

ABSTRACT

The fungi have various abilities to produce amylases. However, amylase production may be regulated by carbon catabolite repression (CCR) which is induced by glucose as an end-product of starch hydrolysis by amylases, this generally has an impact on amylase production. CCR is a biological system that naturally regulates the energy balance in microorganisms. However, the CCR system is undesirable in the production of amylase. Identifying the genes involved in the CCR and their expression mechanism are necessary to understand the CCR in the strain. Fungi so that enzyme production is not disturbed. This study aimed to analyze the production of alpha-amylase and glucoamylase in several Indigenous Indonesia fungi, the presence of CCR in the strains, and analyse the CCR involved by genomic and transcriptomic analysis. Nine strains of fungi were grown in solid and liquid media using starch as a carbon source and glucose as a repressor (0%, 1%, 3%, and 5%). The activity of alpha-amylase and glucoamylase and the level of repression by glucose have been assessed. The CCR present in the strain was analysed by identifying the presence of regulatory genes and their expression using genomic and transcriptomic analysis. All strains examined produced alpha-amylase and glucoamylase with different levels and showed the repression of enzyme synthesis by glucose, except *Trichoderma asperellum* MLT1J1 was not affected by the presence of glucose up to 5% in producing alpha-amylase and glucoamylase. This strain produced 194,89 Units alpha-amylase and 2,86 Units glucoamylase per 100 mL media. Strain MLT1J1 possessed 7 alpha-amylase genes, 1 glucoamylase gene, 18 transcription factor genes, and genes involved in the carbon catabolite repression consist of 1 *creA* gene, 3 *creB* genes, 1 *creC* gene, and 1 *creD* gene. Further analysis showed that 2 of the 7 alpha-amylase genes had complete transcription binding sites. The expression of the amylase gene confirmed the results of the genomic analysis, which showed that there were two alpha-amylase gene expressions (2.12 TPM and 0.05 TPM) and 1 glucoamylase gene expression (20.94 TPM). Alpha amylase and glucoamylase gene expression did not significantly decrease when grown in media added with 5% glucose. Although the expression of alpha-amylase and glucoamylase was not affected by the presence of 5% glucose in the growth medium, however, all CCR genes were expressed. The analysis of CCR genes by alignment with existing CCR genes showed that the *creA* gene sequence found a natural mutation at the binding site to the promoter site. It was concluded that the production of alpha-amylase and glucoamylase by *Trichoderma asperellum* MLT1J1 was not affected by glucose as a repressor probably due to the mutations at the binding site of the *creA* gene. So that this fungus has the potential to produce sustainable amylase.

Keywords: Alpha amylase, glucoamylase, carbon catabolite repression

ABSTRAK

Kemampuan jamur untuk memproduksi amilase berbeda-beda. Namun produksi amilase dipengaruhi oleh *carbon catabolite repression* (CCR) melalui keberadaan glukosa yang merupakan produk akhir dari hidrolisis pati yang umumnya memiliki dampak terhadap produksi amilase. CCR merupakan sistem biologis yang secara alami mengatur keseimbangan energi dalam suatu mikroorganisme. Namun, sistem CCR tidak diharapkan dalam produksi amilase. Identifikasi gen yang terlibat dalam CCR dan mekanisme ekspresinya penting untuk dipahami dalam strain jamur sehingga produksi enzim tidak terganggu. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis produksi alfa amilase dan glukoamilase dalam beberapa jamur lokal, keberadaan CCR dalam strain dan analisis CCR berupa analisis genomik dan transkriptomik. 9 strain jamur ditumbuhkan dalam media padat dan cair dengan menggunakan pati sebagai sumber karbon dan glukosa sebagai represor dengan konsentrasi 0%, 1%, 3%, dan 5%. Pengujian aktivitas alfa amilase dan glukoamilase dan tingkat represi oleh glukosa telah dilakukan. CCR yang ada didalam strain dianalisis melalui identifikasi keberadaan gen regulator dan ekspresinya menggunakan analisis genomik dan transkriptomik. Semua strain yang diuji menghasilkan alfa amilase dan glukoamilase dalam jumlah yang berbeda dan menunjukkan represi sintesis enzim oleh glukosa kecuali *Trichoderma asprellum* MLT1J1 yang tidak dipengaruhi oleh keberadaan glukosa hingga konsentrasi 5% dalam memproduksi alfa amilase dan glukoamilase. Strain ini memproduksi 194,89 Unit alfa amilase dan 2,86 Unit glukoamilase dalam 100 mL media. Strain MLT1J1 memiliki 7 gen alfa amilase, 1 gen glukoamilase, 18 gen faktor transkripsi, dan gen yang terlibat dalam represi katabolit karbon terdiri dari 1 gen *creA*, 3 gen *creB*, 1 gen *creC* dan 1 gen *creD*. Analisis lanjutan menunjukkan bahwa 2 dari 7 gen alfa amilase memiliki lokasi pengikatan transkripsi yang lengkap. Ekspresi gen amilase mengkonfirmasi hasil dalam analisis genomik yang menunjukkan bahwa ada 2 ekspresi gen alfa amilase (2,12 TPM dan 0,05 TPM) dan 1 ekspresi gen glukoamilase (20,94 TPM). Ekspresi gen alfa amilase dan glukoamilase tidak signifikan menurun saat ditumbuhkan di media yang ditambahkan 5% glukosa. Meskipun ekspresi gen alfa amilase dan glukoamilase tidak dipengaruhi oleh keberadaan 5% glukosa semua gen CCR tetap terekspresi. Analisis gen CCR melalui pensejajaran dengan gen CCR yang telah diidentifikasi menunjukkan bahwa sekuen gen *creA* mengalami mutasi alami pada sisi pengikatan hingga sisi promoter. Ini disimpulkan bahwa produksi alfa amilase dan glukoamilase oleh *Trichoderma asprellum* MLT1J1 tidak dipengaruhi oleh glukosa sebagai represor yang mungkin dikarenakan adanya mutasi pada sisi pengikatan dari gen *creA*. Sehingga jamur ini berpotensi sebagai penghasil amilase yang berkelanjutan.

Kata kunci: alfa amilase, glukoamilase, represi karbon katabolit