

## Yerli Alfa-Amilaz Enzimi Üretimi İçin Yerli Fungus İzolasyonu, Makroskopik, Mikroskopik Tanımlaması, DNA Dizi Analizi ve Biyoinformatik Değerlendirmeler

Arzu ÜNAL<sup>1\*</sup>

Semra MALKOÇ<sup>2</sup>

İjlal OCAK<sup>3</sup>

Safiye Elif KORCAN<sup>4</sup>

**ÖZET:** Bu çalışmada ekmek yapımında ticari önemi olan alfa-amilaz enzimi üreten termofilik ve mezofilik yerli fungusların izolasyonu, makroskopik, mikroskopik ve moleküler tür teşhisleri gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizma Kültür Koleksiyon Merkezlerine ve Mikrobiyal Gen Bankalarına genetik materyal oluşturulması ve yerli izolatlardan patente konu yerli enzim üretimi amaçlanmıştır. Afyon, Eskişehir, Uşak, Ankara termal alanlardan 23 termotolerant fungus izole edilmiştir. İzolatların makroskopik ve mikroskopik incelemeleri sonucunda yüksek amilaz enzimi üreten *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* ve *Trichoderma atroviride* türüne ait 6 izolatın tür teşhisi yapılmıştır. İzolatların fungus spesifik primerleri kullanılarak 18S rDNA ve ITS bölgeleri PCR amplifikasyonu, moleküler tanımlaması yapılmış ve Web tabanlı BLAST analizleri ile karşılaştırılmıştır. Moleküler karakterizasyon çalışması sonucunda klasik tanımlama ile moleküler tanımlamanın birbirini desteklediği görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Fungus, izolasyon, Internal Transcribed Spacer (ITS), amilaz enzimi.

### Isolation, Macroscopic, Microscopic Identification, DNA Sequencing and Bioinformatic Assessments of Native Fungi for the Production of Native Alpha-Amylase Enzyme

**ABSTRACT:** In this study, isolation of thermophilic and mesophilic native fungi producing alpha-amylase enzyme which is commercially important in bread making, macroscopic, microscopic and molecular identification were performed. Microorganism Culture Collection Centers and Microbial GenBanks to create genetic material and local isolates to produce patents of the native enzyme was aimed. 23 thermotolerant fungi were isolated from the thermal areas of Afyon, Eskişehir, Uşak and Ankara. As a result of macroscopic and microscopic investigations of isolates, 6 isolates of *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Trichoderma atroviride* species which produce high amylase enzyme species were determined. 18S rDNA and ITS regions of the isolates were compared with Web-based BLAST analysis by PCR amplification and molecular identification. As a result of molecular characterization study, it was observed that the classical identification and the molecular identification supported each other.

**Keywords:** Fungi, isolation, Internal Transcribed Spacer (ITS), amylase enzyme.

<sup>1</sup> Arzu ÜNAL (Orcid ID:0000-0003-4427-3169), Iğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Iğdır, Türkiye.

<sup>2</sup> Semra MALKOÇ (Orcid ID: 0000-0002-8092-411X), Eskişehir Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Eskişehir, Türkiye

<sup>3</sup> İjlal OCAK (Orcid ID: 0000-0001-6976-5747), Afyon Kocatepe Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Fen Bilgisi Eğitimi Anabilim Dalı, Afyon, Türkiye

<sup>4</sup> Elif KORCAN (Orcid ID: 0000-0001-7875-5516), Uşak Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, Uşak, Türkiye

\*Sorumlu Yazar: Arzu ÜNAL, e-mail: arzuunal@gmail.com

## GİRİŞ

Endüstriyel açıdan önemi bulunan pek çok proses, biyoteknolojik ve enzimatik süreçlerle çok daha kolay gerçekleşmektedir (Ünal, 2015). Bu nedenle enzimlerin endüstride kullanımı kaçınılmaz olmuştur. Enzimlerin endüstride kullanılması ile yüksek basınç ve sıcaklık gibi enerji gerektiren koşulların ortadan kalkması ekonomik açıdan yarar sağlamaktadır (Çetin, 1983). Dünya genelinde endüstriyel enzim pazarı 1,4 milyar USD dolayında olup, yılda %10'un üzerinde pazar ağı artışı ve %4-5 oranında satış artışı ile en yaygın tüketim alanlarından. Endüstriyel enzim üretiminin %75'i gıda endüstrisi içinde yer almaktadır (Cowan, 1996). Günümüzde gıda sanayinde mikrobiyolojik kaynaklı birçok enzim kullanılmaktadır. Amilazların en yaygın kullanıldığı gıda endüstrisi alanı ekmekçilik sektörüdür.

Ekmek üretiminde fermantasyon sürecinde önemi olan termofilik ve mezofilik funguslardan elde edilen alfa-amilaz enzimi ve ekmek pişirme sıcaklığına dayanıklı termostabil alfa-amilaz enzimi kullanılması önerilmektedir (Nguyen, 2002).

Alfa-amilaz enzimi endüstriyel boyutlarda ilk kez 1939 yılında *Bacillus subtilis* suşu kullanılarak Japonya'da üretilmiştir. 1970 yılında *B. subtilis* ve *B. licheniformis* alfa-amilaz enzimi üretimi için geniş çapta kullanılmıştır (Sahnouna, 2012). Amilazlar dünya enzim

pazarının yaklaşık %25-33'ünü temsil eden önemli ticari enzimlerdendir (Nguyen, 2002).

Alfa-amilaz ekmeğin raf ömrünün uzaması, lezzetinin artması, gözenekli yapısının daha iyi olmasını sağlama gibi birçok açıdan ekmek kalitesini arttırmaktadır. Günümüzde hem biyoteknolojik potansiyelleri hem de termostabilite çalışmalarında kullanılmak üzere iyi bir model olmaları nedeniyle termal su kaynaklarının bulunduğu alanlardan alınan su ve toprak örneklerinden alfa-amilaz üreten termofilik fungusların izolasyonu, mezofil, termofil ve hipertermofil mikroorganizmalarda amilolitik mikrobiyal enzimlerin aktivitelerinin belirlenmesine verilen önem giderek artmaktadır (Leveque ve ark., 2000).

Bu çalışmada, ekmek yapımında önemi olan alfa-amilaz enziminin üretiminde yüksek aktivite gösteren fungus izolatlarının ekstrem koşullardan izole edilmesi, makroskobik, mikroskobik tanımlanmalarının yapılarak biyoteknolojik süreçlerle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Afyon, Eskişehir, Uşak ve Ankara illeri çevresinde bulunan sıcaklıkları 55-90°C arasında değişen termal su kaynaklarının bulunduğu alanlardan alınan su ve toprak örneklerinden amilaz üreten termofilik ve mezofilik karakterdeki fungusların izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Çizelge 1).

**Çizelge 1.** Fungus izolasyonu için örnekleme alanları

AFYON	ESKİŞEHİR	UŞAK	ANKARA
Gazlıgöl Kaplıcası (İhsaniye)	Uyuzhamam Kaplıcası (Alpu)	Uşak-Afyon Karayolu	Haymana
Hüdaî Kaplıcası (Sandıklı)	Yarıkcı Kaplıcası (Mihalıççık)		
Heybeli (Bolvadin)	Kızılınler Kaplıcası (Merkez)		
Ömer-Gecek Kaplıcası (Merkez)	Sakarılıca Kaplıcası (Mihalgazi)		
	Çifteler Kaplıcası (Çifteler)		
	Aşağı ve Yukarı Ilıca (Merkez)		
	Hasırca Kaplıcası (Merkez)		
	Eskişehir Kaplıcası (Merkez)		

### Termotolerant Fungus İzolasyonu

Fungal türlerin izolasyonu Pitt (1979)'in önerdiği metoda göre yapılmıştır.

Ön zenginleştirme için dilüye edilmiş toprak örnekleri ile su örnekleri 40-45 °C su banyosunda 3 saat bekletilmiştir. Toprak örneklerinin 10-3, 10-4, 10-5 ve 10-6 dilüsyonlarından 1'er ml petri kaplarına koyulduktan sonra üzerlerine hazırlanan Starch Yeast Extract Agar (SYE) (starch, 5,0 g; yeast extract, 2,0 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5 g ve agar 15 g) ilave edildi. 40 °C de 1 hafta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşan küfler sayılmıştır.

### Amilaz Enziminin Saptanması

İyot bir amilaz indikatörü olup ortamdaki amilaz enziminin varlığı; koloniler etrafında oluşan zonlar şeklinde kendini gösterir.

Bu nedenle inkübasyon sonrası iyodin solüsyonu (iyodür: 22 mg, potasyum iyodür: 80 mg, glasiyal asetik asit: 5 ml, distile su: 500 ml) damlatıldığında açık zon oluşturan koloniler amilaz (+) olarak değerlendirilmiştir.

### İzolatların Makroskobik ve Mikroskobik Tür Tayini

İzolatlar Malt Extract Agar (MEA) Czapek's Yeast Extract Agar (CYA) ve Oatmeal

Agar (OMA) da 7 gün karanlıkta inkübe edildikten sonra koloni çapları ölçülerek makroskobik ve mikroskobik incelemeleri yapılmıştır. X10 ve X40 ışık mikroskobunda termotolerant fungal izolatların konidial baş, spor, fiyalid yapıları incelenmiştir.

Kültürler tür seviyesinde farklı mikolojik taksonomik anahtarlar kullanılarak tanımlanmıştır (Hasenekoğlu, 1991; Barnett ve Hunter, 1998).

### İzolatların Moleküler Karakterizasyonu

Fungus spesifik primerleri kullanılarak izolatların 18S rDNA ve ITS bölgeleri (Internal transcribed Spacer) PCR amplifikasyonu ve moleküler tanımlaması yapılarak web tabanlı BLAST analizleri ile karşılaştırılmıştır (White et al 1990; Verweij et al 1995).

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### Fungus İzolasyonu Bulguları

Çalışmamızda Afyon, Eskişehir, Uşak ve Ankara termal alanlarından 23 termotolerant fungus izole edilmiştir. *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* ve *Trichoderma atroviride* türüne ait 6 izolatın tür teşhisi gerçekleştirilmiştir. Amilaz (+) özellik gösteren 6 fungus izolatı tespit edilmiş ve raporlaması yapılmıştır (Çizelge 2).

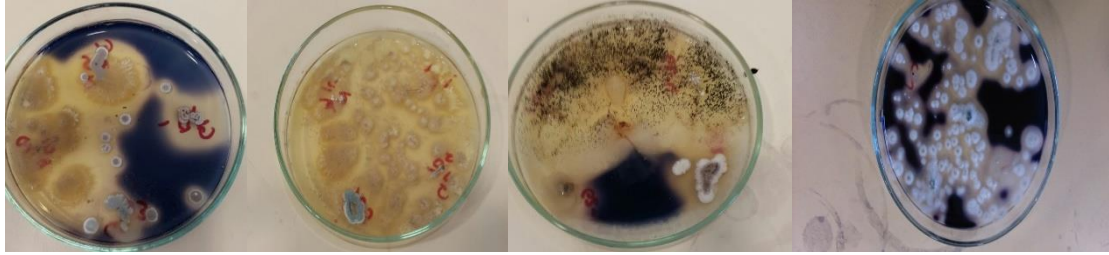
**Çizelge 2.** Amilaz Enzimi aktivitesi gösteren fungus izolatları

İzolat No	Dilüsyon	Tür	İnkübasyon Sıcaklığı
G2-3	10 <sup>-3</sup>	<i>Aspergillus niger</i>	40°C
G2-1	10 <sup>-4</sup>	<i>Aspergillus terreus</i>	40°C
G1	10 <sup>-4</sup>	<i>Aspergillus terreus</i>	40°C
G2-1	10 <sup>-3</sup>	<i>Aspergillus niger</i>	40°C
S-2	10 <sup>-3</sup>	<i>Trichoderma atroviride</i>	40°C
S-2	10 <sup>-4</sup>	<i>Aspergillus terreus</i>	40°C

### Amilaz Enzimi Bulguları

Ortamlardaki amilaz enziminin varlığı iyot indikatörü ile gözlemlenmiştir. İyot indikatörü ile koloniler etrafında şeffaf zonlar oluşmuştur. Şeffaf zon oluşan koloniler amilaz (+) olarak

değerlendirilmiştir. Amilaz (+) özellik gösteren yerli izolatlarımız makroskobik ve mikroskobik tür teşhisleri yapılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Amilaz (+) koloni görüntüleri

### İzolatların Makroskobik ve Mikroskobik Tür Teşhisi Bulguları

Tür seviyesinde farklı mikolojik taksonomik anahtarlar kullanılarak tür teşhisleri yapılan fungus izolatları tanımlanarak X10 ve X40 ışık mikroskopunda incelenmiştir. Konidial baş, spor, fiyalid yapılarının yoğunlukta olduğu görüntüler fotoğraflanarak rapor edilmiştir. (Şekil 2,3,4,5,6,7).

Termal alanlardaki su ve toprak örneklerinden elde edilen yerli fungus izolatlarımızın makroskobik ve mikroskobik

tanımlamaları yapıldıktan sonra patent için gerekli olan moleküler düzeydeki tanımlamaları gerçekleştirilmiştir.

### İzolatların Moleküler Karakterizasyon Bulguları

Fungus spesifik primerleri kullanılarak izolatların 18S rDNA ve ITS bölgeleri (Internal transcribed Spacer) PCR amplifikasyonu yapılmıştır (Şekil 8). Moleküler tanımlama çalışmalarının makroskobik ve mikroskobik tanımlamaları desteklediği görülmüştür.

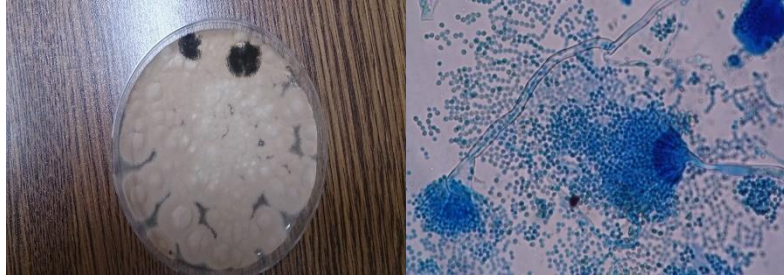
Şekil 2. G2-3 10<sup>-3</sup> *Aspergillus niger* yerli izolatımızın makroskobik koloni ve mikroskobik konidial başlar ve sporlarının görünümüŞekil 3. G2-1 10<sup>-4</sup> *Aspergillus terreus* yerli izolatımızın makroskobik koloni ve mikroskobik konidial başlar ve sporlarının görünümüŞekil 4. 1 10<sup>-4</sup> *Aspergillus terreus* yerli izolatımızın makroskobik koloni ve mikroskobik konidial başlarının görünümü



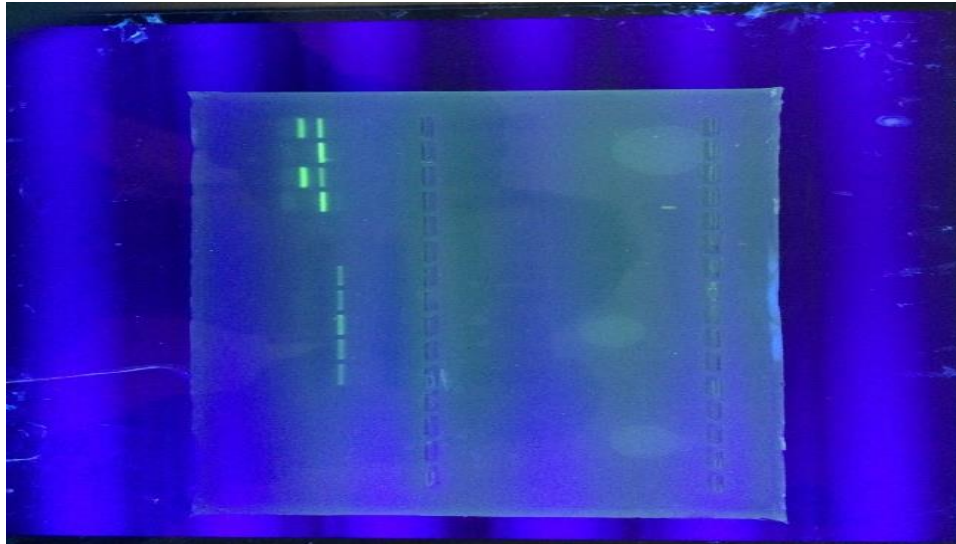
Şekil 5. G2-3  $10^{-3}$  *Aspergillus niger* yerli izolatımızın makroskobik koloni ve mikroskobik konidial başlarının görünümü



Şekil 6. S2  $10^{-3}$  *Trichoderma atroviride* yerli izolatımızın makroskobik koloni ve mikroskobik görünümü.



Şekil 7. S-2  $10^{-4}$  *Aspergillus terreus* yerli izolatımızın makroskobik koloni mikroskobik konidial başlar ve sporlarının görünümü.



Şekil 8. Moleküler karakterizasyon çalışmalarında PCR sonrası DNA jel görüntüleri.

Moleküler tanımlama amacıyla yapılan çalışmalar BLAST analizleri ile karşılaştırılmıştır. Biyoinformatik değerlendirmeler yapılmıştır (Şekil 9).

## Yerli Alfa-Amilaz Enzimi Üretimi İçin Yerli Fungus İzolasyonu, Makroskobik, Mikroskobik Tanımlaması, DNA Dizi Analizi ve Biyoinformatik Değerlendirmeler

Bit-Score	E Value	Grade	Hit start	Hit end	Name	Description	Sequence Le...	Topology
784.1	0	99.8%	103	532	KU319439	Aspergillus terreus strain K15F-Pb-15 internal transcribe...	431	linear
784.1	0	99.8%	211	640	KP987087	Aspergillus hortai strain CBS 124230 18S ribosomal RNA...	431	linear
784.1	0	99.8%	90	519	KP296144	Aspergillus terreus isolate 014 internal transcribed space...	431	linear
784.1	0	99.8%	115	544	KP131620	Aspergillus terreus strain PWQ2409 isolate ISHAM-ITS_ID...	431	linear
784.1	0	99.8%	234	663	KM491895	Aspergillus terreus 18S ribosomal RNA gene, partial sequ...	431	linear
784.1	0	99.8%	89	518	JN638785	Aspergillus terreus strain IDR1100004782 internal transc...	431	linear
784.1	0	99.8%	89	518	FR837962	Aspergillus hortai 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRN...	431	linear
784.1	0	99.8%	94	523	EF567983	Aspergillus terreus strain WM 06.853 isolate ISHAM-ITS_I...	431	linear
784.1	0	99.8%	93	522	AJ001368	Aspergillus terreus 5.8 S rDNA and ITS1 and ITS2 spacers	431	linear
778.56	0	99.7%	92	521	LN813023	Aspergillus terreus genomic DNA sequence contains 18S...	431	linear
778.56	0	99.7%	118	547	KY425727	Aspergillus terreus strain E17F small subunit ribosomal R...	431	linear
778.56	0	99.7%	111	540	KY200574	Aspergillus terreus isolate G1 internal transcribed spacer...	431	linear
778.56	0	99.7%	62	491	KX694148	Aspergillus terreus internal transcribed spacer 1, partial...	431	linear
778.56	0	99.7%	130	559	KX462902	Uncultured fungus clone Asc2-18 18S ribosomal RNA gen...	431	linear
778.56	0	99.7%	128	557	KX462892	Uncultured fungus clone Asc21 18S ribosomal RNA gene...	431	linear
778.56	0	99.7%	86	515	KX198128	Aspergillus terreus internal transcribed spacer 1, partial...	431	linear
778.56	0	99.7%	56	485	KX160451	Aspergillus sp. BAB-5682 18S ribosomal RNA gene, parti...	431	linear
778.56	0	99.7%	94	523	KX090420	Aspergillus terreus internal transcribed spacer 1, partial...	431	linear
778.56	0	99.7%	57	486	KX014873	Aspergillus terreus strain CT713 internal transcribed spa...	431	linear
778.56	0	99.7%	95	524	KU945875	Aspergillus terreus strain SQU-WT03 internal transcribed...	431	linear
778.56	0	99.7%	25	454	KU945829	Aspergillus terreus strain SQU-KH02 internal transcribed...	431	linear

Şekil 9. DNA dizi analizi biyoinformatik değerlendirmeler

Bit-Score	E Value	Grade	Hit start	Hit end	Name	Description	Sequence Le...	Topology
811.799	0	97.3%	48	570	KY031976	Aspergillus niger strain F10A internal transcribed spacer...	523	linear
806.26	0	97.2%	28	550	KC496025	Aspergillus niger strain Y9 18S ribosomal RNA gene, parti...	523	linear
806.26	0	97.2%	27	549	JX135725	Uncultured fungus clone L049675A10 internal transcribe...	523	linear
802.566	0	97.2%	11	533	KX171032	Aspergillus niger strain CA2 internal transcribed spacer 1...	523	linear
800.72	0	97.1%	18	541	KT291440	Aspergillus tubingensis isolate AGR11 internal transcribe...	524	linear
800.72	0	97.1%	56	578	NR_137513	Aspergillus welwitschiae CBS 139.54 ITS region; from TYP...	523	linear
800.72	0	97.1%	28	550	LN833546	Aspergillus niger genomic DNA sequence contains ITS1, 5...	523	linear
800.72	0	97.1%	20	542	LC172268	Aspergillus niger gene for 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, pa...	523	linear
800.72	0	97.1%	57	579	LC105682	Aspergillus niger genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial...	523	linear
800.72	0	97.1%	57	579	LC105676	Aspergillus niger genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial...	523	linear
800.72	0	97.1%	47	569	KX664417	Aspergillus niger isolate F48-02 internal transcribed spac...	523	linear
800.72	0	97.1%	51	573	KX664345	Aspergillus niger isolate F21-04 internal transcribed spac...	523	linear
800.72	0	97.1%	5	527	KX247114	Aspergillus sp. strain GFM2 internal transcribed spacer 1...	523	linear
800.72	0	97.1%	30	552	KX098122	Fungal sp. strain Xmf163 internal transcribed spacer 1, p...	523	linear
800.72	0	97.1%	40	562	KX055889	Aspergillus niger strain DVRSGPD-2 18S ribosomal RNA g...	523	linear
800.72	0	97.1%	45	567	KX011017	Aspergillus niger isolate LF13 internal transcribed spacer...	523	linear
800.72	0	97.1%	17	539	KU977335	Fungal sp. SNB-LAP1-7-61 internal transcribed spacer 1...	523	linear
800.72	0	97.1%	8	530	KU977326	Fungal sp. SNB-LAP1-7-82 internal transcribed spacer 1...	523	linear

Bit-Score	E Value	Grade	Hit start	Hit end	Name	Description	Sequence Le...	Topology
926.292	0	99.9%	21	524	JN638785	Aspergillus terreus strain IDR1100004782 internal transc...	505	linear
920.752	0	99.8%	35	537	KU319439	Aspergillus terreus strain K15F-Pb-15 internal transcribe...	505	linear
920.752	0	99.8%	143	645	KP987087	Aspergillus hortai strain CBS 124230 18S ribosomal RNA...	505	linear
920.752	0	99.8%	26	529	KP175279	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM3934 internal transcri...	505	linear
920.752	0	99.8%	31	534	KP175278	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM3921 internal transcri...	505	linear
920.752	0	99.8%	32	535	KP175275	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM2137 internal transcri...	505	linear
920.752	0	99.8%	29	532	KP175274	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM2025 internal transcri...	505	linear
920.752	0	99.8%	29	532	KP175264	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM676 internal transcribe...	505	linear
920.752	0	99.8%	34	537	KP175263	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM673 internal transcribe...	505	linear
920.752	0	99.8%	35	538	KP175262	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM541 internal transcribe...	505	linear
920.752	0	99.8%	47	549	KP131620	Aspergillus terreus strain PWQ2409 isolate ISHAM-ITS_ID...	505	linear
920.752	0	99.8%	40	543	KM874780	Aspergillus terreus isolate ML3-1 18S ribosomal RNA gen...	505	linear
920.752	0	99.8%	166	668	KM491895	Aspergillus terreus 18S ribosomal RNA gene, partial sequ...	505	linear
920.752	0	99.8%	23	526	Q988829	Aspergillus sp. SHW15 internal transcribed spacer 1, part...	505	linear
920.752	0	99.8%	21	523	FR837962	Aspergillus hortai 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRN...	505	linear
920.752	0	99.8%	26	528	EF567983	Aspergillus terreus strain WM 06.853 isolate ISHAM-ITS_I...	505	linear
920.752	0	99.8%	25	527	AJ001368	Aspergillus terreus 5.8 S rDNA and ITS1 and ITS2 spacers	505	linear
917.059	0	99.7%	72	576	HQ608043	Aspergillus terreus isolate CY229 18S ribosomal RNA gen...	506	linear
915.212	0	99.7%	50	552	LC057406	Aspergillus terreus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA...	505	linear
915.212	0	99.7%	50	552	KY425727	Aspergillus terreus strain E17F small subunit ribosomal R...	505	linear
915.212	0	99.7%	43	545	KY200574	Aspergillus terreus isolate G1 internal transcribed spacer...	505	linear
915.212	0	99.7%	60	562	KX462892	Uncultured fungus clone Asc21 18S ribosomal RNA gene...	505	linear
915.212	0	99.7%	51	553	KX160451	Aspergillus sp. BAB-5682 18S ribosomal RNA gene, parti...	505	linear
915.212	0	99.7%	26	528	KX090420	Aspergillus terreus internal transcribed spacer 1, partial...	505	linear
915.212	0	99.7%	27	529	KU945875	Aspergillus terreus strain SQU-WT03 internal transcribed...	505	linear

Şekil 9. DNA dizi analizi biyoinformatik değerlendirmeler (devam)

## Yerli Alfa-Amilaz Enzimi Üretimi İçin Yerli Fungus İzolasyonu, Makroskobik, Mikroskobik Tanımlaması, DNA Dizi Analizi ve Biyoinformatik Değerlendirmeler

Bit-Score	E Value	Grade ▼	Hit start	Hit end	Name	Description	Sequence Le...	Topology
959.531	0	99.9%	43	564	KU319439	Aspergillus terreus strain K1SF-Pb-15 internal transcribe...	523	linear
959.531	0	99.9%	151	672	KP987087	Aspergillus hortai strain CBS 124230 18S ribosomal RNA...	523	linear
961.378	0	99.9%	34	556	KP175279	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM3934 internal transcri...	523	linear
961.378	0	99.9%	39	561	KP175278	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM3921 internal transcri...	523	linear
961.378	0	99.9%	40	562	KP175275	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM2137 internal transcri...	523	linear
961.378	0	99.9%	37	559	KP175274	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM2025 internal transcri...	523	linear
961.378	0	99.9%	37	559	KP175264	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM676 internal transcribe...	523	linear
961.378	0	99.9%	42	564	KP175263	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM673 internal transcribe...	523	linear
961.378	0	99.9%	43	565	KP175262	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM541 internal transcribe...	523	linear
959.531	0	99.9%	174	695	KM491895	Aspergillus terreus 18S ribosomal RNA gene, partial sequ...	523	linear
961.378	0	99.9%	31	553	JQ988829	Aspergillus sp. SHW15 internal transcribed spacer 1, part...	523	linear
959.531	0	99.9%	29	550	FR837962	Aspergillus hortai 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRN...	523	linear
959.531	0	99.9%	34	555	EF567983	Aspergillus terreus strain WM 06.853 isolate ISHAM-ITS_I...	523	linear
959.531	0	99.9%	33	554	AJ001368	Aspergillus terreus 5.8 S rDNA and ITS1 and ITS2 spacers	523	linear
957.685	0	99.8%	48	570	KM874780	Aspergillus terreus isolate ML3-1 18S ribosomal RNA gen...	523	linear
955.838	0	99.8%	80	603	HQ608043	Aspergillus terreus isolate CY229 18S ribosomal RNA gen...	524	linear
953.992	0	99.8%	58	579	LC057406	Aspergillus terreus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA,...	523	linear
953.992	0	99.8%	58	579	KY425727	Aspergillus terreus strain E17F small subunit ribosomal R...	523	linear
953.992	0	99.8%	51	572	KY200574	Aspergillus terreus isolate G1 internal transcribed spacer...	523	linear
953.992	0	99.8%	68	589	KX462892	Uncultured fungus clone Asc21 18S ribosomal RNA gene,...	523	linear
953.992	0	99.8%	24	545	KX160451	Aspergillus sp. BAB-5682 18S ribosomal RNA gene, parti...	523	linear
953.992	0	99.8%	34	555	KX090420	Aspergillus terreus internal transcribed spacer 1, partial...	523	linear

Bit-Score	E Value	Grade ▼	Hit start	Hit end	Name	Description	Sequence Le...	Topology
959.531	0	99.9%	7	528	JN638785	Aspergillus terreus strain IDR1100004782 internal transcri...	523	linear
953.992	0	99.8%	21	541	KU319439	Aspergillus terreus strain K1SF-Pb-15 internal transcribe...	523	linear
953.992	0	99.8%	129	649	KP987087	Aspergillus hortai strain CBS 124230 18S ribosomal RNA...	523	linear
953.992	0	99.8%	12	533	KP175279	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM3934 internal transcri...	523	linear
953.992	0	99.8%	17	538	KP175278	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM3921 internal transcri...	523	linear
953.992	0	99.8%	18	539	KP175275	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM2137 internal transcri...	523	linear
953.992	0	99.8%	15	536	KP175274	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM2025 internal transcri...	523	linear
953.992	0	99.8%	15	536	KP175264	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM676 internal transcribe...	523	linear
953.992	0	99.8%	20	541	KP175263	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM673 internal transcribe...	523	linear
953.992	0	99.8%	21	542	KP175262	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM541 internal transcribe...	523	linear
953.992	0	99.8%	33	553	KP131620	Aspergillus terreus strain PWQ2409 isolate ISHAM-ITS_ID...	523	linear
953.992	0	99.8%	26	547	KM874780	Aspergillus terreus isolate ML3-1 18S ribosomal RNA gen...	523	linear
953.992	0	99.8%	152	672	KM491895	Aspergillus terreus 18S ribosomal RNA gene, partial sequ...	523	linear
953.992	0	99.8%	9	530	JQ988829	Aspergillus sp. SHW15 internal transcribed spacer 1, part...	523	linear
953.992	0	99.8%	7	527	FR837962	Aspergillus hortai 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRN...	523	linear
953.992	0	99.8%	12	532	EF567983	Aspergillus terreus strain WM 06.853 isolate ISHAM-ITS_I...	523	linear
953.992	0	99.8%	11	531	AJ001368	Aspergillus terreus 5.8 S rDNA and ITS1 and ITS2 spacers	523	linear
950.298	0	99.7%	58	580	HQ608043	Aspergillus terreus isolate CY229 18S ribosomal RNA gen...	524	linear
948.452	0	99.7%	36	556	LC057406	Aspergillus terreus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA,...	523	linear
948.452	0	99.7%	36	556	KY425727	Aspergillus terreus strain E17F small subunit ribosomal R...	523	linear
948.452	0	99.7%	29	549	KY200574	Aspergillus terreus isolate G1 internal transcribed spacer...	523	linear
948.452	0	99.7%	46	566	KX462892	Uncultured fungus clone Asc21 18S ribosomal RNA gene,...	523	linear
948.452	0	99.7%	47	567	KX160451	Aspergillus sp. BAB-5682 18S ribosomal RNA gene, parti...	523	linear

Şekil 9. DNA dizi analizi biyoinformatik değerlendirmeler (devam)

## Yerli Alfa-Amilaz Enzimi Üretimi İçin Yerli Fungus İzolasyonu, Makroskobik, Mikroskobik Tanımlaması, DNA Dizi Analizi ve Biyoinformatik Değerlendirmeler

Bit-Score	E Value	Grade ▼	Hit start	Hit end	Name	Description	Sequence Le...	Topology
972.458	0	99.9%	2	530	JN638785	Aspergillus terreus strain IDR1100004782 internal transc...	530	linear
966.918	0	99.8%	16	543	KU19439	Aspergillus terreus strain K15F-Pb-15 internal transcribe...	530	linear
966.918	0	99.8%	124	651	KP987087	Aspergillus hortai strain CBS 124230 18S ribosomal RNA...	530	linear
966.918	0	99.8%	7	535	KP175279	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM3934 internal transcri...	530	linear
966.918	0	99.8%	12	540	KP175278	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM3921 internal transcri...	530	linear
966.918	0	99.8%	13	541	KP175275	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM2137 internal transcri...	530	linear
966.918	0	99.8%	10	538	KP175274	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM2025 internal transcri...	530	linear
966.918	0	99.8%	10	538	KP175264	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM676 internal transcribe...	530	linear
966.918	0	99.8%	15	543	KP175263	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM673 internal transcribe...	530	linear
966.918	0	99.8%	16	544	KP175262	Aspergillus sp. PE-2014 strain GM541 internal transcribe...	530	linear
966.918	0	99.8%	28	555	KP131620	Aspergillus terreus strain PWQ2409 isolate ISHAM-ITS_ID...	530	linear
966.918	0	99.8%	21	549	KM84780	Aspergillus terreus isolate ML3-1 18S ribosomal RNA gen...	530	linear
966.918	0	99.8%	147	674	KM491895	Aspergillus terreus 18S ribosomal RNA gene, partial sequ...	530	linear
966.918	0	99.8%	4	532	JQ988829	Aspergillus sp. SHW15 internal transcribed spacer 1, part...	530	linear
966.918	0	99.8%	2	529	FR837962	Aspergillus hortai 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRN...	530	linear
966.918	0	99.8%	7	534	EF567983	Aspergillus terreus strain WM 06.853 isolate ISHAM-ITS_I...	530	linear
966.918	0	99.8%	6	533	AJ001368	Aspergillus terreus 5.8 S rDNA and ITS1 and ITS2 spacers	530	linear
963.225	0	99.7%	53	582	HQ608043	Aspergillus terreus isolate CY229 18S ribosomal RNA gen...	531	linear

Şekil 9. DNA dizi analizi biyoinformatik değerlendirmeler (devam)

Günümüzde hem biyoteknolojik potansiyelleri hem de termostabilite (sıcaklığa dayanıklılık) çalışmalarında kullanılmak üzere iyi bir model olmaları nedeniyle termofil (45-70 °C sıcaklık aralığında üreyebilen sıcak seven mikroorganizmalar) ve mezofil (20-45°C sıcaklık aralığında üreyebilen ılık seven mikroorganizmalar (Madigan ve ark., 2009) mikroorganizmalardan amilaz enzimlerinin karakterize edilmesine verilen önem gittikçe artmaktadır. Protein mühendisliği çalışmalarında, termostabilite mekanizmaları kullanılarak alışılmamış daha termostabil (sıcaklığa dayanıklı) özellikte enzimlerin geliştirilmesi amacı ile çalışmalar yapılmaktadır. (Leveque ve ark., 2000). Yapılan çalışmaların ve araştırmaların çoğunun temelinde endüstrideki bu ihtiyaca cevap verebilmek için farklı kaynaklardan farklı özellikler gösteren temofil ve mezofil mikroorganizma izolatlarının tanımlanması ve stabil enzimlerin ortaya çıkartılması yatmaktadır (Haki ve Raksit, 2003). Ancak Bakteriyel amilazlara oranla Fungal amilazlarla yapılan çalışmalar oldukça yetersizdir.

Ülkemizde her yıl farklı endüstri sektöründe kullanılmak üzere yurt dışından oldukça yüksek maliyette fungal amilaz enzimi ithal

edilmektedir. Bu nedenle yerli ve milli enzim üretimine katkı sağlamak amacıyla laboratuvar ölçeğinde gerçekleştirilen enzim ar-ge çalışmalarının pilot ölçeğe ve sonrasında endüstriyel ölçeğe taşınması gerekmektedir.

## SONUÇ

Çalışmamızda gıda ve fırıncılık endüstrisinde önemi olan amilaz enziminin ticari boyutta yerli ve milli üretimine başlangıç oluşturulması amacıyla Afyon, Eskişehir, Uşak ve Ankara termal alanlarından 23 termotolerant yerli fungus izole edilmiştir. İzolatların makroskobik ve mikroskobik incelemeleri sonucunda yüksek amilaz üreten *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* ve *Trichoderma atroviride* türüne ait 6 izolatın tür teşhisi yapılmıştır.

Yerli fungus izolatlarının tanısına ilişkin makroskobik ve mikroskobik görüntüleri rapor edilmiştir.

*Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* ve *Trichoderma atroviride* izolatlarının fungus spesifik primerleri kullanılarak izolatların 18S rDNA ve ITS bölgeleri PCR amplifikasyonu ve moleküler tanımlaması yapılmıştır. Web tabanlı BLAST analizleri ile karşılaştırılmıştır.



Moleküler karakterizasyon çalışması sonucunda klasik tanımlama ile moleküler tanımlamanın birbirini desteklediği görülmüştür.

Sonuç olarak, izolasyon, teşhis ve karakterizasyon çalışmalarının tümünde makroskobik ve mikroskobik tanımlamaların DNA düzeyinde moleküler karakterizasyon çalışmaları ile desteklenmesinin uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Tarım ve Orman Bakanlığı TAGEM/HSGYAD/16/A05/P01/103 No'lu Proje tarafından desteklenmiştir. Teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Barnett J and Hunter B, 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. American Phytopathological Society Press, St. Paul.
- Cowan D, 1996. Industrial Enzyme Technology, TIBTECH, No. 14, 177-178.
- Çetin ET, 1983. Endüstriyel Mikrobiyoloji, İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı, Bayda Yayın, I. Baskı, 2, 145-146.
- Haki GD and Raksit SK. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review Bioresource Technolog, 89: 17-34.
- Hasenekoglu I, (1991). Toprak Mikrofungusları. Atatürk Üniversitesi yayınları No. 689 Erzurum.
- Leveque E, Janecek S, Haye B and Belarbi A, 2000. Thermophilic archaeal amyolytic enzyme. Enzyme and Microbial Technology, 26: 3-14.
- Madigan MT, Martingo J, (2009). Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi. Palme Yayıncılık. ISBN: 6055829629.
- Nguyen, QD, Rezessy-Szabo J.M., Claeysens M, Stals I, Hoschke A. 2002. Purification and characterization of amyolytic

enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. Enzyme Microb. Technol. 3:345-352.

- Pitt JI, (1979). The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press London.
- Sahnoun M, Bejara S, Sayari A, Triki MA, Kriaa M, Kammoun R, 2012. Production, purification and characterization of two alfa-amylase isoforms from a newly isolated *Aspergillus Oryzae* strain S2. Process Biochemistry 47 18–25.
- Saleem 1, Mohsen KH, 2014. Ebrahim Science Direct Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. Journal of Taibah University for Science 8 90–97
- Ünal A, 2015. Production of  $\alpha$ -amylase from some thermophilic *Aspergillus* species and optimization of its culture medium and enzyme activity. African Journal of Biotechnology, DOI: 10.5897/AJB2015.14924, 14(47): 3179-3183.
- Verweij PE, Meis JFGM, van den Hurk P, Zoll J, Samson RA, Melchers WJG. 1995. Phylogenetic relationships of five species of *Aspergillus* and related taxa as deduced by comparison of sequences of small subunit ribosomal RNA. Med Mycol 33:185–90.
- White TJ, Bmns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. PCR meth appl. San Diego: Academic Press; p. 315–22.