



Investigation of industrially important enzyme activities of thermophilic and thermotolerant filamentous fungi

Derya BERİKTEN ^{*1}, Merih KIVANÇ²
ORCID: 0000-0002-8672-4813; 0000-0002-8647-3428

¹ Kutahya Health Sciences University, Training and Research Center, 43100, Kutahya, Turkey

² Eskisehir Technical University, Faculty of Science, Department of Biology, 26470, Eskisehir, Turkey

Abstract

Fungi are widely used in the production of many enzymes of industrial importance, mainly because they can grow on low-cost substrates and secrete large amounts of enzymes extracellularly. The most important reason for choosing thermostable enzymes in industrial applications is their stability, which provides low activity losses against high temperatures applied during the pretreatment of raw materials. In this study, industrially important lipase, amylase, cellulase, phytase and protease enzyme activities were investigated on 6 thermophilic and 57 thermotolerant fungi species. Screening of fungi producing extracellular lipase, amylase, cellulase, phytase, protease was carried out in petri dishes or tubes using special nutrient media for different enzymes. As a result, 63 cultures consisting of *Humicola insolens*, *Lichtheimia corymbifera*, *Rhizomucor pusillus*, *Melanocarpus albomyces*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* species were determined to produce 5 different enzymes, and those with positive results from these cultures were determined: 18 for phytase (28,5%), 63 (100%) for protease, 14 (22%) for amylase, 63 (100%) for lipase, 57 (90%) for cellulase. As a result of enzyme screening studies, the best phytase producer species *R. pusillus* and *A. terreus*, protease producer species *A. fumigatus*, amylase producer species *A. terreus*, *L. corymbifera* and *R. pusillus*, lipase producer species *A. fumigatus*, cellulase producer species *A. fumigatus* has been determined. We believe that the determination of the thermophilic and thermotolerant fungi used in the study that are capable of producing thermostable enzymes such as lipase, amylase, cellulase, protease and phytase, which have industrial importance, will shed light on the evaluation of these fungi and their enzymes in future studies.

Key words: Thermophilic, thermotolerant, filamentous fungi, enzyme, thermostable

----- * -----

Termofilik ve termotolerant filamentli fungus türlerinin endüstriyel öneme sahip enzim aktivitelerinin incelenmesi

Özet

Funguslar, temel olarak düşük maliyetli substratlarda büyüyebildikleri ve hücre dışı olarak büyük miktarda enzim salgıladıkları için endüstriyel öneme sahip birçok enzimin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Termotabil enzimlerin endüstriyel uygulamalarda seçilmesinin en önemli sebebi ham maddelerin ön işlemleri sırasında uygulanan yüksek sıcaklıklara karşı düşük aktivite kayıplarını sağlayan stabiliteledir. Bu çalışmada 6 termofilik ve 57 termotolerant fungus türü üzerinde endüstriyel öneme sahip olan lipaz, amilaz, selüloz, fitaz ve proteaz enzim aktiviteleri araştırılmıştır. Hücre dışı lipaz, amilaz, selüloz, fitaz, proteaz üreten fungusların taranması, farklı enzimler için özel besin ortamları kullanılarak petri kaplarında veya tüplerinde gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, *Humicola insolens*, *Lichtheimia corymbifera*, *Rhizomucor pusillus*, *Melanocarpus albomyces*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* türlerinden oluşan 63 adet kültürün 5 farklı enzimi üretme potansiyelleri belirlenmiştir ve bu kültürlerden pozitif sonuç verenler: fitaz için 18 (%28,5), proteaz için 63 (%100), amilaz için 14 (%22), lipaz için 63 (%100), selüloz için 57 (%90) olarak belirlenmiştir. Enzim tarama çalışmaları sonucunda en iyi fitaz üreticisi türler *R. pusillus* ve *A. terreus*, proteaz üreticisi tür *A. fumigatus*, amilaz üreticisi türler *A. terreus*, *L. corymbifera* ve *R. pusillus*, lipaz üreticisi tür *A. fumigatus*, selüloz üreticisi tür *A. fumigatus* olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan termofilik ve termotolerant funguslar arasından lipaz, amilaz, selüloz, proteaz ve fitaz gibi endüstriyel öneme sahip olan termotabil enzimleri üretme yeteneğine sahip olanların belirlenmesi bu fungusların ve enzimlerinin ileriki çalışmalarda değerlendirilmesine ışık tutacağı kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: Termofilik, termotolerant, filamentli fungus, enzim, termotabil

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902742600043; Fax.: +902742652285; E-mail: derya.berikten@ksbu.edu.tr

1. Giriş

Termofilik funguslar minimum 20 °C ya da üzeri ve maksimum 61,5 °C büyüme sıcaklığına sahipken, termotolerant formların 20 °C'nin altından yaklaşık 55 °C'ye kadar olan geniş bir büyüme sıcaklık aralığı vardır [1,2]. Termofilik ve termotolerant funguslar biyolojik dönüşüm prosesinde görev alırlar ve enzimlerin de dahil olduğu endüstriyel olarak önemli pek çok metaboliti sentezleme yeteneğine sahiptirler [3].

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizörler olarak tanımlanırlar [4]. Enzim bazlı endüstriyel teknolojiler, minimum atık üretimi ile veya hiç atık üretimi olmadan hammaddelerin verimli kullanılmasını vaat ederken, toksik kimyasalların kullanılmasını da önlemektedir. Endüstrilerdeki geleneksel kimyasal temelli üretim süreçleri çok fazla hammadde, enerji gerektirmekte ve çevre üzerinde oldukça fazla baskı yaratmaktadır. Geleneksel yöntemlerin daha temiz ve daha güvenli enzim bazlı yöntemlerle değiştirilmesi, yalnızca işlem süresi, işletim maliyeti ve enerji tüketiminden tasarruf sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda çevre üzerinde de en az tehlikeli etkiyi oluşturmaktadır [5]. Günümüzde, çeşitli biyolojik üretim süreçlerinin pek çoğu yüksek sıcaklıklarda stabil kalabilen termostabil enzimleri içermektedir [6]. Termostabil enzimlerin biyoproseslerde sağladığı avantajlar; yüksek sıcaklıklara tolerans, geniş pH stabilitesi, yüksek spesifik aktivite, organik çözücüler, deterjanlar, katyonlar gibi çeşitli potansiyel enzim inhibitörlerine dayanma yeteneği, oda koşullarında uzun süre saklanma, düşük kontaminasyon riski, kolay karışma, yüksek substrat çözünürlüğü olarak sayılabilir [5,6].

Fungusların pek çok endüstriyel öneme sahip enzimlerin kaynağı olduğu ve yüksek miktarlarda ekstraselüler (hücre dışı) enzimleri sentezleme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Çok çeşitli endüstri dallarında mikrobiyal proteaz, amilaz, selüloz ve lipazlar kullanılmaktadır [7]. Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen amilaz, selüloz, proteaz ve lipazlar tekstil, kağıt ve deterjan endüstrilerinde yaygın şekilde kullanıldıkları ortaya konulmuştur [8,9]. Son zamanlarda, çamaşır deterjanı ürünlerindeki proteazlar, amilazlar, selülozlar ve lipazların dahil olduğu enzim kokteylleri özel bir ivme kazanmıştır [5].

Termofilik kaynaklardan elde edilen amilazlar, proteaz ve lipaz ile bağlantılı olarak tekstil, bira, deterjan endüstrisinde kullanımının yanı sıra biyoyakıt üretimi, fermantasyon endüstrilerinde nişastanın fermente edilebilir şekerlere dönüştürülmesi, gıda endüstrisinde tatlı şurupların hazırlanması, unun diastaz içeriğinin artırılması, jöle üretiminde nişastanın uzaklaştırılması ve bebekler için yiyeceklerin modifikasyonu gibi çeşitli endüstriyel işlemlerde çok yönlü uygulama potansiyeli bulmaktadır [10]. *Aspergillus* cinsinin çok farklı türleri endüstriyel amilazlar için kaynak teşkil ettiği ve nişasta endüstrisinde kullanılan en yaygın termostabil enzimin amilazlar olduğu vurgulanmıştır [7]. Proteazlar ise toplam enzim pazarının yaklaşık %60'ını oluşturan ve fizyolojik ve endüstriyel alanlarda bir dizi farklı uygulamaya sahip olan en yaygın hidrolitik enzimlerden biridir [8]. Fitik asidin defosforilasyonunu sağlayan fitazlar, özellikle beslenme, çevresel sürdürülebilirlik ve insan sağlığı açısından önem kazanmışlardır. Termostabil fitazlar, yem üretimi, gıda işleme, kağıt yapımı ve bunlar gibi bir çok endüstriyel proseste gereksinim duyulan enzimler haline gelmiştir [11]. Selülozların yenilenebilir enerji kaynakları için büyük potansiyele sahip oldukları bilinmektedir. Selülozlar, proteazlardan sonra dünyanın endüstriyel enzim pazarında ikinci sırada yer almaktadır. Bununla birlikte, termostabil selülozlar, yüksek sıcaklıklardaki aktiviteleri ile deterjan endüstrisinde renk parlatma ve yumuşatmada, biyoetanol üretimi için lignoselülozik biyokütlenin kullanımı ve kağıt endüstrisinde kağıt geri dönüşümüne yardımcı olarak kullanılmaktadırlar [12]. Termostabil lipazlar, gıda, deterjan, kozmetik, kağıt, ilaç, deri, biyodizel üretimi vb. gibi çeşitli endüstrilerin ön koşuludur [13]. Fungal lipazlar süt endüstrisi, yağ imalatı, sürfektanların üretimi ve saf farmasotiklerin hazırlanmasındaki biyoteknolojik uygulamalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir [7].

Yeni ve özgün enzim oluşturmada mikrobiyal taramalarla rasyonel protein mühendisliğinin birlikte kullanılması gerekmektedir. Dünyada çeşitli endüstriyel alanlarda enzimlerin kullanımının gün geçtikçe artması nedeniyle enzimler bilim ve teknolojinin oldukça ilgilendiği bir alan olmuştur. Bu bağlamda iyi enzim üreticisi fungusların belirlenmesini ve enzimlerinin taranarak ortaya konmasını içeren çalışmalar oldukça önem arz etmektedir.

Kullanışlı enzimleri üretme yeteneğine sahip pek çok patojenik olmayan mikroorganizma arasında filamentli funguslar, kolay kültüre edilebilmeleri, endüstriyel öneme sahip ekstraselüler enzimleri yüksek miktarlarda üretebilmeleri nedenleri ile ön plana çıkmaktadırlar. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, endüstriyel enzimlere yönelik biyoteknolojik araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Bu nedenle endüstriyel enzimleri üretme açısından elverişli olan bu fungusların belirlenmesi ve enzimlerinin taranarak ortaya konmasını bilimsel olarak ön plana çıkarmıştır. Yaptığımız çalışmada, çeşitli sıcak su kaynaklarından izole edilmiş olan termotolerant ve termofilik fungusların endüstriyel açıdan oldukça önemli olan termostabil lipaz, amilaz, selüloz, proteaz ve fitaz enzimlerini üretme yeteneklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve yöntem

2.1. Mikroorganizmalar

Çeşitli sıcak su kaynaklarından izolasyonları yapılarak termofilik ve termotolerant oldukları daha önceden belirlenmiş ve laboratuvarımızda stoklanmış halde bulunan 51 straini *A. fumigatus*, 5 straini *A. terreus*, 1 straini *A. flavus*, 2 straini *R. pusillus*, 1 straini *L. corymbifera*, 1 straini *M. albomyces* ve 2 tanesi de *H. insolens* dan oluşan 63 mikrofungus çalışmada kullanılmıştır.

Enzim tarama çalışmalarında kullanılmak üzere mikrofungusların aktifleştirilmesi +4°C'de stoklanmış olan kültürlerinin Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (ME063, Himedia) ve Yeast Potato Soluble Starch Agar'a (YPSSA) (Maya ekstraktı 4g/L, MgSO₄-7H₂O 0,5 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, Çözünebilir nişasta 15 g/L, Agar 20 g/L, Ampisilin 0,2 g/L, Rose bengal 0,06 g/L) [14] ekilerek 37°C'de inkübe edilmeleri ile gerçekleştirilmiştir.

2.2. Enzim üreten türlerin kültürel ortamlarda belirlenmesi

2.2.1. Fitaz üretiminin belirlenmesi

Mikrofunguslar, karbon kaynağı olarak kalsiyum fitat içeren fitaz tarama ortamı (PSM) (D-glikoz 15g/L, Kalsiyum fitat 5g/L, (NH₄)NO₃ 5g/L, MgSO₄-7H₂O 0,5g/L, KCL 0,5 g/L, FeSO₄-7H₂O 0,01 g/L, MnSO₄-4H₂O 0,01g/L, pH 5,5) fitaz üretimi açısından taranmıştır. Bu taramalar yapılırken funguslar PSM ortamına steril koşullarda tek nokta şeklinde ekilmiş ve 45 °C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrasında fitaz enzimi üreten funguslar, kalsiyum fitatı parçalamaları sonucu besiyerindeki beyaz rengin kaybolması ile oluşan kolonileri etrafındaki şeffaf zon ile ayırt edilmişlerdir [15,16].

2.2.2. α-Amilaz üretiminin belirlenmesi

Mikrofunguslar, amilaz tarama ortamına [Çözünebilir mısır nişastası %2, Czapek Dox Agar (105460, Merck) 48.0 g/L] tek nokta şeklinde ekimi yapıp 37 °C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonucunda gelişen fungus kolonisi uzaklaştırılarak, lügol çözeltilisi ile kültür ortamları boyanmıştır. Amilaz enzimine sahip türler besiyerindeki nişastayı parçalamaktadır. Lügol çözeltilisi nişasta ile birleştiğinde mavi-mor bir renk oluşmaktadır. Bu nedenle, boyama sonrası enzim üretimini gerçekleştiren koloniler renksiz diğer yerlerin mavi-mor renkte boyanması ile amilaz üretimi ayırt edilmiştir [17,7].

2.2.3. Lipaz üretiminin belirlenmesi

Lipaz üretiminin belirlenmesi için, tüplerde hazırlanmış olan lipaz tarama ortamı [Maya ekstraktı 3g/L, Pepton 5g/L, Tribütirin %1, Agar 10g/L [18]] üzerinde, YpSSA ortamında geliştirilen 7 günlük küf kolonilerinden 6 mm çapında kesilerek çıkartılmış agar diskleri yerleştirilmiştir. Tüpler 37 °C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir. Lipaz üretimi, geliştirilen fungus kolonilerinin lipaz üretim düzeylerine bağlı olarak besiyerindeki tribütirini parçalaması ile tüp içerisinde oluşturdukları şeffaf zonlar ile ayırt edilmiştir [19].

2.2.4. Proteaz üretiminin belirlenmesi

İzole edilen fungusların proteaz aktiviteleri, proteaz tarama besiyerinde (K₂HPO₄ 0,5g/L, MgSO₄-7H₂O 0,25 g/L, KCL 0,25 g/L, Yağsız süt tozu %15, Agar 1,5 g/L) belirlenmiştir. Tüplerde hazırlanmış olan proteaz tarama ortamı üzerinde, YpSSA ortamında geliştirilen 7 günlük küf kolonilerinden 6 mm çapında kesilerek çıkartılmış agar diskleri yerleştirilerek 37 °C'de bir hafta inkübe edilmiştir. Gelişen funguslardan tüp içerisinde şeffaf zon oluşturanlar proteaz üreticisi olarak belirlenmiştir ve zon çapları proteaz üretimi açısından fungusları karşılaştırmak amacı ile kaydedilmiştir [20].

2.2.5. Selüloz üretiminin belirlenmesi

İzolatlar, karbon kaynağı olarak üst tabaka halinde selüloz-azur içeren selüloz tarama ortamında (Selüloz-azur 0,5g/L, (NH₄)₂SO₄ 0,1g/L, KH₂PO₄ 0,1g/L, MgSO₄-7H₂O 0,02g/L, Agar 1,5 g/L) selüloz üretimi açısından taranmıştır. Bu taramalar yapılırken, YpSSA ortamında geliştirilen 7 günlük küf kolonilerinden 6 mm çapında kesilerek çıkartılmış agar diskleri selüloz-azur içeren tüpler üzerine yerleştirilmiştir. Tüpler 37 °C'de bir hafta inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra selüloz üretme özelliğine sahip türler selülozu parçalayarak ona bağlı olan azur boyasını serbest bırakmaktadır. Fungusların selüloz enzimini üretme yeteneğine bağlı olarak oluşan mavi rengin şiddeti 1'den 10'a kadar derecelendirilerek selüloz üretimi değerlendirilmiştir [21].

3. Bulgular

Çalışmada fitaz, proteaz, amilaz, lipaz ve selüloz aktivitesi açısından 57'si termotolerant, 6'sı termofilik olmak üzere 63 adet kültür ayrı ayrı taranmıştır. Bu taramalar sonucunda, elde edilen sonuçlar değerlendirilerek Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Enzim tarama çalışması sonuçları

Tür	Fitaz *	Proteaz (cm)	Amilaz*	Lipaz (cm)	Selülaz#
<i>Rhizomucor pusillus</i> 1	+++	0,4	+++	1,5	0
<i>Aspergillus terreus</i> 1	++	2	++	1,9	4
<i>Aspergillus terreus</i> 2	+++	2	++	1,8	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 1	+	1,7	-	2,6	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 2	-	2,3	-	1,6	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 3	-	2,1	-	2,6	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> 4	-	2	-	3	4
<i>Aspergillus terreus</i> 3	+++	2,3	+++	2,5	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 5	+	2,3	-	2	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 6	-	2,3	+	1,3	0
<i>Aspergillus fumigatus</i> 7	+	2,3	-	3,2	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 8	++	3	-	1,5	0
<i>Aspergillus fumigatus</i> 9	+	2,2	-	2,1	7
<i>Aspergillus fumigatus</i> 10	-	2,1	-	3,2	5
<i>Aspergillus fumigatus</i> 11	-	2	-	1,3	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 12	+	2	+	3,3	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 13	+	1,9	-	2,7	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 14	-	2	-	1,7	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> 15	-	2,9	-	2,7	5
<i>Aspergillus terreus</i> 4	++	2,2	++	2,2	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> 16	-	2,4	-	1,4	0
<i>Melanocarpus albomyces</i>	-	0,8	++	1,6	0
<i>Humicola insolens</i> 1	-	1	-	2	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> 17	++	1,8	-	2,8	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 18	-	2,4	-	2,5	1
<i>Aspergillus fumigatus</i> 19	-	1,5	-	2,4	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 20	-	2	-	1,7	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 21	-	1,8	-	2	6
<i>Aspergillus fumigatus</i> 22	-	1,7	-	1,8	2
<i>Humicola insolens</i> 2	-	0,8	-	1,8	5
<i>Aspergillus fumigatus</i> 23	-	1,7	-	3,5	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> 24	-	2	-	2,7	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> 25	-	1,2	-	1,8	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> 26	-	2,3	-	2	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 27	-	2,1	-	1,5	7
<i>Aspergillus fumigatus</i> 28	-	1,7	-	2	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 29	-	1,8	-	2,5	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 30	-	2,2	-	2,3	6
<i>Aspergillus fumigatus</i> 31	-	1,7	-	2	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> 32	-	1,9	-	2,5	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 33	-	1,7	-	1,8	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 34	-	1,8	-	2,5	6
<i>Aspergillus fumigatus</i> 35	+	1,8	-	2,7	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 36	-	1,9	-	1	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 37	-	2	-	1,7	5
<i>Aspergillus fumigatus</i> 38	-	2,1	-	1,6	7
<i>Aspergillus fumigatus</i> 39	-	1,8	-	3,8	4
<i>Aspergillus fumigatus</i> 40	-	1,9	-	1,5	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 41	-	2	-	1,5	5
<i>Aspergillus fumigatus</i> 42	-	2	-	1,7	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 43	-	1,9	-	1,7	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 44	-	2,2	-	1,7	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 45	-	2,1	-	2,5	6
<i>Aspergillus fumigatus</i> 46	+	2,2	-	2,4	3
<i>Aspergillus flavus</i>	-	2,5	+	2	0
<i>Aspergillus fumigatus</i> 47	-	2,2	-	1,6	2
<i>Aspergillus terreus</i> 5	++	2,2	++	2	3
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	-	0,2	+++	2	4
<i>Rhizomucor pusillus</i> 2	+++	0,3	+++	1,6	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 48	-	1,7	+	1,8	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 49	-	2,2	+	3	2
<i>Aspergillus fumigatus</i> 50	+	1,9	-	1,5	3
<i>Aspergillus fumigatus</i> 51	-	1,9	-	2,8	7

*[(-): zon yok, (+): şeffâf zon<0,3 cm, (++) : 0,3<şeffâf zon<0,5, (+++): 0,5<şeffâf zon] # [10. günde difüze olan azure renk şiddeti]

Taraması gerçekleştirilen her enzime özel besiyeri ortamlarında yapılan incelemeler sonucunda, kültürlerin %28,5'inin fitaz (Şekil 1), az veya çok seviyede olmak üzere bütün kültürlerin proteaz (Şekil 3), %22'sinin amilaz (Şekil 2), yine az veya çok seviyede olmak üzere bütün kültürlerin lipaz (Şekil 3) ve 6 izolat hariç diğer tüm kültürlerin ise selülaz (Şekil 4) ürettiği belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada ağırlıklı olarak *Aspergillus fumigatus*'tan oluşan 57 termotolerant tür kullanılmış ve bunun sonucunda fitaz testi için 16 (%28) tanesi, amilaz testi için 10 (%17,5) tanesi, selülaz testi için 53 (%93) tanesi ve proteaz ile lipaz testleri içinse tüm örnekler pozitif sonuç vermiştir. Çalışılan 6 termofilik türden fitaz testi için 2 (□ %33) tanesi, amilaz testi için 4 (□ %66) tanesi, selülaz için 4 (□ %66) tanesi ve proteaz ve lipaz testleri içinse tüm örnekler pozitif sonuç vermiştir.



Şekil 1. PSM'de fitaz enzimi tarama sonucu görünüşü



Şekil 3. Proteaz ve lipaz tarama besiyerinde proteaz (sağda) ve lipaz (solda) enzimi tarama sonucu görünüşü



Şekil 2. Amilaz tarama besiyerinde amilaz enzimi tarama sonucu görünüşü



Şekil 4. Selülaz tarama besiyerinde selülaz enzimi tarama sonucu (sağdan sola renk şiddetleri: kontrol, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)

4. Sonuçlar ve tartışma

Funguslar GRAS (Generally Regarded As Safe) yani çoğunlukla güvenli kabul edildiğinden dolayı, enzim üreticisi olarak kullanılmaları oldukça güvenlidir [22]. Ayrıca ürettikleri enzimlerin genellikle ekstraselüler olması ve böylece fermantasyon ortamından daha kolay bir şekilde geri kazanılması göz önünde bulundurulduğunda funguslar enzim üretiminde pek çok avantaja sahiptirler. Endüstriyel uygulamalarda termofiller, termotolerantlar ve bu fungusların ürettiği termostabil enzimler yüksek termostabilite gösterdikleri için oldukça önemlidirler [6].

Farklı mikroorganizmaların lipaz, amilaz, selülaz, proteaz ve fitaz enzimlerinin taramalarının gerçekleştirildiği birçok çalışma mevcuttur ancak hem termofilik hem de termotolerant fungusları içeren sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Çalışmamıza benzer olarak Afyonkarahisar topraklarından izole edilen *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* ve *Penicillium* cinsinden 4 mikrofungusa ait 515 örnek test edilmiştir. Bu izolatlardan %25'inde amilaz, %26'sında proteaz ve %22'sinde lipaz aktiviteleri pozitif olarak bildirilmiştir. Araştırmacılar *Aspergillus* cinsinin %75'inin amilaz aktivitesi için pozitif sonuç verirken hiçbirinin proteaz ve lipaz aktiviteleri için olumlu sonuç vermemiştir [23]. Çalışma sonuçlarımızda *Aspergillus* izolatlarının tamamı az veya çok proteaz ve lipaz için pozitif sonuç verirken amilaz için negatif sonuç vermiştir. Çalışmamızın aksine *Aspergillus* izolatlarının lipaz için negatif sonuç verdiğini

bildirmişlerdir. Bu farklılığın tür farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Araştırmacılar tür düzeyinde tanımlama bildirmemişlerdir.

Zirai topraklardan izole edilen 1558 fungusun amilaz, proteaz ve lipaz aktivitesinin incelendiği bir çalışmada, amilaz için izolatların %41'nin, proteaz için %69'nun ve lipaz için %46'sının pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir. Çalışmada kullanılan *Aspergillus* türlerinin amilaz, proteaz ve lipaz aktivitesine sahip olduğu ortaya konulmuştur [20]. Çalışmamıza benzer şekilde *A. fumigatus* türlerinin amilaz aktivitesine sahip olmadığını bildirmişlerdir. Proteaz aktivitesi açısından baktığımızda ise bulgularımıza benzer sonuçlar bildirilmiştir.

Sanayi atıklarından izole edilen fungusların enzimlerinin taranması üzerine yapılan çalışmada, incelenen genuslar içerisinde *Aspergillus flavus*'un amilaz, lipaz, proteaz ve selüloz enzimlerinin tamamını iyi derecede sentezlediğini bildirmişlerdir [24]. Bizim çalışmamızda ise bu çalışmanın aksine izole ettiğimiz *A. flavus* türü selüloz üretmemekte ve amilaz enzimini ise minimum düzeyde üretmektedir. Bu farklılık izolasyon ortamlarının değişik olmasından dolayı ortaya çıkan suş farklılığından kaynaklanabilmektedir. Yine aynı çalışmada *Aspergillus* genusu üyelerinin amilaz yeteneğine sahip olduğu bulunmuşken bizim çalışmamızda tam tersi bir sonuç elde edilmiştir.

Çeşitli kaynaklardan izole edilen termotolerant ve mezofilik fungusların endüstriyel olarak önemli enzimlerinin taranması üzerine yapılmış olan bir çalışmada, başta *Aspergillus caespitosus* ve *A. niger* olmak üzere *Aspergillus* genusu üyelerinin fitaz üretimi açısından olumlu sonuçlar verdikleri ortaya koymuştur [25]. Bizim çalışmamızda ise *Aspergillus* türlerinden *Aspergillus terreus* 2 ve *A. terreus* 3'ün fitaz enzimi taramalarında belirgin bir üretim sergilediği saptanmıştır. Bu durum bir genus içerisindeki türlerin enzim üretimi açısından farklı profiller sergilediklerini doğrulamaktadır. Yine aynı çalışmada *Rhizomucor* cinsinin farklı türleri fitaz üretimi açısından başarılı sonuçlar vermiştir. *Rhizomucor pusillus* 1 ve *R. pusillus* 2'nin çalışmamızda en yüksek fitaz aktivitesi gösteren türlerden olması Guimaraes ve ark. [25] çalışmasını destekler niteliktedir. *Myceliophthora thermophila* [26], *Sporotrichum thermophile* [27], *Thermomyces lanuginosus* [28] and *Thermoascus aurantiacus* [29] gibi çeşitli termofilik funguslarla yapılmış olan çalışmalarda fitaz enzimi varlığı gösterilmiştir ancak *R. pusillus* için sınırlı sayıda veri bulunmasından dolayı çalışmamız ileriki çalışmalara yol gösterici niteliktedir.

Bazı termofilik fungusların amilaz aktivitelerinin tarandığı çalışmada *R. pusillus* amilaz üreticisi olarak belirlenmiştir ve enzim üretiminin 6. gününde maksimum seviyede üretim yaptığı, enzim üretiminin inkübasyon süresi ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur [30]. Gerçekleştirdiğimiz amilaz tarama çalışmasında da zon çapına göre en yüksek aktivite gösteren türler arasında *R. pusillus* 1 ve *R. pusillus* 2 yer almaktadır. 51 pirinç tanesi örneğinden izole edilen *A. terreus* ve *Lichtheimia corymbifera*'nın da aralarında bulunduğu 62 fungal izolat amilaz aktivitesi açısından taranmıştır. Çalışma sonucunda *A. terreus*'un çok ve *Lichtheimia corymbifera*'nın ise sınırlı miktarda amilaz üretimine sahip olduğu belirlenmiştir [31]. Bizim çalışmamızda ise hem *A. terreus*'un hem de *Lichtheimia corymbifera*'nın amilaz üretiminin diğer izolatlara göre yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda yapılan selüloz taramaları sonucunda en yüksek aktivite gösteren türler *A. fumigatus* 9, *A. fumigatus* 27, *A. fumigatus* 38 ve *A. fumigatus* 51 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar ile uyumlu olarak termofilik fungusların lignin selüloz enzimlerinin tarandığı bir çalışmada en yüksek selüloz aktivitesi gösteren türlerden bir tanesi *A. fumigatus* olmuştur [32]. Yine başka bir çalışmada da selüloz enzim aktivitesi yönünden en etkin türlerin *Aspergillus* genusunda olduğu belirlenmiştir [33].

Çeşitli yağlı tohumlardan *Aspergillus sp.* türleri izole edildikten sonra lipaz aktivitelerinin araştırılması sonucunda enzim aktivitesi açısından en etkili türlerden bir tanesi *A. fumigatus* olarak bulunmuştur [34]. Bu çalışma ile paralellik gösterecek şekilde bulgularımızda en yüksek lipaz aktivitesi gösteren tür *A. fumigatus* 39 olarak belirlenmiştir.

Funguslar pek çok açıdan öneme sahip organizmalardır. Gıda sektörü, ilaç yapımı, değerli enzimlerin ve organik maddelerin üretimi gibi birçok alanda kullanılmaktadırlar. Dünyada çeşitli endüstriyel alanlarda enzimlerin kullanımının gün geçtikçe artması nedeniyle enzimler bilim ve teknolojinin oldukça ilgilendiği bir alan olmuştur. Endüstriyel süreçlerde uygulanan yüksek sıcaklıklarda aktivitesini koruyan termotabil enzimlerin elde edilebildiği funguslar da dolayısıyla büyük önem taşımaktadır. Ayrıca termotabilite özelliğinin yanında termofilik ve termotolerant fungusların ürettikleri enzimler geniş pH aralığı, yüksek spesifik aktivite gibi özelliklerinden dolayı da ön plana çıkmaktadır. Bu fungusların belirlenmesini ve enzimlerinin taranarak ortaya konmasını içeren çalışmalar oldukça önem arz etmektedir. Bu çalışma sonucunda, 57'si termotolerant, 6'sı termofilik olmak üzere 63 adet fungusun fitaz, proteaz, amilaz, lipaz ve selüloz enzim üretme yetenekleri ortaya konmuştur. Termofilik ve termotolerant fungusların lipaz, amilaz, selüloz, proteaz ve fitaz enzimlerini üretme yeteneğine sahip olanlarının belirlenmesi, bu fungusların ve enzimlerinin ileriki çalışmalarda değerlendirilmesi açısından referans bilgi niteliği taşımaktadır. Bu anlamda çalışmamız kullanılan funguslar açısından enzim profillerinin çıkarılmasını sağladığı için önem taşımaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından "1101F022" numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

Kaynaklar

- [1] Rajasekaran, A.K. & Maheshwari, R. (1993). Thermophilic fungi: an assesment of their potential for growth in Soil. *J. Biosci.* 18, 345-354.
- [2] Maheshwari, R., Bharadwaj, G. & Bhat, M.K. (2000). Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (3), 461-488.
- [3] Mouchacca, J. (2007). Heat tolerant fungi and applied research: Addition to the previously treated group of strictly thermotolerant species. *World J Microbiol Biotechnol*, 23, 1755-1770.
- [4] Wiseman, A. (1985), *Handbook of Enzymes Biotechnology* (2nd ed.) Ellis Horwood and John Wiley & Sons
- [5] Sharma, S., Vaid, S., Bhat, B., Singh, S., & Bajaj, B.K. (2019). Thermostable enzymes for industrial biotechnology. *Advances in Enzyme Technology, Biomass, Biofuels, Biochemicals*, 469-495. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00017-0>
- [6] Turner, P., Mamo, G. & Karlsson, E.N. (2007). Potential and Utilization of Thermophiles and Thermostable enzymes in Biorefining. *Microbial Cell Factories*, 6(9), 1-23.
- [7] Prabakaran, M., Thennarasu, V., Mangala, R.A., Bharathidasan, R., Chandrakala, N., & Mohan, N. (2009). Comparative studies on the enzyme activities of wild and mutant fungal strains isolated from sugarcane field. *Indian Journal of Science and Technology*, 2(11), 46-49.
- [8] Bajaj, B.K., & Sharma, P. (2011). An alkali-thermotolerant extracellular protease from a newly isolated *Streptomyces* sp. DP2, *New Biotechnol.* 28, 725-732.
- [9] Ortakaya, V., & Ağuloğlu Fincan, S. (2019). Amylase production of *Bacillus subtilis* isolated from soil by SmF method. *Biological Diversity and Conservation*, 12(3), 57-64. <https://doi.org/10.5505/biodicon.2019.70288>
- [10] Saini, R., Saini, H.S., & Dahiya, A. (2017). Amylases: characteristics and industrial applications. *J. Pharmacogn. Phytother*, 6, 1865-1871.
- [11] Corrêa, T.L.R., & Araújo, E.F. (2020). Fungal phytases: from genes to applications. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 1009-1020. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00289-y>
- [12] Sharma, M., & Bajaj, B.K. (2014). Cellulase production from *Bacillus subtilis* MS 54 and its potential for saccharification of biphasic-acid-pretreated rice straw. *J. Biobased Mater. Bioenergy*, 8, 449-456.
- [13] Bakir, Z.B., & Metin, K. (2016). Purification and characterization of an alkali-thermostable lipase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* HBB 134. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 1087-1097.
- [14] Choi, Y., Hyde, K.D., & Ho, W.W.H. (1999). Single spor isolation of fungi. *Fungal Diversity*, 3, 29-38.
- [15] Gulati, H.K., Chadha, B.S., & Saini, H.S. (2007). Production, purification and characterization of thermostable phytase from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* TL-7. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 54 (2), 121-138.
- [16] Chen, J.C. (1998). Novel screening method for extracellular phytase-producing microorganisms. *Biotechnology Techniques*, 12, 759-761.
- [17] Balkan, B. (2008). *Katı substrat fermentasyonu ile ham nişastayı parçalayan yeni bir fungal amilaz üretimi saflaştırılması ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi*, Doktora tezi, Danışman Yrd.Doç.Dr. Figen Ertan, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji AB.D.
- [18] Rapp, P., & Backhaus, S. (1992). Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeast and bacteria. *Enzyme Microb Technol*, 14, 938-943.
- [19] Colen G. Junqueira R.G. & Moraes-Santos T. (2006). Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. *World J Microbiol Biotechnol*, 22, 881-885.
- [20] Topal, Ş., Pembeci, C., Borcaklı, M., Batum, M., & Çeltik, Ö. (2000). Türkiye'nin tarımsal mikoflorasının endüstriyel öneme sahip bazı enzimatik aktivitelerinin incelenmesi-1: amilaz, proteaz, lipaz, *Turk J Biol.*, 24, 79–93.
- [21] Tan, T.K., Yeoh, H.H., Tan, M.L., & Koh, S.K. (1987). Cellulolytic activities of some filamentous fungi. *Journal of The Singapore National Academy of Science*, 16, 11-16.
- [22] Mitra P., Chakraverty, R., & Chandra, A. (1996). Productions of proteolytic enzymes by solid state fermentation. *J Sci Ind Res*, 55, 439-42.
- [23] Korcan E., Özkara A., Akyıl D., Çiğerci, İ.H., & Konuk M. (2007). Farklı fungus cinslerinde endüstriyel öneme sahip bazı enzim aktivitelerinin incelenmesi. *AKÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 7(1), 279-286.
- [24] Tan T.K., & Leong W.F. (1986). Screening for extracellular enzymes of fungi from manufacturing wastes. *Mircen journal of applied microbiology and biotechnology*, 2, 445-452.
- [25] Guimaraes, L.H.S., Peixoto-Nogueira, S.C., Michelin, M., Rizzatti, A.C.S., Sandrim, V.C., Zanoelo, F.F., Aquino, A.C.M.M., Junior, A.B., & Polizeli, M.L.T.M. (2006). Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 474-480.
- [26] Mitchell D.B., Vogel K., Weimann B.J., Pasamontes L., & van Loon A.P.G.M. (1997). The phytase subfamily of histidine acid phosphatase; isolation of genes for two novel phytases from the *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology*, 143, 245-252.

- [27] Singh, B., & Satyanarayana, T. (2012). Production of phytate-hydrolyzing enzymes by thermophilic moulds. *African Journal of Biotechnology*, 11(59), 12314-12324.
- [28] Berikten, D., & Kivanc, M. (2014). Optimization of solid state fermentation for phytase production by *Thermomyces lanuginosus* using response surface methodology. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 44, 834–848, <https://doi.org/10.1080/10826068.2013.868357>
- [29] Nampoothiri K.M., Tomes G.J., Roopesh K., Szakacs G., Nagy V., Soccol C.R., & Pandey A. (2004). Thermostable phytase production by *Thermoascus aurantiacus* in submerged fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, 118(1-3), 205-214.
- [30] Olagoke O.A. (2014). Amylase activities of some thermophilic fungi isolated from municipal solid wastes and palm-kernel stack. *American Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1(2), 64-70.
- [31] Idres, M.M.M., Moharram, A.M., Ahmed, M.S., Omar O., Marzouk M.E., & Yasser, M.M. (2021). α -Amylase, L-asparaginase and arginase enzymes production by fungi isolated from rice stored under environmental condition in middle egypt. *International Journal on Emerging Technologie*, 12(1), 48-58.
- [32] Saroj, P., Manasa P., & Narasimhulu, K. (2018) Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid-state fermentation. *Bioresour Bioprocess*, 5, 31. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0216-6>
- [33] Khokhar I., Haider M.S., Mushtaq S., & Mukhtar I. (2012). Isolation and screening of highly cellulolytic filamentous fungi. *J Appl Sci Environ Manag*, 16, 223-226.
- [34] Hamada, T.A., Abdulkreem, R.S., & Younus, H.M. (2020). Efficiency of *Aspergillus* Species to Produce the Lipase Enzyme from Various Types of Oil Seeds. *Medico-legal Update*, 20(1), 809-813.