



**AMİLAZ ENZİMİ ÜRETEN YERLİ FUNGUS İZOLATLARININ DNA
BARKODLAMASI**

Hazırlayan: Merve EROĞLU PARİM

Danışman: Doç. Dr. Arzu ÜNAL

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

IĞDIR/2023

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
İĞDIR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AMİLAZ ENZİMİ ÜRETEN YERLİ FUNGUS İZOLATLARININ DNA
BARKODLAMASI**

Merve EROĞLU PARİM

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

İĞDIR/2023

TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Merve EROĞLU PARİM



Bu çalışma Iğdır Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: ZİF0622Y29

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

AMİLAZ ENZİMİ ÜRETEYEN YERLİ FUNGUS İZOLATLARINI DNA BARKODLAMASI

PARİM EROĞLU, MERVE

Yüksek Lisans Tezi

Terımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Arzu ÜNAL

Temmuz 2023, 27 Sayfa

Hem Biyoteknolojik potansiyelleri hem de termostabilite çalışmalarında kullanılmak üzere iyi bir model olmaları nedeniyle hipertermofilik, termofilik ve mezofilik funguslarda amilolitik enzimlerin karakterize edilmesine verilen önem gün geçtikçe artmaktadır. Ülkemizde giderek gelişmekte olan gıda endüstrisi de amilaz enzimine olan ilginin artmasına neden olmaktadır.

Fungus türlerinin tanımlanmasında morfolojik yöntemler yeterli değildir. Bu nedenle hızlı ve doğru tanımlamada DNA verilerine dayalı yeni tekniklerin kullanılması ön plana çıkmaktadır. Bu kapsamda çalışmamızda yerli *Aspergillus niger* fungus izolatımızın pleomorfik doğası nedeniyle DNA barkodlamasının yapılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada Afyon, Eskişehir, Uşak ve Ankara illerine ait termal alanlarındaki toprak ve su örneklerinden elde edilen yerli fungus izolatlarımızdan en yüksek amilaz enzim aktivitesi gösteren *Aspergillus niger* türünün DNA barkodlaması yapılmıştır. Bakanlık destekli proje kapsamında Türkiye'deki Ege Bölgesi ve İç Anadolu Bölgesi orijinli termal alanlardan elde ettiğimiz yerli ve milli alfa-amilaz enzim aktivitesi 38.6 U/mg olan *Aspergillus niger* G 2-1 (Ünal vd., 2022) fungus izolatımızın patent sürecinde DNA Barkodlamasına ihtiyaç duyulması nedeniyle bu çalışma planlanmış olup ilk kez gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar doğrultusunda mikrobiyal gen bankalarına fungus genetik materyali oluşturulması, elde edilen yerli fungal enzimin gıda endüstrisinde uygulamaya ve ekonomiye aktarılmasına yönelik Ar-Ge çalışmalarının yapılması planlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Aspergillus niger*, Amilaz, Yerli fungus izolatı, DNA Barkodlama

ABSTRACT

DNA BARCODING OF THE NATIVE FUNGI ISOLATES PRODUCING AMYLASE ENZYME

PARİM EROĞLU, Merve

Master's Thesis

Department of Thermal Biotechnology

Thesis Advisor: Assoc. Dr. Arzu ÜNAL

July 2023, 27 Pages

The importance given to the characterization of amylolytic enzymes in hyperthermophilic, thermophilic and mesophilic fungi is increasing day by day due to their biotechnological potential and being a good model to be used in thermostability studies. The food industry, which is gradually developing in our country, also causes an increase in the interest in the amylase enzyme.

Morphological methods are not sufficient for the identification of fungal species. For this reason, the use of new techniques based on DNA data for rapid and accurate identification comes to the fore. In this context, in our study, it was aimed to perform DNA barcoding due to the pleomorphic nature of our native *Aspergillus niger* fungus isolate.

In this study, DNA barcoding of *Aspergillus niger* species, which has the highest amylase enzyme activity, was performed from our native fungus isolates obtained from soil and water samples in the thermal areas of Afyon, Eskişehir, Uşak and Ankara. DNA in the patent process of our *Aspergillus niger* G 2-1 (Ünal vd., 2022) fungus isolate with a local and national alpha-amylase enzyme activity of 38.6 U/mg, which we obtained from the thermal areas originating in the Aegean Region and Central Anatolia Region in Turkey within the scope of the Ministry-supported project. Due to the need for barcoding, this study was planned and carried out for the first time. In line with the results obtained from this thesis, it is planned to carry out R&D studies for the creation of fungal genetic material for microbial gene banks and the transfer of the obtained local fungal enzyme to the application in the food industry and economy.

Keywords: *Aspergillus niger*, Amylase, Native fungi isolate, DNA Barcoding

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Moleküler Biyoloji'nin sağladığı Genetik araştırmaları, Biyoteknolojik yöntemler ve araçlar ile genetik kaynakların ve yerel ürünlerin orijinalliğini kanıtlamak ve onaylamak, tüketicilerin tercihi ve üreticilerin ürünlerini ispatlaması açısından oldukça önem arz etmektedir. Bu çalışmada Afyon Gazlıgöl iline ait (*Aspergillus niger*) yerli fungus izolatının DNA barkodlaması gerçekleştirilmiştir. DNA barkodlama ile *Aspergillus niger* izolatının ITS barkod bölgesine ait DNA dizileri ortaya çıkarılarak bu izolata ait özgün DNA barkodları elde edilmiştir. Bu sayede istenildiği takdirde *Aspergillus niger*'in genetik analizleri yapılabilmektedir ürün orijinalliği konusunda hem tüketici bilgilendirilmiş olabilecek hem de üretici ürününün orijinalliğini ispatlayabilecektir. Ayrıca bu tez çalışmasından elde edilen veriler Endüstriyel Biyoteknoloji bilim dünyasına ve literatüre katkı sağlanmıştır.

Bu tez çalışmasının planlanmasında, gerçekleştirilmesinde, tez yazımında ve hazırlanmasında yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tez çalışmam boyunca her türlü yol gösterici olan, olumlu tavırlarıyla beni cesaretlendiren ve bugüne gelmemi sağlayan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Arzu ÜNAL'a ve laboratuvar çalışmalarında ve tez yazım sürecinde bilgi birikimleriyle her türlü desteği sağlayan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Kaan HÜRKAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Tuba Genç KESİMCİ'ye ve Öğr. Gör. M. Zahid ÖZOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca maddi manevi tüm desteklerini gösteren, hep yanımda olan sevgili annem Yüksel EROĞLU, babam Suat EROĞLU ve tüm aileme, hayat ortağım ve bu süreçteki en büyük destekçim canım eşim Mehdi Can PARİM'e sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek Lisans Tezim Iğdır Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından ZİF0622Y29 No'lu proje ile desteklenmiştir. Bu desteklerinden dolayı Iğdır Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi'ne teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Merve Eroğlu PARİM

IĞDIR/2023

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
3.1. Fungus İzolatlarının Üretimi, Çoğaltımı ve Muhafazası.....	11
3.2. DNA Barkodlama.....	11
3.2.1. DNA İzolasyonu	11
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR).....	12
3.2.3. Agaroz jel elektroforezi	14
3.3. ITS-rDNA Gen Bölgesinin Analizi	14
3.3.1. Biyoinformatik ve Filogenetik Çalışmalar	14
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	16
4.1.Genetik Kaynak Survey Çalışması.....	16
4.2. Fungus izolatlarının üretimi, çoğaltımı ve muhafazası	16
4.2.1. <i>Aspergillus niger</i> G2-1 izolatının çoğaltılması.....	16
4.2.2. <i>Aspergillus niger</i> G 2-1 izolatının muhafazası	17
4.3. DNA Barkodlama.....	18
4.3.1 DNA Barkodlama Analizleri	18
4.3.2.Biyoenformatik bulgular.....	19
4.3.3. Filogenetik bulgular.....	21
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	22
KAYNAKLAR	24
ÖZGEÇMİŞ.....	28

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromide
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Asetik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
ITS	Internal Transcribed Spacer
mM	Mikromolar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	Patates Dekstroz Agar
rDNA	Ribozomal DNA
RNA	Ribonükleik Asit
μL	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. <i>Aspergillus</i> genusuna ait türlerin eşeysiz üreme evlerinin genel şematik gösterimi (A) ve bu yapıların şematik görünümü (B).....	7
Şekil 3.1. DNA izolasyonu	12
Şekil 3.2. PCR'a örneklerin yüklenmesi.....	13
Şekil 3.3. PCR da yürütme işlemi.....	13
Şekil 3.4. Agaroz Jel elektroforezi koşturulması	14
Şekil 4.1. <i>Aspergillus niger</i> G2-1 izolatının örnekleri.....	16
Şekil 4.2. <i>Aspergillus niger</i> G2-1 izolatının çoğaltılması.....	17
Şekil 4.3. <i>Aspergillus niger</i> G2-1 izolatının çoğaltılmış örneği	17
Şekil 4.4. <i>Aspergillus niger</i> fungusuna ait ITS, DNA barkod bölgelerine ait amplikonlarının agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	18
Şekil 4.5. <i>Aspergillus niger</i> fungusuna ait DNA karşılaştırması	20
Şekil 4.6. <i>Aspergillus niger</i> fungusuna ait filogenetik ağaç	21

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1. <i>Aspergillus niger</i> 'in filogenetik taksonomisi	6
Çizelge 3.1. DNA barkodlaması yapılan bölgeler için primer dizileri	13
Çizelge 5.1. <i>Aspergillus niger</i> fungusuna ait FASTA formatındaki DNA barkodları ...	23



1. GİRİŞ

Enzim hakkındaki bilgiler eskilere dayanmakla birlikte enzimlerin laboratuvar ölçeğindeki üretiminden endüstriyel ölçekteki üretimine geçişin sağlanması oldukça büyük önem arz etmektedir.

Bu zamanlarda hem biyoteknolojik fırsatları hem de termostabilite çalışmalarını keşfetmek için uygun bir model olmaları nedeniyle mezofilik, termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalarda amilolitik enzimlerin karakterize edilmesine verilen önem gün geçtikçe artmaktadır.

Endüstriyel açıdan önemli olan bazı süreçler Biyoteknoloji teknikleri ve enzimlerin de yardımıyla daha hızlı ve kolay bir biçimde gerçekleştirilebilmektedir. Böylelikle enzimlerin endüstri sektöründe kullanılması önem kazanmıştır. Endüstride enzimlerden yararlanılması ekonomik açıdanda birçok yarar sağlamaktadır.

Dünya çapındaki endüstriyel enzim pazarı değeri 1,4 milyar dolar olarak tahmin edilmektedir ve yıllık olarak %10'un üzerinde bir büyüme oranı ile birlikte %4 ila %5 arasında satış artışları göstermektedir. Endüstriyel enzimlerin kullanım alanları arasında gıda endüstrisi de bulunmakta ve gıda endüstrisi endüstriyel enzim üretiminin %75'ini oluşturmaktadır, bu da endüstride en yaygın kullanım alanının gıda endüstrisi olduğunu göstermektedir (Cowan, 1996).

Çeşitli enzimler, gıda endüstrisinde mikrobiyal kaynaklardan elde edilmekte ve kullanılmaktadır. Bunun nedeni, bu enzimlerin diğer bitkisel veya hayvansal enzimlere kıyasla daha yüksek katalitik aktiviteye sahip olmaları, stabil olmaları, kolayca üretilibilmeleri, yan ürün oluşumu riskinin düşük olması ve maliyet açısından avantajlı olmalarıdır.

Amilaz enzimine olan ilgi, ülkemizdeki gıda endüstrisinin hızla gelişmesiyle birlikte artmıştır. 2015 yılı itibarıyla ülkemizde yıllık ortalama 9.700 ton enzim yurt dışından ithal edilmektedir. Hesaplamalar yıllık 263 milyon TL'ye karşılık geldiğini göstermektedir. Bu oran dünya enzim pazarının %25-33'ünü temsil etmektedir.

Ekmek üretiminde alfa amilaz enzimi hamurun gaz tutma kapasitesini ve ekmek hacmini artırır, ekmeğin raf ömrünü uzatır, ekmeğin iç rengi beyaz ve yapısına

homojenlik sağlar, ince kabuk ve kabuğa isteğe göre renk ayarlar, ekmeğin daha uzun süre saklanması ve ufalanmasını önler, ekmek içinin gözenekli yapısının kaliteli olmasını sağlar (Ünal vd., 2020).

DNA barkodlama son yıllarda gittikçe önem kazanmıştır. Fungusların moleküler düzeyde tanımlanmasında da kullanılması türler arasındaki farklılıkları göz önüne sermiştir. DNA barkodlamada kullanılan standart bir gen bölgesi alınarak hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanır.

Çalışmamızda fungusların tanımlanmasında hızlı ve doğru bir şekilde elde edilen DNA verileri kullanılarak yerli *Aspergillus niger* fungus izolatımızın DNA barkodlaması ilk defa yapılmıştır. Afyon, Eskişehir, Uşak ve Ankara illeri ve çevrelerinin termal alanlarındaki toprak ve su örneklerinden elde edilen yerli fungus izolatlarından en yüksek amilaz aktivitesi gösteren *Aspergillus niger*'in DNA Barkodlaması gerçekleştirilmiştir. DNA barkodlama ile amilaz enzimi üreten yerli fungus izolatlarını ITS barkod bölgesine ait DNA dizileri ortaya çıkarılmış ve *Aspergillus niger*'e özgü DNA barkodları elde edilmiştir. Böylece istenildiği takdirde amilaz enzimi üreten *Aspergillus niger* fungusunun genetik analizleri yapılarak ürünün endüstri pazarında hem tüketici bilgilendirilmiş olacak hem de üretici ürününün orijinalliğini ispatlayabilecektir.

Çalışmamız kapsamında enzim üretiminde dışa bağımlılığı azaltarak iç üretimimizde enzim pazarına katkı sağlamak, enzim teknolojisinin gelişimine yardımcı olmak, alfa-amilaz enziminin yurt içinde üretimiyle gıda endüstrisinde uygulanmasına öncülük etmek, mikrobiyal gen bankalarına materyal teminini sağlamak, literatüre ve biyoekonomiye katkı sağlamak amaçlarımız arasında yer almıştır.

Yerel örneklerin benzersizliğinin doğrulanması ve onaylanması, tüketicilerin tercihlerini belirlemede ve üreticilerin ürünleri hakkında kanıtlar sunarak etkilerini ortaya koymada büyük bir önem taşımaktadır.

Çalışmamızda ülkemiz yerel izolat örneklerinin DNA barkodları ortaya çıkarılmış ve yerel değerlerimizin genetik olarak da koruma altına alınabilmesi için gereken metodoloji ortaya çıkarılarak sonraki çalışmalara öncülük etmesi sağlanmıştır.

Çalışmamızda patent sürecinde de önem arz eden DNA Barkodlamanın Biyoteknolojik avantajlarının ortaya konması amaçlanmıştır. Bu sayede ekstrem

koşullardan izole edilen izolatlar arasından ekmek yapımında önemi olan alfa-amilaz enzimi açısından yüksek enzim aktivitesi gösteren fungal izolatin moleküler düzeyde tespiti, mikrobiyal gen bankalarına materyal oluşturulması, DNA Barkodlaması gerçekleştirilen fungusdan elde edilen alfa-amilaz enziminin gıda endüstrisinde uygulamaya ve ekonomiye aktarılmasına yönelik Ar-Ge çalışmaları gerçekleştirilmiştir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Endüstriyel uygulamalarda oldukça önemli olan birçok işlem, biyoteknolojik ve enzimatik yöntemlerle daha verimli bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Bu süreçler sayesinde, geleneksel yöntemlere göre daha az enerji harcanarak daha yüksek kaliteli ürünler elde edilebilmektedir. Ayrıca, biyoteknolojik ve enzimatik süreçlerin çevre dostu olması da endüstriyel açıdan büyük bir avantaj sağlamaktadır.

Enzimlerin endüstride kullanımı, enerji gereksinimleri yüksek olan yöntemlere kıyasla daha ekonomik bir seçenek sunar. Özellikle yüksek sıcaklık ve basınç gibi zorlu koşullar altında gerçekleştirilebilen geleneksel işlemler yerine, enzimatik süreçler daha düşük enerji tüketimiyle aynı veya daha iyi sonuçlar verir. Bunun yanı sıra, enzimlerin seçiciliği sayesinde istenmeyen yan ürünlerin oluşumu da azalır. Bu şekilde, endüstriyel üretimde daha verimli, çevre dostu ve ekonomik bir yol sunulmuş olur (Çetin, 1983).

Gıda sanayisinde mikrobiyolojik kaynaklı birçok enzimden yararlanılmaktadır ve bunlar arasında amilazlar önemli bir yer tutar. Amilazlar, ekmek üretimi gibi pek çok farklı gıda endüstrisi alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Dünya genelinde ticari enzim pazarının yaklaşık %25-33'ünü temsil eden amilazlar, gıda endüstrisi için önemli bir etkiye sahiptir ve sektörde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Nguyen 2002).

Fungal alfa amilaz kullanımı, işlemlerin yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirildiği durumlarda bakteriyel ve viral kontaminasyon riskini azaltmak için etkili bir yol olarak görülmektedir. Bu enzimler, yüksek sıcaklıklarda bile stabil kalabilen sıcaklığa dayanıklı özelliklere sahiptir. Dolayısıyla, gıda endüstrisi işlemlerinde fungal alfa amilaz kullanımı, ürünlerin hijyenik koşullarda üretilmesine yardımcı olur ve ürünlerin kalitesini artırır. Aynı zamanda, bakteriyel ve viral kontaminasyon riskini minimize ederek üretim sürecinin güvenliğini sağlar (Fujiwara, 2002).

Enzimlerin üretimindeki gelişmeler, son yıllarda büyük bir önem kazanmıştır. Bu gelişmeler sayesinde, endüstriyel olarak önemli enzimler daha saf, ucuz ve bol miktarda üretilmektedir. Enzim biyoteknolojisi, bu sürecin önemli bir parçasıdır ve yeni teknolojiler sayesinde enzimlerin üretimi daha verimli hale getirilmiştir. Enzimlerin tarihsel sürecine bakıldığında, bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan elde edildiği görülür. Ancak endüstriyel ihtiyaçları karşılamak için,

özellikle bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimler yeterli olmamıştır. Bu nedenle, endüstriyel uygulamalar için giderek daha fazla mikrobiyal kaynaklı enzim kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar, genetik yapıları ve biyokimyasal çeşitlilikleri nedeniyle enzim üretimi için mükemmel bir kaynak olarak görülmektedir. Ayrıca mikroorganizmalar, genetik manipölasyonlarla istenen özelliklerde enzimlerin üretilmesine de olanak tanımaktadır.

Bu özellikleri sayesinde, mikrobiyal enzimler endüstriyel uygulamalarda önemli bir role sahiptir. Mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, yüksek katalitik aktiviteleri, yan ürün oluşturmayan özellikleri ve düşük maliyetli üretimleri nedeniyle bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre çok daha avantajlıdır. Mikroorganizmaların kontrol altında yetiştirilmesi sayesinde, istenilen enzimler büyük miktarlarda ve düşük maliyetlerle üretilebilir. Ayrıca, mikrobiyal enzimlerin stabilitesi ve performansı da genellikle daha yüksektir, bu da endüstriyel uygulamalarda daha iyi sonuçlar alınmasını sağlar (Yaraş, 2011).

Biyokimya tarihinde yapılan araştırmaların büyük bir kısmı, enzimler üzerine odaklanmıştır. Enzimlerin özellikleri ve işlevleri hakkındaki bilgilerimiz, modern biyoteknolojik araçların kullanımıyla birlikte, birçok üretim sürecinin geliştirilmesine önemli katkı sağlamıştır. Bu teknolojinin amaçları arasında, daha az enerji, su ve hammadde kullanımı ile daha az atık ve çevresel kirlilik yer almaktadır. Endüstriyel enzimlerin kullanım alanlarının giderek genişlemesi, ekonomik değerinin yüksek olması ve enzim teknolojilerindeki gelişmeler, bu alanda yapılan araştırmaların daha da önemli hale gelmesine neden olmuştur. Endüstriyel enzimlerin kullanımı, birçok endüstriyel süreci daha verimli, daha çevre dostu ve maliyet etkin hale getirmektedir (Keskin, 2015).

Endüstriyel sektörlerde kullanılan amilaz enzimi, hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilse de çoğunlukla mikroorganizmalardan üretilir. Mikroorganizmalardan elde edilen amilazlar, ucuz ve bol miktarda üretilebildikleri, istenmeyen yan ürün oluşturmadıkları ve yüksek katalitik aktiviteye sahip oldukları için endüstriyel uygulamalarda tercih edilen bir seçenektir. Amilaz enzimleri, toplam enzim pazarının %25'ini oluşturmaktadır. Bu nedenle, mikrobiyal kaynaklı amilaz

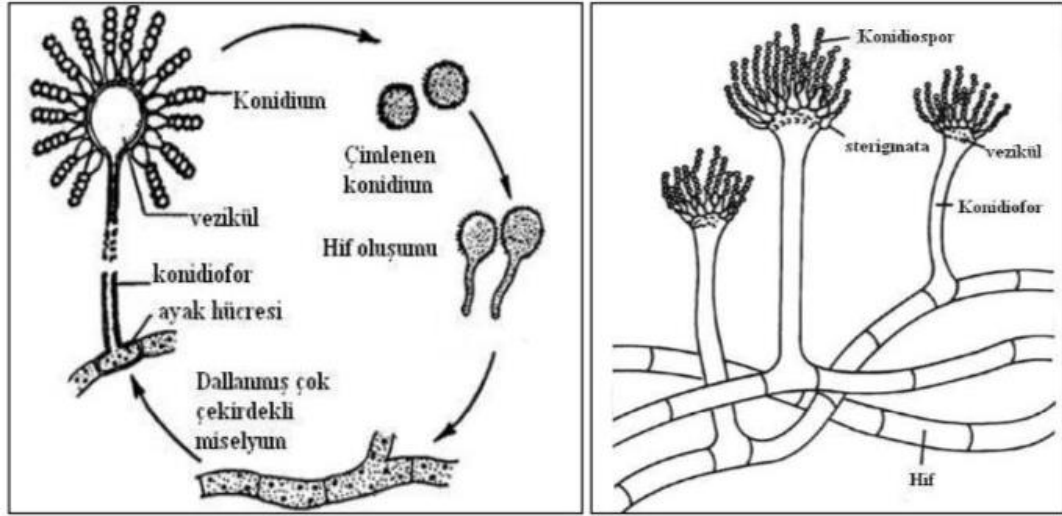
enzimlerinin araştırması ve geliştirilmesi, endüstriyel uygulamalar açısından son derece önemlidir (Yaraş, 2011).

Amilaz üreten fungusların en yaygın türleri arasında özellikle *Aspergillus* yer almaktadır. Son yıllarda, mayaların amilolitik aktiviteleri üzerindeki ilgi artmıştır ve bu grup üzerine de birçok çalışmalar yapılmıştır (Batur ve Aygan, 2015).

Aspergillus türleri, dünya genelinde yaygın olarak bulunan hifli mantarlar arasındadır. Bu mantarlar, toprakta çürüyen bitki materyalleri gibi doğal ortamlarda yaşarlar ve ürettikleri enzimler sayesinde organik maddeleri ayrıştırarak besinlerini sağlarlar. *Aspergillus* türleri genellikle saprofit olarak yaşarlar ancak uygun koşullarda bitki, hayvan ve insanlarda patojen hale geçebilirler. Bu mantarların üreme hızı oldukça yüksektir ve zincirler halinde çok sayıda konidyum üretebilirler. Konidyumlar genellikle 2-5 µ çapında ve hava ile taşınabilen bir hücrelidir. Duvarları düz veya pürüzlü, dikenli; şeffaf veya pigmentli olabilirler. *Aspergillus* türleri, bu özellikleri sayesinde biyolojik, endüstriyel ve tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır (Uçar, 2011).

Çizelge 2.1. *Aspergillus niger*'in filogenetik taksonomisi

Alem	Fungi
Filum	Ascomycota
Alt filum	Pezizomycotina
Sınıf	Eurotiomycetes
Takım	Eurotiales
Familya	Trichocomaceae
Cins	<i>Aspergillus</i>
Tür	<i>niger</i>



Şekil 2.1. Aspergillus genusuna ait türlerin eşeysiz üreme evlerinin genel şematik gösterimi (A) ve bu yapıların şematik görünümü (B)

Aspergillus türleri, ışık mikroskobu altında incelendiğinde, iplik şeklinde yapılar oluştururlar. Bu yapılar küçük iplikçiklerden oluşur ve her birine "hif" adı verilir. Hifler bir araya gelerek "misel" adı verilen bir ağ oluştururlar. Misel, bir türün bulunduğu alanda bulunan tüm hiflerin birleşiminden oluşur. Hücreler, birbirlerinden "septum" adı verilen bölme duvarları ile ayrılırlar. Bu bölme duvarları, hücrelerin içindeki yapıların ve moleküllerin birbiriyle karışmasını önleyerek, ayrı işlevlere sahip hücrelerin oluşumunu sağlar (Şekil 2.1.). Fungal spor, mantar büyümesinin ilk adımı olarak kabul edilir. Bu sporlar, uygun çevre koşulları sağlandığında çimlenirler ve bir hücreden başlayarak ipliksi yapıda hifler meydana getirirler. Hifler belirli bir büyüklüğe ulaştıktan sonra genellikle dallanır. Miselyum adı verilen bu dallı ağlar, katı ortamlarda olgunluğa ulaştıklarında konidioforlar üretmeye başlarlar. Konidioforlar, miselyumun üzerinde meydana gelen ve konidiosporları içeren yapılar olarak tanımlanır. Bu sayede mantarlar, sporların oluşumu ile başlayan üreme siklusunu tamamlamış olurlar (Şekil 2.1.). Hücre büyümesi ve şekli, çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Bu faktörler arasında ortam bileşenleri ve ortam pH'sı gibi çeşitli etmenler yer almaktadır. Hücrelerin büyüme hızı ve şekilleri bu çevresel faktörlere göre farklılık göstermektedir (Deveci, 2008).

Çok sayıda araştırma yapılmış olmasına rağmen, amilaz enzimi üretim teknolojisi patent altında olduğu için detaylı bir şekilde açıklanamamaktadır. Ülkemizdeki gıda endüstrisinin gelişmesi, amilaz enzimine olan ilgiyi arttırmıştır ancak

bu enzim hakkındaki bilgiler yeterli değildir. Amilaz enzimleri, önemli enzimler arasında yer almasına rağmen henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Yaraş, 2011).

İyi hacimli ekmek eldesi, yeterli alfa-amilaz aktivitesine ve optimum gaz tutma kapasitesine (gluten kalitesine) bağlıdır. Bu nedenle ekmek yapımında kullanılacak unun alfa-amilaz enzim aktivitesi yetersiz ise dışarıdan ilave edilmesi gereklidir. Alfa-amilaz enzimi, hamurun viskozitesini azaltarak işleme kolaylığı sağlar ve bunun sonunda eskisinden daha yumuşak ve hacim olarak yüksek ekmek elde edilmiş olur. Bu enzimin etkisiyle hamurun yapısal özellikleri değiştiğinden, ekmek üretimi sürecinde önemli bir rol oynar. Enzim teknolojisi, son yıllarda hızla gelişerek kullanım alanlarının çeşitliliğini arttırmış ve ekonomik değeri de yüksek bir sektör haline gelmiştir. Bu nedenle, enzimlerle ilgili araştırmaların önemi giderek artmaktadır. Özellikle bazı ülkeler dışında diğer ülkelerin enzim kaynaklarına tamamen bağımlı olması, bu konunun daha da büyük bir önem kazanmasına neden olmaktadır (Ünal vd., 2022).

Mantar (Fungus) DNA barkodlama araştırması ilk olarak 2003 yılında Kanada'daki Guelph Üniversitesi'ndeki araştırmacılar tarafından yapılmıştır. Barcode of Life (CBOL) Konsorsiyumu tarafından 2004 yılında önemli ilerleme kaydedilmiştir. Daha sonra DNA Barkod Referans Kütüphanesinde daha güvenilir tanımlama araçları toplanmıştır (Danesh Rezaee ve Demir, 2020).

DNA barkodlama, canlı türlerinin tanımlanması için kullanılan bir yöntemdir ve belirli bir gen veya genlerden alınan kısa DNA bölümleri kullanılır. Moleküler markörler aracılığıyla yapılan bu işlem, 1980'lerden günümüze kadar hızla yaygınlaşmıştır. Örneğin, 1986 yılında GenBank veritabanında mevcut olan 606 adet DNA barkod dizisi, 2018 yılı itibarıyla yaklaşık 210 milyon seviyesine yükselmiştir, yani 340 bin kat artmıştır (NCBI, 2019).

Moleküler Biyolojideki son gelişmeler ve DNA tabanlı moleküler yöntemlerin gelişmesiyle birlikte, bilim adamları mantarları hızlı ve doğru bir şekilde tanımlamak için bu yöntemleri kullandılar (Danesh vd., 2020).

Bugün itibarıyla, ortalama 1.5 milyona ulaşan mantar çeşidi bulunduğu düşünülmektedir, ancak bunların sadece %10'undan azı mevcut bilgilerimiz dahilinde tanımlanmıştır. Özellikle son dönemde gelişen moleküler biyoloji teknolojisi, funguslar

gibi çeşitli canlı organizma gruplarında yeni türlerin keşfedilmesini ve tanımlanmasını kolaylaştırmaktadır.

DNA Barkodlama; genomun kısa parçalarından elde edilen DNA nükleotit dizilerinin ortaya çıkarılmasıdır. Önceleri morfolojik veya anatomik özelliklerin türleri ve genotipleri tanımlama konusunda yetersiz olduğu durumlarda ihtiyaç duyulan DNA barkodlama, günümüzde sistematik tanımlamalarda, filogenetik analizlerde, canlıların beslenme şekillerini ortaya çıkarmada, herbaryum veya fosil gibi tarihsel örneklerin tanımlanmasında, kriminal örneklerin teşhislerinde, gıda ürünlerinin içeriğinin belirlenmesinde, gıda ürünlerindeki orijinalliğin ve sahteciliğin belirlenmesi gibi canlıların olduğu tüm alanlarda geniş kullanıma sahip Biyoteknolojik bir yöntemdir. Bu sadece bir sınıflandırma sistemi değil, aynı zamanda tüm organizmaların tüm bölümlerindeki türleri moleküler düzeyde tanımlamanın oldukça verimli ve doğru bir yoludur. Genel olarak DNA barkodlaması taksonomi, moleküler filogeni ve popülasyon genetiğinin tamamlayıcısıdır (Demir vd., 2020).

Morfolojik yöntemlerin yetersiz kaldığı durumlarda, fungus türlerinin tanımlanmasında DNA verilerine dayalı teknikler daha etkili olabilmektedir. Bunun için kullanılan yeni tekniklerden biri de DNA barkodlamadır. Bu teknik, fungus ve benzeri mikroorganizmaları hızlı ve doğru bir şekilde tespit etmek için kullanılır. ITS-rDNA bölgesi, ribozomal RNA genindeki uygun bir barkod dizisi olarak kabul edilir. Bu bölgenin sekans verileri, farklı mikologlar tarafından birçok fungusta standart bir barkod olarak kullanılmasını sağlamıştır (Danesh Rezaee ve Demir, 2020).

DNA barkodlamanın kullanımı son 15-20 yılda ekolojik araştırmaların önemli bir parçası haline geldi ve biyolojik çeşitliliğe ve farklı mantar grupları arasındaki farklılıklara yeni bir yaklaşım getirdi (Hebert vd., 2003; Frézal ve Leblois, 2008). DNA barkodlama, türler arasındaki farklılıkları tanımlamanın bir yolu olarak kısa, standart bir gen bölgesini kullanarak türleri hızlı, doğru ve otomatik olarak tanımlamanın bir yoludur. Ekolojik çalışmalarda ve tür içi çeşitlilikte türleri doğru bir şekilde tanımlamak için bir araç olarak kullanılan güvenilir ve yüksek uzmanlık gerektirmez (Hebert vd., 2003; Frézal ve Leblois, 2008; Das ve Deb, 2015; Gosavi, 2016; Xu 2016; Yahr vd., 2016; Chaudhary ve Dahal, 2017). COX1 geni ilk olarak mantarlar için bir mantar barkod göstergesi olarak kullanılmıştır (Taylor vd., 2000; Hebert vd., 2003). Ancak

bugün, Uluslararası Mikoloji Derneği, COX1 replikasyonu, farklı uzunluklarda çok sayıda hareketli intron varlığı, bu genin birden fazla kopyasının varlığı ve tamamen netlik eksikliği gibi çeşitli problemler nedeniyle ITS-rDNA'nın yerini bir referansla değiştirmiştir. COX1'in metazoa grubunda (Crous vd., 2009; Schoch vd.,2012; Das ve Deb, 2015). Ribozomal RNA operonu, canlı organizmaların genomunda çoklu kopyalarla çift kopya şeklinde var olan çeşitli parçaları içerir. Bu alan küçük alt birim, büyük alt birim, IGS, ITS ve 5S bölgelerini içerir.

Ribozomal RNA operonunun yapısı, ardından ITS1 ve ITS2 dizilerini içeren ITS bölgesi olan küçük alt birim (SSU) tarafından takip edilir ve bu iki bölüm arasında 5.8S genini gözlemleyebiliriz. ITS bölgesinden sonra büyük alt birim (LSU) ve genellikle IGS1 ve IGS2 olmak üzere iki bölümden oluşan IGS bölgesi gelir. Bu iki bölüm arasındaki mesafede, bazı gruplarda 5S bölgesi yer almaktadır. V9G / ITS4, ITS1 / ITS4, ITS5 / ITS4 ve ITS1 / ITS4 dahil olmak üzere farklı mantar gruplarında bu alanı çoğaltmak için çok sayıda primer tasarlanmıştır (Crous vd., 2009; Schoch vd., 2012). Genom içinde çok sayıda kopya bulunan ITS bölgesi, farklı mantar grupları ve diğer canlı organizmalar arasında iyi çeşitlilik, primerlerin tasarımı için korunmuş sekanslar ve farklı evrimsel hızlara sahip çeşitli genler, barkodlama çalışmalarının referans temeli olarak kabul edilir. Şu anda Uluslararası Nükleotid Dizi Veritabanında (GenBank) ve diğer veri tabanlarında mantarlar için 100.000'den fazla ITS dizisi bulunmaktadır ve genel olarak ITS'nin mantar türlerinin tanımlanmasında tamamlayıcı bir ek olarak kullanılması yaygın bir yöntemdir (Crous vd., 2009; Schoch vd., 2012; Das and Deb, 2015; Mahmoud and Zaher, 2015; Gosavi, 2016; Xu, 2016; Badotti vd., 2017)

Fungusların pleomorfik doğası, türlerinin tanımlanmasını zorlaştırır ve bu nedenle DNA barkodlaması gibi moleküler tekniklerin kullanımı oldukça önemlidir. Bir çok canlı organizmanın yüz binden fazla referans barkod dizisinin oluşması DNA barkodlama projeleri sayesinde olmuştur. Bu veriler, türlerin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasına olanak sağlar. Ancak, gelecekteki çalışmalar, tanımlama sürecini daha da hızlandırmak için DNA barkodunun yönetimi ve otomasyonu üzerine odaklanacaktır (Danesh Rezaee ve Demir, 2020).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Fungus İzolatlarının Üretimi, Çoğaltımı ve Muhafazası

Aspergillus niger G 2-1 izolatının stok kültürlerini zenginleştirmek ve sürekliliğini sağlamak amacıyla; fungus üretimi için uygun olan Potato Dextrose Agar (PDA) katı besiyeri ortamı kullanılmıştır.

Çalışmalarımızda öncelikle Potato Dextrose Agar'ın kullanımı tercih edilmiştir. Potato Dextrose Agar (PDA) *in vitro* (canlı hücre dışında, laboratuvar ortamında) yapılan standart mikrobiyolojik analizlerde maya ve küfler için selektif katı besiyeri olarak kullanılmıştır. Bileşimdeki karbohidrat ve patates infüzyon maya ve küf gelişimini desteklerken, düşük pH, bakteri gelişimini baskılamıştır. Küfler bu besiyerinde tipik morfolojilerini göstererek gelişmiştir.

25⁰C'de 7-10 günlük inkübasyondan sonra elde edilen fungus kültürlerimiz her 3 haftada bir ekim yapılarak yatık Potato Dextrose Agar besiyerlerine transfer edilmiştir. Stok fungus kültürleri çalışmalarda kullanılmak üzere +4 ⁰C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.2. DNA Barkodlama

3.2.1. DNA İzolasyonu

Örneğimiz oda sıcaklığında (15–25°C) dengelenmiştir. Su banyosunu ısıtılmıştır. DNA izolasyonu yapılacak olan örneğin üzerine 20 µl proteinaz K ekleyerek vorteksle karıştırılmıştır ve doku temizlenene kadar 56°C'de inkübe edilmiştir. Numuneyi dağıtmak için inkübasyon sırasında ara sıra vortekslenmiştir. Numuneye 200 µl Liziz tamponu (ATL) ekledikten sonra, 15 sn darbeli vorteksle karıştırılmıştır ve su banyosunda 70°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Çıkardıktan sonra mikrosantrifüj tüpünü kısaca santrifüjlenmiştir. Numuneye 200 µl etanol (%96–100) ekledikten sonra vorteks ile karıştırılmıştır. 15 saniye karıştırdıktan sonra, 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünü santrifüjlenilmiştir. Karışım ticari kit kolonuna eklenmiştir. Kapağı kapatılmıştır ve 6000 x g'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüjlenilmiştir. Kolonun alt kısmını yenisi ile değiştirilmiştir. Kitimizin kolonunu dikkatlice açılmış ve 500 µl Birinci yıkama tamponu (AW1) eklenmiştir. Kapağı kapatılmış ve 6000 x g'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüjlenilmiştir. Kitimizin kolonunu dikkatlice tekrar açtıktan sonra 500 µl İkinci

yıkama tamponu (AW2) eklenmiştir. Kapağı kapatılmış ve tam hızda santrifüj edin (20.000 x g; 14.000 rpm) 3 dk. Kitimizin kolonunu yeni bir 2 ml'lik ependorf tüpüne yerleştirilmiştir süzüntüyle birlikte eski toplama tüpünü atılmıştır. Kitimizin kolonunu temiz bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve süzüntüyü içeren toplama tüpü atılmıştır. Kitimizin kolonuna 200 µl Elüsyon tamponu (AE) eklenmiştir. 1 dakika oda sıcaklığında bekletilerek ve ardından 6000 x g'de (8000 rpm) santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra ependorf tüpüne indirilen DNA -20 C 'de saklanmıştır.



Şekil 3.1. DNA izolasyonu

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR)

DNA barkodlaması yapılacak bölgeler için kullanılacak primer dizileri ilgili bilgi literatürlerden alınmıştır (Çizelge 3.1). 25 µl PCR karışımı için 0.1 hacimde 10x High-Fidelity Tampon, 0.5 µl 2.75 mM dNTP 2 µl 11 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 µM primer, 0.1 µl 5 ünite High-Fidelity polimeraz, 17.90 µl nükleaz içermeyen ultra saf su ve 1µl (~50 ng µl-1) genomik DNA kullanılmıştır. PCR işlemi Sensoquest Lab Cycler model cihazda, 95 oC 5 dakika ilk denatürasyonu takiben, 35 döngü 95 oC'de 1 dakika denatürasyon, 55oC 1 dakika bağlanma ve 72 oC'de 1 dakika uzama adımları uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 72 oC'de 10 dakika son uzama ile tamamlanmıştır. Kurumumuzda DNA dizileme sistemi bulunmadığı için bu işlem hizmvdımı yoluyla için Macrogen Inc. (Hollanda) firmasında, ABI 3100 Genetic

Analyzer cihazında, her iki yöndeki primerler kullanılarak çift yönlü okuma şeklinde yapılmıştır.

Çizelge 3.1. DNA barkodlaması yapılan bölgeler için primer dizileri

Barkod	Primer dizisi (5'-3')	Kaynak
ITS	ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White vd., 1990
	ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC	White vd., 1990



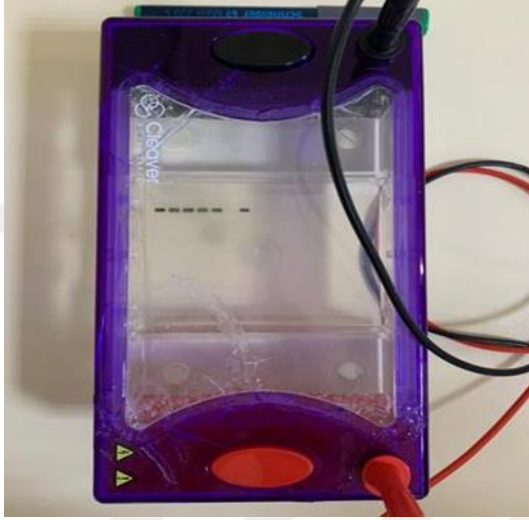
Şekil 3.2. PCR'a örneklerin yüklenmesi



Şekil 3.3. PCR'da yürütme işlemi

3.2.3. Agaroz jel elektroforezi

PCR ürünleri %1'lik 0.5 µg/ml ethidium bromide içeren agaroz jelde (0.5 X TBE tampon) koşturulmuştur. Yaklaşık 5 µl PCR ürünü jel yükleme boyası ile birlikte karıştırılarak jele yüklenmiş ve 100 voltta 1 saat boyunca koşturulmuştur. Elektroforez işleminin ardından jel görüntüleme sisteminde UV ışık altında incelenmiştir.



Şekil 3.4. Agaroz Jel elektroforezi koşturulması

3.3. ITS-rDNA Gen Bölgesinin Analizi

ITS-rDNA sekanslama hizmetimi ile yapılmıştır (Macrogen Hollanda). ABI PRISM BigDye™ FS, *AmpliTaqr* DNA Polimeraz içeren Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit kullanılarak PE Applied Biosystems tarafından önerilen protokole göre hizmetimi yolu ile yaptırılmıştır.

3.3.1. Biyoinformatik ve Filogenetik Çalışmalar

Filogenetik, canlı gruplarının evrimsel ilişkilerini ortaya çıkarmak için ataları ve soyundan gelenleri takip eden bir yöntemdir. Canlıların dâhil olduğu moleküler süreçlerin benzerliği, aynı atadan evrimleştiklerini gösterir. Bu nedenle, türler arasındaki ilişkiler, ortak ataların varlığına dayandırılabilir (Xiong, 2006).

Çalışmada elde edilen her bir ITS nükleotid dizisi için biyoinformatik çalışmalar Geneious R8 (Kearse vd., 2012) ve MEGA-X (Kumar vd., 2018) yazılımları ile gerçekleştirilmiştir. Primerlerin çift yönlü okumaların kalite puanları değerlendirilmesinin ardından primer bağlanma bölgeleri kesilerek, her iki yöndeki okumalar birleştirilerek karar dizisi oluşturulmuştur. NCBI nükleotid veri tabanında

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) analizi yapılarak doğru bölgenin çoğaltıldığı ve dizilendiği onaylanmıştır. Aynı yazılım kullanılarak barkod bölgeleri homolog diziler ile karşılaştırılarak belirlenmiş ve etiketlenmiştir.

Filogenetik çalışmalar için BLAST sonuçlarında %90 ve üzerinde benzerlik gösteren *Aspergillus niger* dizileri (GenBank erişim numaraları: AY704975, KU697373, KU697369, AY364882, KT318277, AY699977, KU931686, KU697371, KF499511, KU931698, AY364869, KU931697) ve filogenetik çalışmalarda dış grup olarak kullanılmak üzere bir adet dizi (DQ022894) NCBI veri tabanından indirilmiştir. Dizilerin hizalanması ClustalW algoritması (Larkin vd., 2007) varsayılan ayarları ile yapılmıştır. Filogenetik ağaçlar PAUP 4.0a164 (Swofford, 2003) yazılımında Maximum Parsimony (MP) sezgisel arama (Heuristic Search: 1000 rastgele tekrar edilerek, her bir adımda bir ağaç tutularak, boşluklar göz ardı edilerek) yöntemi ile elde edilmiştir. Tree-bisection-reconnection (TBR) yöntemi, dalların yeniden düzenlenmesi için kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1.Genetik Kaynak Survey Çalışması

Çalışmada *Aspergillus niger* yerli fungus izolatu olan G 2-1 (Afyon-Gazlıgöl) kullanıldı. Afyon iline ait ilçe, köy ve kırsal alanlara yapılan ziyaretlerde genetik kaynağa ait suvey çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.2. Fungus izolatlarının üretimi, çoğaltımı ve muhafazası

4.2.1. *Aspergillus niger* G2-1 izolatının çoğaltılması

Ülkemizin değerli sıcak su kaplıcalarından olan Afyon Gazlıgöl bölgesinden alınan örneklerimiz en yüksek amilaz enzimi değeri göstermiştir. Bu örneği izole edilen örneklerimiz çoğaltımı amacıyla izolatımızın stok kültürlerini zenginleştirmesi ve sürekliliği sağlaması için Potato Dextrose Agar (PDA) katı besiyeri ortamı kullanılmıştır.

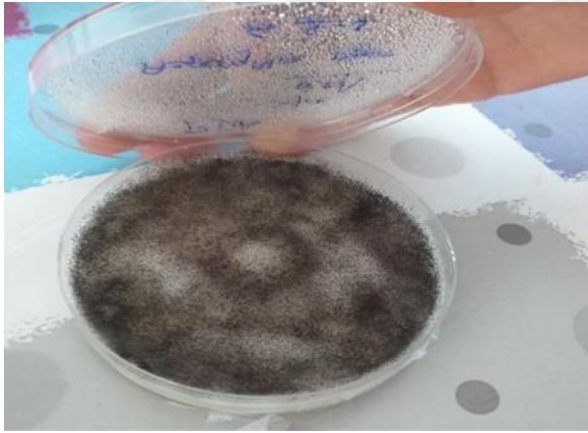


Şekil 4.1. *Aspergillus niger* G2-1 izolatının örnekleri



Şekil 4.2. *Aspergillus niger* G2-1 izolatının çoğaltılması

Petri kabındaki örneğimizi çoğaltım işlemini steril kabinde fungus örneklerimize zarar vermeden ve ortamdaki bulaşma olmaması için dikkatli bir şekilde 5 farklı petri kabından yatık besiyerine çoğaltımı yapılmıştır.



Şekil 4.3. *Aspergillus niger* G2-1 izolatının çoğaltılmış örneği

4.2.2. *Aspergillus niger* G 2-1 izolatının muhafazası

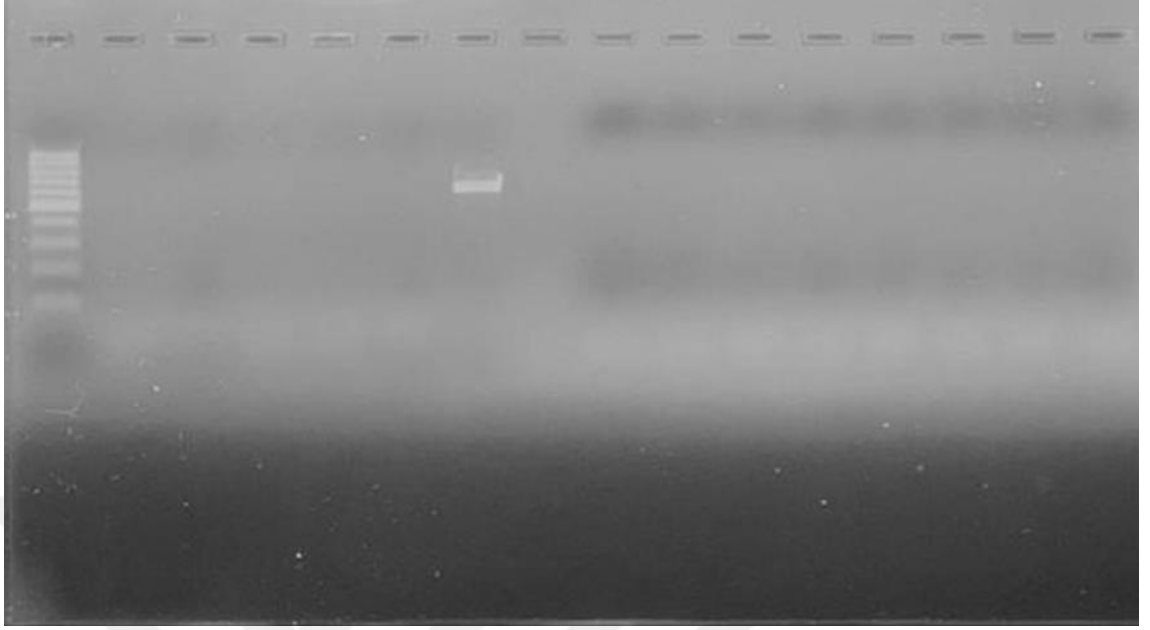
25 °C’de 7-10 gün boyunca inkübatörde inkübe edilmesinin ardından fungus kültürlerimiz elde edilmiştir. 3 haftada bir besiyerine transfer edilen fungus izolatlarımız ekim yapılarak çoğaltılmıştır. Stok *Aspergillus niger* fungus kültürlerimiz +4 C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

4.3. DNA Barkodlama

4.3.1 DNA Barkodlama Analizleri

Aspergillus niger fungusuna ait total DNA, proje önerisinde verilen protokol takip edilerek, proje raporumuzun Materyal ve Yöntem Bölümü'nde belirtildiği şekilde ekstrakte edilmiştir. Qubit ölçümlerine göre 255 ng μL^{-1} konsantrasyonda DNA elde edildiği tespit edilmiştir. Elde edilen DNA ile evrensel DNA barkod bölgeleri olan ITS bölgelerine ait amplikonlar (çoğaltılan gen ürünü), çoğaltılacak fungusa özgü primer kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile başarılı bir şekilde elde edilmiştir. Elde edilen amplikonlar agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilerek, ürünlerin beklenen boyutlarda oldukları ve spesifik amplikonların elde edildiği teyit edilmiştir (Şekil 4.4). DNA dizileme işleminden sonra ab1 formatındaki veri dosyaları Geneious R8 yazılımı içerisine aktarılmış, primer bağlanma noktaları ve düşük kaliteli okunan bölgeler kesilmiş, çift yönlü okumalar üst üste bindirilerek karar dizileri oluşturulmuştur. Karar dizilerinin istenen bitkiye ait olduğu National Center for Biotechnology Information (NCBI) dahilindeki BLASTn aracı kullanılarak doğrulanmıştır. Bu işlemlerin ardından *Aspergillus niger* fungusuna ait DNA barkodlarının elde edilmesi tamamlanmıştır (Çizelge 4.4.).

Aspergillus niger fungusuna ait ITS, DNA barkod bölgelerine ait amplikonlarının agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü. M: DNA boy markırı olup bantlar 100'er bç boyutundadır. Her bir barkod bölgesi için iki tekrarlı PCR kurulmuştur. Agaroz %2, 50 V, 60 dk. (Şekil 4.4.).

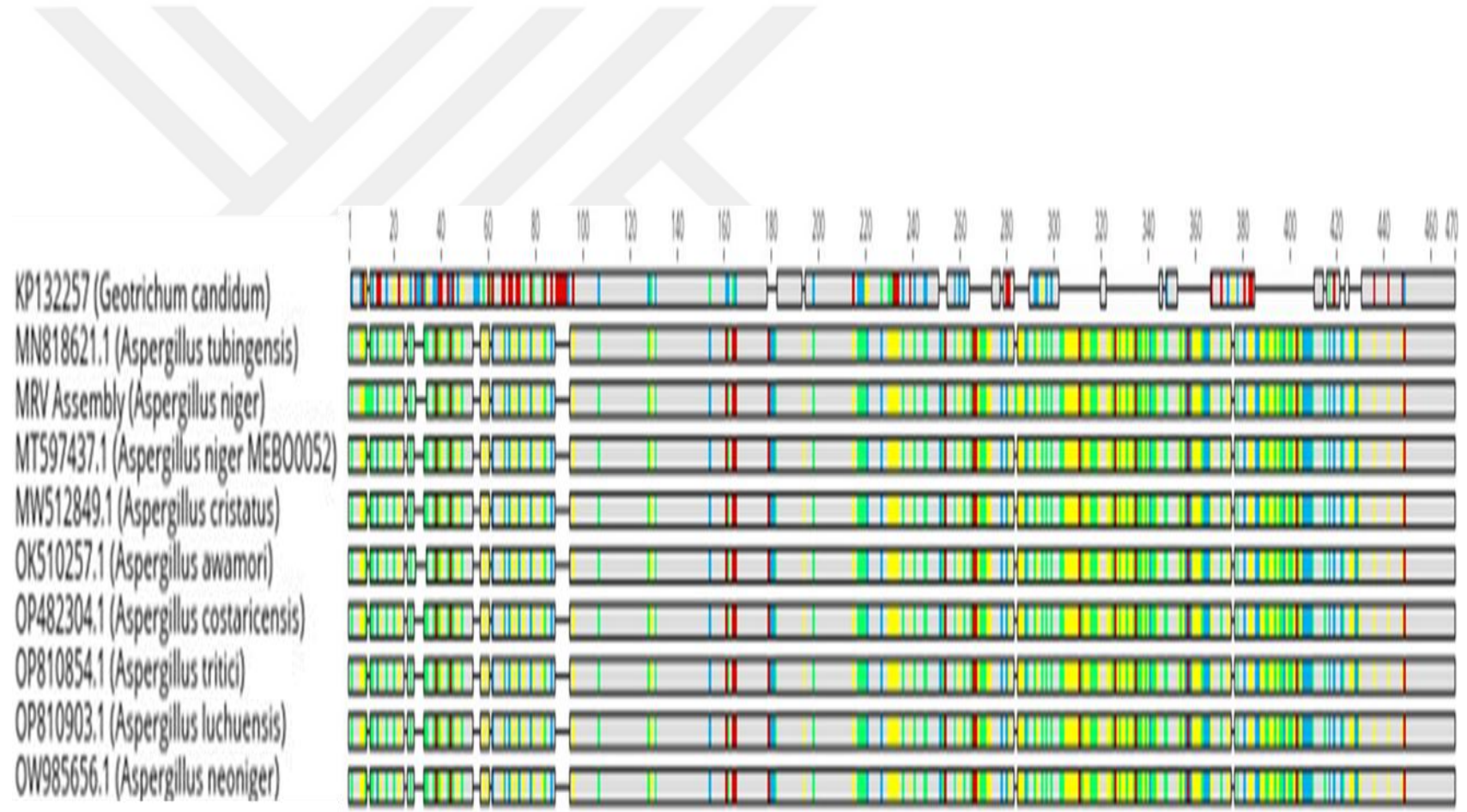


Şekil 4.4. *Aspergillus niger* fungusuna ait ITS, DNA barkod bölgelerine ait amplikonlarının agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü

4.3.2.Biyoenformatik bulgular

Aspergillus niger türüne ait ITS bölgesi için PZR ürünlerinin boyutunun yaklaşık 470 bp olduğu tespit edilmiştir. Diziler Geneious R8 yazılımı içerisine alınarak primer bağlanma noktaları kesilmiş, üst üste bindirilmiş ve karar dizisi uzunluğunun 450 bp olduğu belirlenmiştir ve GenBank veri tabanına MEBP0052 erişim numarası ile kaydedilmiştir.

Hizalama işleminden sonra tüm dizilerin uzunlukları indel (insersiyon ve delesyon) alanları ile birlikte toplam 470 bp olmuştur.

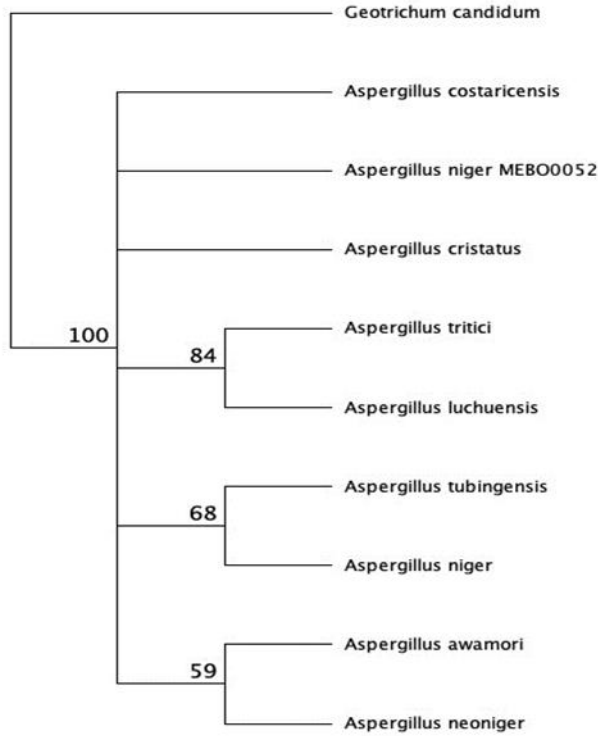


Şekil 4.5. *Aspergillus niger* fungusuna ait DNA hizalaması

4.3.3. Filogenetik bulgular

ITS bölgesi elemanlarının filogenetik bilgi sağlama potansiyelini değerlendirmek için, her bir ITS parçası ve tam ITS bölgesi için ayrı ayrı filogenetik ağaçlar çizilmiş ve bunlar karşılaştırılmıştır.

ITS dizisi kullanılarak çizilen filogenetik ağaç, yüksek destek değerlerine sahip iki temel klad içermektedir. Bu destek değerleri, Bootstrap istatistiği ile hesaplanmıştır ve ağaç topolojisi için güvenilir bir şekilde doğrulanmıştır. (Şekil 4.6.). *Aspergillus tubigensis* ve *Aspergillus niger* türleri, GenBank veri tabanından elde edilen veriler ile tarafımızdan dizilen örneklerin filogenetik ağaçta aynı dalda yer aldığı görülmüştür. Ancak, bu iki örneğin arasında farklı tek nükleotit polimorfizmleri (SNP) bulunduğundan dolayı, ağacın yapısını destekleyen Bootstrap istatistik değeri %68 olarak hesaplanmıştır. Yalnızca ITS1 bölgesinin kullanıldığı filogenetik ağaç, komple ITS bölgesini kullanarak çizilen ağaca oldukça benzerlik göstermektedir. (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. *Aspergillus niger* fungusuna ait filogenetik ağaç

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ülkemizde farklı endüstri sektörlerinde kullanılmak üzere ithal edilen fungal enzimleri her yıl yüksek maliyetlerle temin edilmektedir. Bu nedenle, yerli ve milli enzim üretimi için Ar-Ge çalışmaları yapılarak laboratuvar ortamından endüstriyel ölçeğe geçiş yapmak amaçlanmıştır. Bu tez çalışması, yerli enzim üretimine katkı sağlamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Böylece, ülkemizdeki endüstriyel sektörlere yönelik yerli kaynakların kullanımının artırılması hedeflenmiştir.

Enzimler hakkındaki bilgiler eskilere dayansa da günümüzde bu bilgilere dayanarak laboratuvar ölçeğinden başlayarak pilot ve endüstriyel ölçeklere kadar enzim üretimi büyük önem kazanmıştır. Özellikle mezofilik, termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalarda bulunan amilolitik enzimlerin karakterizasyonu, biyoteknolojik potansiyelleri ve termostabilite çalışmaları için önemli bir model olmaktadır. Bu nedenle, amilaz enzimine olan ilgi giderek artmakta ve ülkemizde gelişen gıda endüstrisi de bu alana odaklanmaktadır.

Bu çalışmada Afyon, Eskişehir, Uşak ve Ankara ili termal alanlarından elde edilen toprak ve su örneklerinden izole edilen yerli fungus izolatlarından en yüksek amilaz aktivitesi gösteren *Aspergillus niger* G 2-1 izolatının DNA Barkodlaması gerçekleştirilmiştir. DNA barkodlama ile amilaz enzimi üreten yerli fungus izolatlarının ITS, barkod bölgesine ait DNA dizileri ortaya çıkarılmış ve *Aspergillus niger*'e özgü DNA barkodları elde edilmiştir. Böylece amilaz enzimi üreten *Aspergillus niger* fungusunun moleküler genetik analizleri yapılmıştır. Endüstri pazarında Ar-Ge ürünü konusunda hem tüketicinin bilgilendirilmesinin sağlanması hem de üretici ürününün orijinalliğinin ispatlanması düşünülmüştür.

Bu tez çalışması ile:

Yerli fungus izolatımız olan *Aspergillus niger* G 2-1'in DNA barkodu ilk kez ortaya çıkarılmış, *Aspergillus niger*'e özgü DNA dizisi elde edilmiştir.

Mikrobiyal gen bankalarına genetik materyal oluşturulmuştur,

Yerli fungus izolatından patente konu yerli enzim üretiminin arttırılmasına yönelik çalışmalara altlık oluşturulmuştur

Uygulanan metodoloji ile Biyoekonominin itici gücü olan Endüstriyel Biyoteknoloji bilim dünyasına ve literatüre katkı sağlanmıştır.

Ayrıca bu yüksek lisans tezi ile yerli ve milli mikrobiyal genetik kaynak havuzuna, genetik kaynaklar veri tabanına veri sağlanması planlanmıştır.

Çizelge 5.1. *Aspergillus niger* fungusuna ait FASTA formatındaki DNA barkodları

>MRV Assembly

CCCCGGGCCCCGTGCCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGC
GTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATC
TCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTG
AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCT
GGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGG
CTTGTGTGTTCCGGTCCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCCGAAAGG
CAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACATGCT
CTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTT
GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATA

KAYNAKLAR

- Awla,F.M.,Özdemir,K.,Ertas,M.,(2017).**Irak-Erbilden Alınan Bazı Toprak Numunelerinden Streptomyces Bakterilerinin İzolasyonu, Ekstraselüler Hidrolitik Enzim Kabiliyetlerinin Belirlenmesi ve 16S r DNA Analizi.**
- Badotti, F., de Oliveira, F. S., Garcia, C. F., Vaz, A. B. M., Fonseca, P. L. C., Nahum, L. A., Oliveira, G., & Góes-Neto, A. (2017). Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). *BMC Microbiology*, 17, 42-53.
- Batur.L.K.,Aygan.A.,(2015).Kahramanmaraş Topraklarından İzole Edilen Bacillus sp. Tarafından Alfa-Amilaz Üretimi ve Karakterizasyonu. *Karaelmas Fen ve Müh. Derg.* 5(2):68-74, 2015.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Wheeler, D. L., 2004. GenBank: update. *Nucleic Acids Res.* 32, D23 – D26.
- Chaudhary, D. K., & Dahal, R. H. (2017). DNA barcode for identification of microbial communities: a mini review. *EC Microbiology*, 7, 219-224.
- Cowan D., (1996). *Industrial enzyme technology*, TIBTECH, 14, 177-178.
- Crous, P. W., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., & Samson, R. A. (2009). *Fungal Biodiversity. CBS Laboratory Manual Series 1*. Centraal bureau voor Schimmel cultures: Utrecht. p. 269.
- Çetin ET., (1983). *Endüstriyel mikrobiyoloji*, İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı, Bayda Yayın, I. baskı, 2, 145-146.
- Danesh Rezaee Y., Demir S., (2020). *Using DNA Barcoding in Fungal Taxonomy. Soil, Fertilizer and Water Resources Central Research Institute, Ankara-Turkey Department of Plant Protection*, Faculty of Agriculture, Van Yüzüncü Yıl University, Turkey
- Das, S., & Deb, B. (2015). DNA barcoding of fungi using Ribosomal ITS Marker for genetic diversity analysis: A Review. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 3(3), 160-167.

- Deveci.E.Ü.,(2008). *Portakal Atıklarından Aspergillus niger Filamentli Fungusu Kullanılarak Sitrik Asit Üretiminde Değerlendirilmesi*. Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Ana Bilim Dalı.
- Frézal, L., & Leblois, R. (2008). Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infection Genetics and Evolution*, 8, 727 –736.
- Fujiwara S., (2002). Extremophiles: Developments of their special functions and potential resource, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(6), 518-525.
- Gosavi, M. C. (2016). Applications of DNA bar coding in molecular systematics of fungi: A review. *International Journal of Life Sciences*, A7, 111-115.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci* 270:313–321.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003) Barcoding animal life: Cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci* 270(Suppl1):S96–S99.
- Hürkan K (2017). Karasal bitkilerde DNA barkodlama: Bazı DNA barkod bölgelerinin incelenmesi. *International Journal of Innovative Approaches in Science Research*, 1(1), 57-67.
- Hürkan K (2020). *Bitkisel Ürünlerin Güvenirliğinin Belirlenmesine Kullanılan Bazı Modern Moleküler Biyoloji Yöntemleri*. In K. Hürkan (Ed.), Tarımsal ve Endüstriyel Biyoteknoloji Uygulamaları - Biyoekonomi. Ankara, Türkiye; IKSAD Publishing House. ISBN: 9786257914987.
- Kanz, C., Aldebert, P., Althorpe, N., Baker, W., Baldwin, A., Bates, K., Browne, P., van den Broek, A., Castro, M. and other authors 2005. The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Res* 33, D29–D33.
- Keskin,Ş. (2015). *Termofilik Geobacillus sp. TF14'ten Endüstriyel Öneme Sahip α -Amilazın Saflaştırılması, İmmobilizasyonu Ve Karakterizasyonu*. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı.

- Lane, D. J., 1991. **16S/23S rRNA sequencing. In Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**, pp. 115–175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. New York: Wiley.
- Leveque E, Janecek S, Haye B. & Belarbi A (2000). Thermophilic archaeal amylolytic enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, 26, 3–14.
- Mahmoud, A. G. Y., & Zaher, E. H. F. (2015). Why nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) has been selected as the DNA barcode for fungi? **Advancement in Genetic Engineering**, 4, 119-120.
- Miller GL, (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal Chem, 31,426-8. **National Center for Biotechnology Information**.
- Nguyen QD, Rezessy-Szabo JM, Claeysens M, Stals I, & Hoschke A (2002). Purification and characterization of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme and Microbial Technology**, 3, 345–352.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., & Levesque, C. A. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 109, 6241–6246.
- Schoch,C.,Seifert,Kç.,Hundorf,S.,Robert,V.,Spouge,John.,Levesque,C.,Chen,W.,and Fungal Barcoding Consortium.(2012). **Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi**.
- Singh R, Kumar V, Kapoor V, (2014). Partial Purification and Characterization of a Heat Stable alfa-Amylase from a Thermophilic Actinobacteria *Streptomyces* sp. MSC702, **Enzyme Research**, 2014, 1-8
- Taylor JW, vd. (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi.**Fungal Genet Biol** 31:21–32.
- Uçar.A.,(2011). **Aspergillus sp. Tarafından üretilen amilaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu**. T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı BİY-YL-2011-0002.

- Ünal A (2020). *Endüstriyel Biyoteknoloji Uygulamaları ve Biyoekonomi*. In K. Hürkan (Ed.), Tarımsal ve Endüstriyel Biyoteknoloji Uygulamaları Biyoekonomi. Ankara, Türkiye; IKSAD Publishing House. ISBN: 9786257914987.
- Ünal A, Subaşı S A, Malkoç S, Ocak İ, Korcan S.E, Koçak Y E, Yurdugül S, Yaman H, Şanal T, Keçeli A, (2022). Potential of Fungal Thermostable Alpha Amylase Enzyme Isolated from Hot Springs of Central Anatolia (Turkey) in Wheat Bread Quality. *Food Bioscience*. 45, 101-492.
- White TJ, Bruns TD, Lee S and Taylor JW (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. MA. Innis, DH. Gelfand, J.J. Sninsky ve T. J. White (Ed.), PCR protocols: A guide to methods and applications (p. 315–322). *San-Diego: Academic Press*.
- Xu J. (2016). *Fungal DNA Barcoding*. *Genome* 59: 913–932. Published by NRC Research Press. <https://cdnsiencepub.com/doi/10.1139/gen-2016-0046>
- Xu, J. (2016). *Fungal DNA barcoding*. *Genome*, 59, 913-932.
- Yahr, R., Schoch, C. L., & Dentinger, B. T. M. (2016). Scaling up discovery of hidden diversity in fungi: impacts of barcoding approaches. *Philosophical Transactions Royal Society B*, 371, 20150336.
- Yaraş,A. (2011). *Bacillus Amyloliquefaciens'den Soya Küspesi Kullanılarak α -Amilaz Üretiminin incelenmesi*.