aktivite taraması yapılmış ve *Aspergillus niger* NRRL 337'nin amilaz üreticisi olduğu saptanmıştır (Kennedy, 1987). *P.funiculosum*'un ise  $\alpha$ -amilaz ve endodekstranaz üreticisi olarak kullanıldığı bildirilmiştir. *P.funiculosum*'un haricinde *P.lilacinum*, *P.purpurogenum* ve *P.verrucosum*'da dekstranaz üretebilmektedir (Rainbow and Rose, 1963).

Doyle ve ark. (1987) tarafından yapılan bir çalışmada *P.amagasakiense*'nin amilolitik sistemi incelenmiştir. Buna göre *P.amagasakiense* mısırı karbon kaynağı olarak kullandığında 25 °C'deki femantasyonun 90. saatinde gelişmesinin durgun faz döneminde çok miktarda ekstrasellüler  $\alpha$ -amilaz ürettiği belirlenmiştir. Aynı zamanda amiloglukosidaz ürettiği de gözlenmiştir. Yine aynı araştırmacılar nişastadan yüksek miktarda maltoz üretimi için diğer *Penicillium* türlerinden  $\alpha$ -amilaz eldesi için çalışmalarını sürdürmüşlerdir.

$\alpha$ -Amilaz üreten suşlar arasında *Aspergillus sp.*, *Mucor sp.* ve *Penicillium sp.* küflerinin başlıca kaynaklar olduğu bildirilmiştir. Yine bir patent çalışmasında da *P.expansum*'dan  $\alpha$ -amilazın elde edilebildiği belirlenmiştir. *P.oxalicum*'un ise iyi bir amiloglukosidaz üreticisi olduğu ve amilozu hızla maltotrioz ve maltoza çevirdiği saptanmıştır. Buradaki bulgular tez çalışma sonuçlarıyla çakışmaktadır (Fogarty, 1983).

Bir patent çalışmasına göre *P.expansum*'un ürettiği  $\alpha$ -amilaz, unlu mamüllerde oldukça iyi sonuç vermiştir ve son yıllarda una fungal enzimlerin katılmasını takiben ekmek kalitesi ve kabarma özelliğindeki düzelme bu sonucu doğrulamaktadır (Dubois, 1980).

Hankin ve Anagnostakis (1975)'in birlikte yaptıkları bir çalışmada, sıvı besi ortamı kullanarak küflerin amilaz, proteaz, lipaz, DNAaz, RNAaz, üreaz, kitinaz ve pektinaz gibi ekstrasellüler enzimleri üretme potansiyelleri

incelenmiş, *Penicillium* türlerinin amilolitik aktivite göstermediği, sadece proteolitik aktivite gösterdiği ileri sürülmüştür. Ancak ileriki yıllarda yapılan çalışmalar, tez araştırma bulgularında da saptandığı üzere, bu görüşün dışındaki sonuçlarla karşılaştıldığını göstermiştir.

## 5. SONUÇ

Son zamanlarda biyoteknolojideki gelişmeler yeni enzim teknolojilerini teşvik etmektedir. Günümüzde enzimlerin en önemli kullanım alanları, makromoleküllerin hidrolizini kapsamaktadır. Fakat enzimlerin endüstriyel kullanımı biosentetik amaçlar açısından da büyük öngörüler içermektedir. Aynı zamanda çevre korumaya yönelik önlemlerde anahtar rol oynamaktadır. Gen teknolojisi ve protein mühendisliği, bu yeni oluşumlardaki gelişmelerin çok büyük bir parçasını üstlenmektedir. Bu yöndeki araştırma programları, yeni kaynak mikroorganizmaların bulunmasını hedeflemektedir.

Türkiye'nin çeşitli tarımsal ürün ve gıdalarından izole ve identifiye edilmiş *Penicillium* kültürleri proteolitik ve amilolitik yetenekleri bakımından incelenmiş, elde edilen bulgular öncelikle kendi aralarında karşılaştırılmış ve potansiyel kaynak olan suşlar belirlenmiştir. Bu veriler diğer araştırmalarla karşılaştırıldığında sonuçlar arasında önemli ölçüde paralellik olduğu gözlenmiştir. Böylece kendi küf kültürlerimizin proteolitik ve amilolitik enzim üretme potansiyelleri hakkında bilgi edinilmiş ve ileriye yönelik çalışmalar için de büyük öneme sahip bir ön çalışma gerçekleştirilmiştir. Yine ileride yapılacak kantitatif boyutlu araştırmaları yönlendirmek üzere bir veri tabanı hazırlanması faaliyetinin bir bölümü gerçekleştirilmiştir. Bulgular, ilgili kültür koleksiyonunun bu enzimler açısından önemli bir potansiyel olduğunu da ortaya koymuştur.





## KAYNAKLAR

- BATUM, M.**, Karşılıklı görüşme, ORBA Biyokimya A. Ş. Tuzla-İSTANBUL, 1996.
- BATUM, M.(a)**, Enzimlerin fermantasyon ile üretimi, Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar, TÜBİTAK MAM GMBAE Lisansüstü Yazokulu Kitapçığı (Baskısı yapılmamıştır), 131-149, 1997.
- BATUM, M.(b)**, Enzimlerin tekstil, deterjan ve dericilik sektöründeki uygulamaları, Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar, TÜBİTAK MAM GMBAE Lisansüstü Yaz Okulu Kitapçığı (Baskısı yapılmamıştır), 293-303, 1997.
- CAMPENHOUT, L.**, Moutmicroflora: Kwantificeren, Isoleren en karakteriseren van shimmels, Ph.D. Thesis, Katholieke Universiteit Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Leuven, 62-64, 1995.
- CHRAZANOWSKA, J., KOLACZKOWSKA, M. and POLANOWSKI, A.**, Production of exocellular proteolytic enzymes by various species of *Penicillium*, Enzyme Microbial Technology, 15, 140-143, 1993.
- COWAN, D.**, Industrial enzyme technology, TIBTECH, 14, 177,178, 1995.
- DAĞAŞAN, L.**, Enzimlerin gıda ve hayvan yemi üretimindeki uygulamaları, Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar, TÜBİTAK MAM GMBAE Lisansüstü Yaz Okulu Kitapçığı (Baskısı yapılmamıştır), 284-292, 1997.
- DOYLE, E. M., CATHERINE, T. K., FOGARTY, W. M.**, The amylolytic enzymes of *Penicillium amagasakiense*, Biochemical Society Transactions, 16,181,182, 1988.
- DUBOIS, D. K.**, Enzymes in baking, QIB Research Department Technical Bulletin, 2(12), 1-10, 1980.
- DURAND-POUSSEREAU, N. and FEVRE, M.**, Characterisation of a protease deficient strain of *Penicillium roqueforti* generated by heterologous plasmid integration: Potential use for protein production, Journal of Biotechnology, 51, 97-105, 1996.

- ESKIN, N. A. M., HENDERSON, H. M., TOWNSEND, R. J.**, Biochemistry of Foods, Academic Press, USA, 137-141, 1971.
- FOGARTY, W. M.**, Microbial Enzymes and Biotechnology, Applied Science Publishers, England, 382p, 1983.
- GODFREY, T. and REICHEL, J.**, Industrial Enzymology, The Applications of Enzymes in Industry, Macmillan Publishers Ltd., Great Britain, 581p, 1983.
- GÖZÜKARA, M. E.**, Enzimler, Biyokimya, Ofset Repromat Ltd. Şti., Ankara, 572-675, 1989.
- HANKIN, L. and ANAGNOSTAKIS, S. L.**, The use solid media for detection of enzyme production by fungi, Mycologia, 8, 597-607, 1975.
- JAMES, J. and SIMPSON, B. K.**, Applications of enzymes in food processing, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36(5), 437-463, 1996.
- KAZAN, D.**, Enzimlerin sınıflandırılması ve kimyası, Enzim Mühendisliğinde Temel Konular ve Uygulamalar, TÜBİTAK MAM GBTAE Lisansüstü Yazokulu Kitapçığı (Baskısı yapılmamıştır), 13-45, 1997.
- KENNEDY, J. F.**, Enzyme Technology, Biotechnology, VCH, Germany, Vol 7a, 761p, 1987.
- KRISTIANSEN, B. and BU'LOCK, J. D.**, Developments in industrial fungal biochemistry, The British Mycological Society Symposium Series no: 3 Fungal Biotechnology, Academic Press Ltd., London, 203-223, 1980.
- LOFFLER, A.**, Proteolytic Enzymes: Sources and Applications, Food Technology, 40(1), 63-70, 1986.
- MALATHI, S. and CHAKRABORTY, R.**, Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate Under Solid-Substrate Fermentation conditions for use depilation agent, Applied and Environmental Microbiology, 57 (3), 712-716, 1991.
- MATSUBARA, H. and FEDER, J.**, Other Bacterial, Mold and Yeast Proteases, The Enzymes, Academic Press Ltd., USA, Vol 3, 721-795, 1973.



- PATERSON, R. R. M. and BRIDGE, P. D.**, Biochemical Techniques for Filamentous Fungi, IMI Technical Handbooks: No: 1, International Mycological Institute (CAB International), Wallingford, USA, 125p, 1994.
- PRIEST, F. G.**, Enzymes, extracellular, Encyclopedia of Microbiology, Academic Press, Vol: 2, 81-93, 1992.
- RAINBOW, C. and ROSE, A. H.**, Biochemistry of Industrial Micro-organisms, Chapter 4: Microbial extracellular enzymes, their uses and some factors affecting their formation, Academic Press, London, 68-151, 1963.
- REED, G.**, Proteolytic enzymes, Enzymes in Food Processing, Academic Press, New York, 109-341, 1966.
- SMITH, D. and ONIONS, H. S. A.**, The Preservation and Maintenance of Living Fungi, 2<sup>nd</sup> Edition, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey Richmond, England, 122p, 1994.
- SMITH, J. E. and BERRY, D. R.**, The Filamentous Fungi Vol: 1 Industrial Mycology, Chapter 10: Industrial enzyme production, Edward Arnold Ltd., Great Britain, 193-211, 1975.
- TOPAL, Ş.**, Mikrobiyolojik yolla rennin üretimi, TÜBİTAK MAM Beslenme ve Gıda Teknolojisi Bölümü Raporu, Yayın No: 63, 96s, 1982.
- TOPAL, Ş.**, Enzimler, mikrobiyolojik yolla enzim üretimi ve bu teknolojiye renninin yeri, Gıda 10(1), 25-37, 1985.
- TOPAL, Ş.**, Gıdalarda bulunan toksik küfler ve sağlık açısından değerlendirilmesi, Gıda, 11(6), 345-349, 1986.
- TOPAL, Ş.**, Mikrobiyal enzimler ve biyoteknolojik yolla rennin üretimindeki gelişmeler, Gıda 13(3), 183-190, 1988.
- TOPAL, Ş.**, Küf koleksiyonlarının oluşturulması ve korunumu, Gıda, 14(6), 371-380, 1989.
- TOPAL, Ş.**, Türkiye'nin dominant mikoflorasıyla kültür koleksiyon merkezi oluşturulması, KÜKEM Dergisi, 21(1), 69-88, 1998.

**TOPAL, Ş., PEMBEÇİ, C., BATUM, M., BORCAKLI, M., ÇELTİK, Ö.**

Türkiye'nin tarımsal mikoflorasının endüstriyel öneme sahip bazı enzimatik aktivitelerinin incelenmesi I. amilaz, proteaz, lipaz, Türk Biyoloji Dergisi (Basımda), 1998.

**UNDERKOFER, A. L.**, Microbial Enzymes, Industrial Microbiology, McGraw-Hill Book Company, USA, 128-164, 1976.





## ÖZGEÇMİŞ

1974 Yılında Karaman'da doğdu. 1995 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 1995 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Bilimleri Enstitüsü Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 1996 yılı Mart ayından itibaren TÜBİTAK MAM Gıda Bilimi ve Teknolojileri Araştırma Enstitüsünde Araştırmacı olarak çalışmaktadır.