

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**ANAEROBİK FUNGUSLARIN LİKENAZ ENZİM ÜRETİMİ,
KAREKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK
KULLANILABİLİRLİĞİNİN BELİRLENMESİ, ARAŞTIRILMASI**

Özgür KIRMIZITAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAR

TUNCELİ-2023

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**ANAEROBİK FUNGUSLARIN LİKENAZ ENZİM ÜRETİMİ,
KAREKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK
KULLANILABİLİRLİĞİNİN BELİRLENMESİ, ARAŞTIRILMASI**

Özgür KIRMIZITAŞ

200010023

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAR

TUNCELİ-2023

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**ANAEROBİK FUNGUSLARIN LİKENAZ ENZİM ÜRETİMİ,
KAREKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK
KULLANILABİLİRLİĞİNİN BELİRLENMESİ, ARAŞTIRILMASI**

**Özgür KIRMIZITAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 13/01/2023 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

İmza:.....

Doç. Dr. Ahmet Yusuf
ŞENGÜL
(Bingöl Üniversitesi)

BAŞKAN

İmza:.....

Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAR
(Munzur Üniversitesi)

DANIŞMAN

İmza:.....

Dr. Öğr. Üyesi Altuğ
KARAMAN
(Munzur Üniversitesi)

ÜYE

Bu tez, Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Doç. Dr. Murat KORUNUR
Enstitü Müdürü

Bu çalışma, Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: YLMUB022-07

NOT: Bu seminerde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı “Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu” ndaki hükümlere tabidir.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Özgür KIRMZITAŞ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAR

TEŞEKKÜR

Uzman tavsiyesi ve teşviki olmadan bu yola çıkamayacağım, tezimin konusunun belirlenmesinde, araştırma aşamasında, yön tayininde ve tamamlanmasında destek olan değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Dr.Öğrt. Üyesi Bülent KAR'a bana ayırdığı değerli zamanı ve sağladığı destek için minnettarım. Tezimin başlangıcından bitimine kadar bana inanan, ihtiyacım olduğu her an telefon mesafesinde olan hiç sıkılmadan sabırla cevaplar veren benden yardımlarını hiç esirgemeyen, Biyoloji Laboratuvarı'ndaki bütün imkânlarını sağlayan, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Altuğ KARAMAN'a ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ferit Can YAZDIÇ'a teşekkürlerimi sunmaktan büyük mutluluk duyuyorum.

Sonunda sevgili eşime ve canım oğluma teşekkür etmek için bu fırsatı değerlendirmek istedim. Gösterdikleri sabır ve destekleri için Eşim Deniz Mesude KIRMIZITAŞ'a ve oğlum Ege KIRMIZITAŞ'a çok teşekkür ederim.

Özgür KIRMIZITAŞ
TUNCELİ-2023

İÇİNDEKİLER

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	IX
TABLolar LİSTESİ	X
SEMBOLLER LİSTESİ	XI
KISALTMALAR LİSTESİ	XII
ÖZET	XIII
ABSTRACT	XIV
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Rumenin Yapısı	1
1.2. Rumen mikroorganizmaları	1
1.2.1.Rumen Bakterileri	2
1.2.2.Rumen Arkeleri	2
1.2.3. Rumen Protozoaları	3
1.2.4.Rumen Bakteriyofajları	3
1.2.5. Rumen Mikoplazmaları	3
1.2.6. Rumen Fungusları	4
1.3. Rumen Funguslarının Tarihçesi	4
1.4. Rumen Funguslarının Özellikleri	4
1.4.1. Morfolojileri	4
1.4.2. Üreme ve Gelişmesi	4
1.5. Rumen Funguslarının Sınıflandırılması	5
1.5.1. Rumen Fungus Cinsleri ve Özellikleri	7
1.5.1.1. <i>Caecomyces</i> sp.....	7
1.5.1.2. <i>Neocallimastix</i> sp.....	7
1.5.1.3. <i>Piromyces</i> sp.....	7
1.5.1.4. <i>Orpinomyces</i> sp.	7
1.5.1. 5. <i>Anaeromyces</i> sp.	8
1.5.1. 6. <i>Cyllamyces</i> sp.	8
1.5.1.7. <i>Feramyces</i> sp.	8
1.5.1.8. <i>Pecaromyces</i> sp.	8

1.5.1. 9. <i>Oontomyces</i> sp.....	8
1.5.1. 10. <i>Buwchfawromyces</i> sp.....	9
1.5.1.11. <i>Liebetanzomyces</i> sp.	9
1.5.1.12. <i>Ghazallomyces</i> sp.	9
1.5.1. 13. <i>Aklioshbomyces</i> sp.....	9
1.5.1.14. <i>Agriosmyces</i> sp.	10
1.5.1.15. <i>Capellomyces</i> sp.	10
1.5.1.16. <i>Joblinomyces</i> sp.....	10
1.5.1.17. <i>Khoyollomyces</i> sp.	10
1.5.1.18. <i>Tahromyces</i> sp.	10
1.5.1.19. <i>Aestipascumyces</i> sp.	10
1.5.1.20. <i>Paucimyces</i> sp.	11
2. TEZİN AMACI VE ÖNEMİ	17
3. MATERYAL VE METOT	18
3.1. Materyal.....	18
3.1.1.Kullanılan Kimyasalar.....	18
3.2. Metot.....	18
3.2.1. Örneklerinin Toplanması ve Saklanması.....	18
3.2.2. Rumen Sıvısının Hazırlanması	18
3.2.3. Anaerobik Besiyeri ve Özelliği	19
3.2.4. Dışkıdan Rumen Fungus İzolasyonu ve İnkübasyonu	20
3.2.5. Rumen Funguslarının Safılaştırılması ve Alt Kültüre Alınması	20
3.2.6. Antibiyotik.....	20
3.2.7. Rumen Funguslarının Cins Düzeyinde Tanımlanması.....	21
3.3. Enzim Analizleri.....	21
3.3.1. Enzim Ekstratlarının Hazırlanması.....	21
3.3.2. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	22
3.3.3. Enzimin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi	22
3.3.4. Enzimin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi.....	22
3.3.5. Enzimin Termal Stabilesinin Belirlenmesi.....	22
3.4. Protein Tayini	23
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	24
4.1. Bulgular	24

4.1.1. Rumen fungusların aktifleştirilmesi ve kültüre Alınması.....	24
4.1.2. <i>Piromyces</i> sp. izolatına ait likenaz enzim üretimi ve karakterizasyonu	24
4.1.2.1. <i>Piromyces</i> sp. izolatına ait likenaz enziminin optimum sıcaklığın belirlenmesi...	25
4.1.2.2. <i>Piromyces</i> sp. izolatına ait likenaz enziminin termal stabilitesinin belirlenmesi ..	27
4.1.2.3. <i>Piromyces</i> sp. izolatına ait likenaz enziminin optimum pH'ın belirlenmesi	27
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	30
6. KAYNAKLAR.....	31
ÖZGEÇMİŞ	39



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Rumen funguslarında üreme ve gelişme (Gruninger ve ark.,2014; Karaman, 2018).....	5
Şekil 1.2. Rumen fungusun <i>in vitro</i> ortamda bitkisel materyal üzerine kolonizasyonu.....	12
Şekil 3.1. Farklı yoğunluklarda Bovim Serum Albumin (BSA) kullanılmış ve regrasyon grafiği.....	23
Şekil 4.1. <i>Piromyces</i> sp. izolatına ait likenaz enziminin farklı sıcaklıklardaki süpernatant (HD) ve hücresel (Hİ) spesifik enzim aktivitesi.....	25
Şekil 4.2. <i>Piromyces</i> sp. izolatına ait likenaz enziminin farklı sıcaklıklardaki süpernatant (HD) ve hücresel (Hİ) toplam enzim aktivitesi.....	26
Şekil 4.3. <i>Piromyces</i> sp. izolatına ait likenaz enziminin termal stabilitesi.....	27
Şekil 4.4. <i>Piromyces</i> sp. izolatına ait likenaz enziminin farklı pH aralığındaki süpernatant (HD) ve hücresel (Hİ) spesifik enzim aktivitesi.....	28
Şekil 4.5. <i>Piromyces</i> sp. izolatına ait likenaz enziminin farklı pH aralığındaki süpernatant (HD) ve hücresel (Hİ) toplam enzim aktivitesi.....	29

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Rumen ekosisteminde yayılış gösteren mikroorganizmalar ve bulunma miktarları.....	2
Tablo 1.2. Günümüze kadar cins düzeyinde tanımlanmış rumen fungusları (n=20) ve taksonomik basamaktaki yerleri.....	6
Tablo 3.1. Rumen fungusların <i>in vitro</i> ortamda optimum gelişim gösterdiği besiyeri ve içeriği.....	19
Tablo 3.2. Antibiyotikler ve konsatrasyonları.....	21



SEMBOLLER LİSTESİ

CO₂	: Karbondioksit
CH₄	: Metan
N₂	: Azot
O₂	: Oksijen
H₂	: Hidrojen
H₂S	: Sülfür
α	: Alfa
β	: Beta
NaHCO₃	: Sodyumbikarbonat
K₂HPO₄	: Dipotasyumhidrojenfosfat
NaCl	: Sodyumklorür
(NH₄)₂SO₄	: Amonyumsülfat
CaCl₂	: Kalsiyumklorür
MgSO₄	: Magnezyumsülfat
H₂O	: Su

KISALTMALAR LİSTESİ

AF	: Anaerobik Funguslar
pH	: Potansiyel Hidrojen
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
CWDE	: Hücre Duvarı Parçalayıcı Enzimler
CAZy	: Karbohidrat Aktif Enzimler
DNS	: Dinitrosalisilik Asit
BSA	: Bovim Serum Albumin
MUBAM	: Munzur Üniversitesi Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği
CAZyme	: Karbonhidrat-Aktif Enzim
CFU	: Colony Forming Units
Nm	: Nanometre
Mm	: Milimetre
HCl	: Hidroklorikasit
Atm	: Atmosfer
v/v	: Hacimce Yüzde
Dk	: Dakika
rDNA	: Ribozomal DNA
ml	: Mililitre
g/L	: Gram/Litre
mg/L	: Miligram/Litre
ml/L	: Mililitre/Litre
µg/ml	: Mikrogram/Mililitre
h/h	: Hacimce yüzde
°C	: Celsius
µm	: Mikrometre

ÖZET

Rumen fungusları ruminant canlıların sindirim sisteminde yayılım gösteren ökaryot domain (alan) grubuna ait mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar lignoselülitik-fibrolitik enzim gruplarına sahiptirler. Sahip oldukları bu enzimler günümüzde karbonhidrat aktif enzim (CAZyme) ailesine üye olmakla beraber endüstriyel ve biyoteknolojik alanlarda alternatif enzim kaynakları olarak görev alabilmektedirler. Ek olarak bu mikroorganizmaların anaerobik *in vitro* koşullarda kültüre alınmaları ve halen devam izolasyon çalışmaları sayesinde ilgili canlıların kültür koleksiyonu oluşturma çabalarında oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Bundan dolayı çalışmamızda Tunceli iline ait kırsal bölgelerde yayılım gösteren keçilerin dışkı örneklerinden rumen fungus (*Piromyces* sp. izolatu) izolasyonu gerçekleştirilmiş ve ilgili fungusun sahip olduğu likenaz enziminin *in vitro* ortamda karakterizasyonu sağlanmıştır. MUBAM 4 kültür koleksiyon numarası verilen *Piromyces* sp. izolatu tarafından salgılanan likenaz enziminin çalıştığı optimum sıcaklık değerinin 50°C ve pH değerinin ise 7.0 olduğu tespit edilmiştir. Enzimin optimum çalışma sıcaklığındaki en yüksek spesifik aktivitesi 310,1 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olduğu gözlemlenmiştir. Optimum çalıştığı pH değerinin ise en yüksek spesifik enzim aktivitesi 100,4 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak bulunmuştur. Enzimin optimum çalıştığı sıcaklık değerinde termal stabilitesinin %10 oranında rölatif aktivite kaybına uğradığı da tespit edilmiştir. Sonuç olarak enzimin biyoteknoloji veya endüstriyel alanlarda kullanılması için uygun sıcaklık ve pH değerine sahip olduğu ancak termal stabilitesinde meydana gelen düşüşün önemli olduğu belirtilmiştir.

Anahtar kelimeler: Anaerobik fungus, *Piromyces* sp., Likenaz, Biyoteknoloji

ABSTRACT

**LICHENASE ENZYME PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND
BIOTECHNOLOGICAL AVAILABILITY OF ANAEROBIC FUNGI ISOLATED
FROM MOUNTAIN GOATS IN TUNCELİ**

Rumen fungi are microorganisms belonging to the eukaryote domain group that spread in the digestive tract of ruminant creatures. These microorganisms have lignocellulolytic-fibrolotic enzyme groups. Although these enzymes are members of the carbohydrate active enzyme (CAZyme) family, they can also serve as alternative enzyme sources in industrial and biotechnological fields. In addition, it is known that these microorganisms are cultured in anaerobic *in vitro* conditions and are still very important in the efforts to create a culture collection of related organisms, thanks to the ongoing isolation studies. Therefore, in our study, rumen fungus (*Piromyces* sp.) was isolated from stool samples of goats distributed in rural areas of Tunceli province and the lichenase enzyme of the related fungus was characterized *in vitro*. It was determined that the optimum temperature value at which the lichenase enzyme secreted by the *Piromyces* sp., which is given the MUBAM 4 culture collection number, in which 50°C and the pH value is 7.0. It was observed that the highest specific activity of the enzyme at the optimum operating temperature was 310.1 µmol/min/mg protein. The highest specific enzyme activity was found to be 100.4 µmol/min/mg protein at the optimum pH value. It has also been determined that the thermal stability of the enzyme suffers a relative activity loss of 10% at the optimum operating temperature. As a result, it was stated that the enzyme has a suitable temperature and pH value for use in biotechnology or industrial areas, but the decrease in thermal stability is important.

Keywords: Anaerobic fungus, *Piromyces* sp., Lichenase, Biotechnology

1. GİRİŞ

1.1. Rumenin Yapısı

Ruminantlar, bitkisel materyaller ile beslenmeye adapte olmuş herbivor canlılardır. Bu uyumun temeli, bitki materyallerini parçalayabilen bir sindirim sistemi ve bu sistemde simbiyotik olarak yayılış gösteren mikroorganizmalardır (Kohl ve Dearing, 2016). Ruminantların sindirim kanalı Rumen (İşkembe), Retikulum (Börkenek), Omasum (Kırkbayır) ve Abomasum (Şirden) olmak üzere özelleşmiş dört farklı bölmeden meydana gelmiştir (Agarwal ve ark., 2015). Beslenme sırasında alınan bitkisel materyal ilk olarak Rumen bölgesine gelerek muhafaza edilip, yumuşatılır. Bu bölmede simbiyotik olarak yayılış gösteren mikroorganizmalar sayesinde sindirime tabi tutulur ve ruminasyon işlemi için ösafagusun ters peristaltik hareketi ile ağıza tekrardan gönderilir. Daha sonra besin yutularak sırası ile Retikulum ve Omasum'a geçer ve besinde bulunan suyun geri emilimi sağlanır (Jullian ve ark., 1998).

Sindirim kanalının ortalama olarak %70'lik kısmını meydana getiren rumen (işkembe) bölgesi bitkisel biyokütlenin katabolizmasında oldukça önemli bir yere sahiptir (Madigan ve ark., 2003). Ayrıca rumen negatif redoks potansiyeli, 6.0-7.0 arasında değişen bir pH ve 39°C sıcaklığına sahiptir (Huang ve ark., 2018).

1.2. Rumen mikroorganizmaları

Rumen, herbivorlar tarafından tüketilen besinlerin yapısında bulunan karbonhidrat, protein ve selüloz gibi organik bileşiklerin parçalanmasında görevli olan mikrobiyal bir ekosisteme sahiptir (Calabrò ve ark., 2012). Bu ekosistem içerisinde bulunan mikroorganizmaların isimleri Tablo 1.1. 'de verilmiştir.

Tablo 1.1. Rumen ekosisteminde yayılış gösteren mikroorganizmalar ve bulunma miktarları

Mikroorganizma adı	Bulunma miktarı
Bakteriler	10^{10} - 10^{11} bakteri/mL
Protozoalar	10^4 - 10^6 protozoa/mL
Funguslar	10^3 - 10^5 zoospor/mL
Arkea	10^8 - 10^9 hücre/mL
Bakteriyofaj	10^8 - 10^9 bakteriyofaj/mL
Mikoplazma	10^9 - 10^8 CFU/mL

Rumen ekosistemin meydana gelmesi sırasında ruminant canlının beslenme yaşı da oldukça önemlidir. Çünkü yeni doğan memeli herbivor bir canlının ilk besin maddesi anne sütü olduğu için sindirim kanalında *Lactobacillus* gibi bakterilerin oranı daha yüksektir (Hobson ve ark., 1982). Ancak sindirim kanalındaki rumen bakterileri dışında bulunan diğer mikroorganizmaların ruminantlar arasındaki transferi su kanalları, dışkı, salya gibi çeşitli yollar ile aktarıldığı düşünülmektedir (Cholewińska ve ark., 2020). Ruminant canlılar arasında geçişleri tamamlanan mikroorganizmalar optimum düzeyde gelişimleri için rumen ortamını kullanırken sahip oldukları enzimsel aktiviteleri sayesinde ruminant canlıların ihtiyacı olan besin öğelerini karşılarlar. Bu da rumen mikroorganizmaları ile ruminantlar arasında mükemmel bir simbiyotik ilişki olduğunu göstermektedir (Russell ve ark., 2009).

1.2.1.Rumen Bakterileri

Rumende yayılış gösteren prokaryotik hücre yapısına sahip rumen bakterileri mikrobiyal ekosistemde en fazla bulunan (Çizelge 1.1) canlı grubunu oluşturmaktadır (Zhong ve ark., 2018). Rumen bakterilerinin sınıflandırılmasında şekilleri, peptidoglikan tabakalarının boyanması, etkili oldukları substrat çeşitleri, solunum şekilleri ve enzim aktiviteleri sonucu oluşan son ürünleri etkilidir (Wang ve ark., 2019).

1.2.2.Rumen Arkeleri

Canlıların sınıflandırılmasında bakteri, arkea ve ökaryotlar olmak üzere üç büyük domain (alan) bulunmaktadır. Arkeler bu domainler arasında prokaryot hücre yapısı ile

ökaryot hücre yapısı arasında geçiş yapısına sahiptir (Eckburg ve ark., 2003). Farklı habitatlarda yayılış gösteren bu prokaryotik grup bugüne kadar 28 cins düzeyinde tespiti yapılırken, 5 cins düzeyi rumende yayılış göstermektedir (Mao ve ark., 2021). Rumende bulunan bu grup içerisinde en fazla metanojenik arkeler bulunmaktadır (Kamra, 2005).

1.2.3. Rumen Protozoaları

Rumende yayılış gösteren ökaryot hücre yapısına sahip protozolar sil (Ciliophora) ve kamçı (Mastigophora)'larına göre iki büyük taksonomik basamağı oluşturmaktadırlar (Garcia ve ark., 2018). Rumende 10^5 - 10^6 (hücre/ml) oranında Ciliophora grubuna ait protozolar mevcuttur (Ogimoto ve İmai, 1981). Rumen protozoları sahip oldukları enzimler sayesinde bitkisel materyalin yadımlanması görev almaktadır (Williams, 1986). Aynı zamanda rumen bakterilerinin birey sayılarının dengede tutulmasında da etkilidir (Colemon, 1975; Dehority, 1998).

1.2.4. Rumen Bakteriyofajları

Obligant (zorunlu hücre içi) parazit olarak tanımlanan rumen bakteriyofajları hem rumende yayılış gösteren metanojenik arkelerin birey sayısının dengede tutulması (Kamra, 2005) hem de bakteriler arasında kalıtsal çeşitliğin (transdüksiyon) sağlanmasında görev almaktadırlar (Nandi ve ark., 2020).

1.2.5. Rumen Mikoplazmaları

Gram-pozitif bakterilerden köken almış ve hücre duvarı bulundurmeyen bakteri topluluğu olarak bilinmektedirler. Ruminal mikoplazmalar, bilinen tek zorunlu anaerobik mikoplazmalar olmaları bakımından da oldukça önemli bir yere sahiptir. Mikoplazmalar çoğunlukla patojen olmalarına rağmen, rumenden izole edilenler fermentatif ve bir konakçı olmadan gelişmektedirler (Joblin ve Naylor, 2002).

1.2.6. Rumen Fungusları

Rumende yayılış gösteren ökaryot tek hücreli rumen fungusları, bitkisel substratın üzerine kolonizasyonları ve enzimatik aktiviteleri sayesinde selüloz, hemiselüloz gibi karbonhidratların parçalanmasında oldukça etkili bir gruptur (Kar ve ark., 2021).

1.3. Rumen Funguslarının Tarihçesi

Kamçılı protozoa grubuna ait olduğu düşünülen *Sphaeromonas communis* (Liebetanz, 1910) ve *Caliilmastix frontalis* (Braune, 1913) olarak isimlendirilen rumen fungusları daha sonraki dönemlerde Orpin (1975) tarafından protozoa olmadıkları tespit edilmiş ve *Neocallimastix frontalis* olarak literatüre girişi yapılmıştır. Orpin (1975)'e göre rumen funguslarının morfolojik yapıları ve fizyolojik özelliklerinin protozolardan farklı olması aynı zamanda hücre duvarının yapısındaki polimer maddenin de kitin olması ile rumen funguslarının taksonomik olarak farklı basamaktaki yeri belirlenmiştir (Orpin, 1977).

1.4. Rumen Funguslarının Özellikleri

1.4.1. Morfolojileri

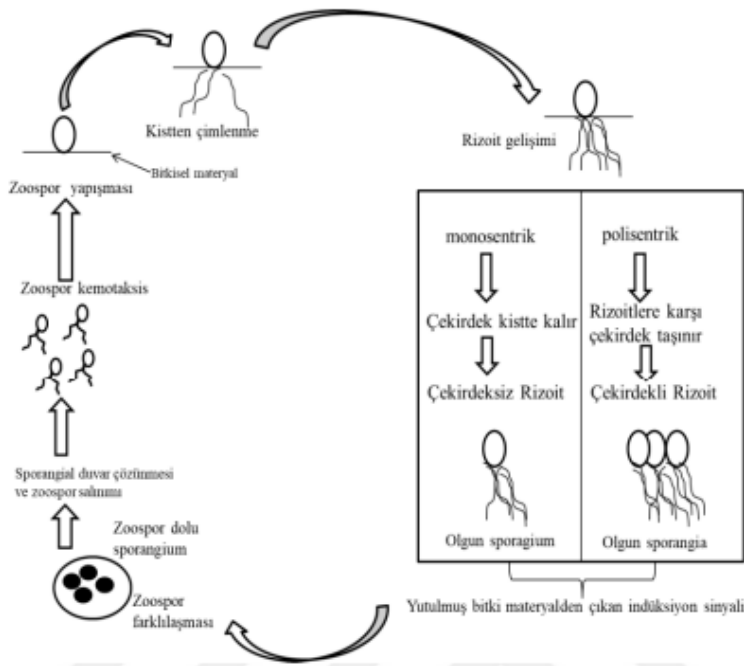
Rumen fungusları filamentli ve küresel olmak üzere iki farklı morfolojiye sahiptir. Filamentli ve küresel rumen fungusları zoospor üretiminde görevli olan spor kesesinin durumuna göre monosentrik veya polisentrik tallus yapısını oluşturmaktadır. Rumen fungusların üremesinde görevli olan zoosporlar ise kamçı sayısının durumuna göre tek veya çok kamçılı olarak isimlendirilmektedirler (Voigt ve ark., 2021).

1.4.2. Üreme ve Gelişmesi

Rumen funguslarının yaşam döngüsü vejatatif ve genaratif olmak üzere iki farklı evrenin birbirini takip etmesi sonucu meydana gelmektedir (Gruninger ve ark., 2014). Bu evreler başlık 1.4.1'de verilen monosentrik ve polisentrik tallus yapısına ait funguslarda farklılık gösterebilmektedir (Şekil 1.1.).

Monosentrik tallus yapısına sahip rumen fungusları zoosporogenes adı verilen ve zoosporların salınımı olarak bilinen bu basamakta salınan zoosporlar rumen sıvısı içerisinde kemotaksis hareketi ile bitki hücre duvarına doğru yönelim yaparlar (Orpin ve Bountiff, 1978). Yönelim hareketinden sonra bitki hücre duvarına kolonize olmaya çalışan zoosporlar vejetatif evreyi gerçekleştirmiş olurlar.

Polisentrik tallus yapısına sahip rumen funguslarında zoospor salınımı monosentrik tallus yapılı rumen funguslarına oranla çok nadir gözlemlenmektedir (Ho ve Bauchop, 1991). Çünkü polisentrik tallus yapılı rumen funguslarının zoospor gelişimi terminal veya intercalar olmak üzere iki farklı şekilde olmaktadır. Başka bir ifade ile zoosporlar rumen fungusun farklı yerlerine göç ederek yeni spor keselerinin oluşumunu sağlamaktadır (Barr ve ark., 1989).



Şekil 1.1. Rumen funguslarında üreme ve gelişme (Gruninger ve ark.,2014; Karaman, 2018)

1.5. Rumen Funguslarının Sınıflandırılması

Rumen funguslarının sahip olduğu tallus yapısı ve zoosporlarındaki mevcut kamçı sayısı sayesinde cins düzeyinde, moleküler düzeyde çalışmalar ile tür ve alt türlerinin taksonomik basamaktaki yerleri belirlenir (Smith ve ark., 2020). Rumen funguslarının

çevresel faktörlerden kolay etkilenmeleri ve tallus morfolojilerinde meydana gelen farklılaşmadan dolayı cins düzeyinde sınıflandırma yapılırken bazı aksaklıklar meydana gelmektedir (Ho ve ark., 2000). Bundan dolayı sınıflandırma yapılırken rumen fungusuna ait olan ITS (Internal Transcribed Sequence 1-2) bölgeleri (Brookman ve ark., 2000), RNA (5.8S, 28S rRNA) bölgeleri (Dore ve Stahl, 1991) ve PCR-RFLP (Ozköse ve ark., 2003) yöntemi gibi farklı moleküler çalışmalardan faydalanılmaktadır. Günümüze kadar morfolojik ve moleküler çalışmalar sonucu 20 farklı rumen fungusun cins düzeyinde tespiti yapılmış ve Tablo 1.2’de verilmiştir.

Tablo 1.2. Günümüze kadar cins düzeyinde tanımlanmış rumen fungusları (n=20) ve taksonomik basamaktaki yerleri

Alem	Fungi
Şube	Neocallimastigomycota
Sınıf	Neocallimastigomycetes
Takım	Neocallimastigales
Aile	Neocallimastigaceae
Cins	<i>Caecomycetes</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor, Gold ve ark., 1988) <i>Neocallimastix</i> (Monosentrik, Çok kamçılı zoospor, Barr, 1981) <i>Piromyces</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor, Barr ve ark., 1988) <i>Orpinomyces</i> (Polisentrik, Çok kamçılı zoospor, Breton ve ark., 1989) <i>Anaeromyces</i> (Polisentrik, Tek kamçılı zoospor, Breton ve ark., 1989) <i>Cyllamyces</i> (Polisentrik, Tek kamçılı zoospor, Ozkose ve ark., 2001) <i>Feramyces</i> (Monosentrik, Çok kamçılı zoospor, Hanafy ve ark., 2018) <i>Pecaromyces</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor, Hanafy ve ark., 2017) <i>Oontomyces</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor, Dagar ve ark., 2015) <i>Buwchfawromyces</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor, Callaghan ve ark., 2015) <i>Liebetanzomyces</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor, Joshi ve ark., 2018) <i>Ghazallomyces</i> (Monosentrik, Çok kamçılı zoospor, Hanafy ve ark., 2019) <i>Aklioshbomyces</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor, Hanafy ve ark., 2019) <i>Agriosmyces</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor, Hanafy ve ark., 2019) <i>Capellomyces</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor, Hanafy ve ark., 2019) <i>Joblinomyces</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor, Hanafy ve ark., 2019) <i>Khoyollomyces</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor, Hanafy ve ark., 2019) <i>Tahromyces</i> (Monosentrik, Tek kaçmış zoospor, Hanafy ve ark., 2019)

1.5.1. Rumen Fungus Cinsleri ve Özellikleri

1.5.1.1. *Caecomyces* sp.

Gold ve ark. (1988) inek rumeninden elde ettikleri *Caecomyces* sp. izolatu monosentrik tallus morfolojisine sahip ve mono flagellatlı zoospor üretmektedirler.

1.5.1.2. *Neocallimastix* sp.

Monosentrik tallus morfolojisine sahip ve çok kamçılı (poliflagellata) zoospor üreten *Neocallimastix* sp. (Barr, 1981) izolatları bitkisel materyallerin yadımlanması için gerekli olan selüloolitik veya hemi-selüloolitik enzimleri kullanılmaktadır (Vinzelj ve ark., 2020).

1.5.1.3. *Piromyces* sp.

İnek rumeninden izole edilen, monosentrik tallus morfolojisine sahip ve tek kamçılı (monoflagellate) zoospor üreten rumen fungus izolatıdır (Barr ve ark., 1989).

1.5.1.4. *Orpinomyces* sp.

Koyun rumeninden izole edilen ilk polisenterik tallus morfolojisine sahip olan ve poliflagellata yapılı zoospor üreten rumen fungusudur (Barr ve ark., 1989). Polisentrik rumen fungusların sadece spor keselerinde (sporangia) değil aynı zamanda rizomiselyumlarında da çekirdekleri vardır. Çekirdeklerin bu hareketi, monosentrik fungusların aksine, çoklu sporangiaların oluşmasını gerçekleştirmiştir. *Orpinomyces* sp.izolatına ait *O. joyoni* ve *O. intercalaris* olarak iki farklı türü mevcuttur (Ho ve ark., 1994).

1.5.1. 5. *Anaeromyces sp.*

Koyun rumeninden izole edilen rumen fungus izolatu polisentrik tallus morfolojisine ve monoflagellata yapılı zoospora sahiptir (Breton ve ark .1990). Aynı zamanda Ho ve ark. (1990) bu izolatu *Ruminomyces sp.* izolatının sinonimi olduğunu belirtmişlerdir.

1.5.1. 6. *Cyllamyces sp.*

Sığır dışkısından izole edilen bu izolat küresel rizoid polisentrik tallus morfolojik tallus yapısı ve monoflagellata zoospor üretimi gerçekleştirmektedirler (Ozkose ve ark., 2001). Bu izolat aynı zamanda filogenetik olarak morfolojisi *Caecomyces sp.*'ye moleküler düzeyde ise *Piromyces sp.* izolatına yakındır (Edwards ve ark., 2019).

1.5.1.7. *Feramyces sp.*

Berberi koyunu (*Ammotragus lervia*) ve yaban keçisine (*Dama dama*) ait rumen ve dışkı örneklerinden izole edilen bu izolat monosentrik tallus morfolojisi ve poliflagellata yapılı zoospora sahiptir. Aynı zamanda galaktoz, arabinoz, aljinat ve pektin dahil olmak üzere bir dizi mono-, oligo- ve polisakaritleri metabolize etme yeteneği gösterdiğide bilinmektedir (Hanafy ve ark., 2018).

1.5.1.8. *Pecaromyces sp.*

Sığır ve koyun dışkısından izole edilmiş olan bu izolat monosentrik tallus ve monoflagellata yapılı zoospora sahiptir (Hanafy ve ark., 2017).

1.5.1. 9. *Oontomyces sp.*

Camelus dromedarius (Hint deve) 'un ön mide bölgesinden izole edilen bu izolat monosentrik tallus morfolojisine sahip ve tek kamçılı zoospor üretmektedirler (Dagar ve ark., 2015). Morfolojik olarak önemli biçimde *Piromyces* cinsinin üyelerine moleküler düzeyde *Anaeromyces* sınıfına daha yakın olduğu bilinmektedir.

1.5.1. 10. *Buwchfawromyces* sp.

Buffalo dışkılarından izole edilmiş olan bu izolat monosentrik tallus morfolojisi ve monoflagellata yapı zoospora sahiptir (Callaghan ve ark., 2015). Morfolojik olarak *Piromyces*'e benzeyen ancak genetik olarak oldukça farklı olan bu izolat ilk olarak Batı Galler'de buffalo gübresinden ve daha sonra aynı bölgede koyun, sığır ve atlardan izole edilmiştir. LSU ve ITS dizisinin filogenetik analizi, *B. eastonii* izolatlarının çok merkezli *Anaeromyces* spp. olduğunu göstermiştir (Edwards ve ark., 2008).

1.5.1.11. *Liebetanzomyces* sp.

Keçi dışkılarından izole edilmiş olan bu izolat filamentli monosentrik thallus gelişimi göstermiştir ve tek kamçılı zoosporu bulundurmaktadır. Morfolojik incelemelerde *Piromyces*, *Buwchfawromyces*, *Oontomyces* ve *Pecoromyces* cinslerine benzerlik gösterdiği bilinmektedir. Moleküler düzeyde ise bu izolat *Anaeromyces*'e yakın bir kökenini ortaya çıkarmıştır (Joshi ve ark., 2018).

1.5.1.12. *Ghazallomyces* sp.

Mihver geyiğinin dışkılarından izole edilmiş bu izolat monosentrik tallus morfolojisi ve poliflagellata yapı zoospora sahiptir (Hanafy ve ark., 2019).

1.5.1. 13. *Aklioshbomyces* sp.

Beyaz kuyruklu geyik dışkılarından izole edilen bu izolat monosentrik tallus ve tek kamçılı zoospora sahiptir (Hanafy ve ark., 2019). *Aklioshbomyces* sp. izolatları doğada nadiren dağılmış gibi görünse de, izole edildiği geyik dışkı örneğinde bol miktarda bulunmaktadır (Hanafy ve ark., 2020).

1.5.1.14. *Agriosmyces sp.*

Yaban domuzu ve keçi dışkısından izole edilmiş olan bu izolatın monosentrik yapılı tallusu ve tek kamçılı zoosporu mevcuttur (Hanafy ve ark., 2019).

1.5.1.15. *Capellomyces sp.*

Capellomyces sp. izolatı ana morfolojik özellikleri, birkaç farklı rumen fungus cinsinde ortak olan; monosentrik tallus, filamentli rhizoidal sistem ve monoflagellatlı zoosporlar olarak ifade edilmektedir (Hanafy ve ark., 2019).

1.5.1.16. *Joblinomyces sp.*

Koyun ve keçi dışkısından izole edilen bu izolat monoflagellatlı yapılı zoospor ve monosentrik tallus morfolojisine sahiptir (Hanafy ve ark., 2019).

1.5.1.17. *Khoyollomyces sp.*

Et ve zebra dışkılarından izole edilmiş bu izolat monosentrik tallus ve tek kamçılı zoospora sahiptir (Hanafy ve ark., 2019).

1.5.1.18. *Tahromyces sp.*

Hindistanda endemik tür olan bir dağ keçisine (*Nilgiritragus hylocrius*) ait dışkıdan izole edilmiş olan bu izolat monosentrik tallus morfolojisi ve monoflagellat yapılı zoospora sahiptir (Hanafy ve ark., 2019).

1.5.1.19. *Aestipascumyces sp.*

Yabani bir büyük boynuzlu koyuna (Teksas, ABD) ait rumen sıvısı ve bir alpaka dışkısından (Baden-Württemberg, Almanya) izole edilmiş olan bu izolat monosentrik tallus morfoloji ve poliflagellat yapılı zoospora sahiptir (Stabel ve ark., 2020).

1.5.1.20. *Paucimyces sp.*

Antilop dışkısından izole edilmiş olan bu izolatin monosentrik tallus yapılı bir morfolojisi ve monoflagellat yapılı zoospora sahip olduğu bilinmektedir (Hanafy ve ark., 2021).

1.6. Bitki Hücre Duvar Yapısı ve Katabolizması

Bitki hücre duvarlarında bulunan en karakteristik organik bileşik selüloz molekülüdür. Bu molekül β -1,4-bağlı glukoz zincirlerinin meydana gelmiş kristal bir mikrofibril yapıya sahiptir (Somerville, 2006).

Hücre duvarında selüloza ek olarak, iki genel kategoride gruplanan polisakkarit yapılı bileşikler mevcuttur. Bunlar pektin grubu içerisinde bulunan homogalakuronan ve rhamnogalakuronan (Harholt ve ark., 2010) ve hemiselüloz grubu içerisinde bulunan ksiloglukanlar, glukomannanlar, ksilanlar ve karışık bağlantılı glukozlardır (Scheller ve Ulvskov, 2010).

Bitki hücre duvarları ayrıca çeşitli enzimler ve yapısal proteinler dahil olmak üzere birçok protein ve glikoprotein içerir (Rose ve Lee, 2010). Örneğin arabinogalaktan proteinleri, plazma zarında ve hücre duvarında bulunan yapısal olarak karmaşık moleküller olup hücre yüzeyindeki tanıma ve sinyalleşme olaylarında önemli roller oynadıkları düşünülmektedir (Ellis ve ark., 2010).

Selülozdan sonra, ksilan doğada en yaygın bulunan temel polisakkaritlerden biridir. Kara bitkilerinin hücre duvarlarında, lignin ve selüloz arasında ikincil hücre duvarlarında bulunur (Wong ve ark., 1988). Lignin, odunlaşmış bitki hücrelerinin üçüncü en önemli kimyasal bileşenidir. Lignin, aromatik alkollerin serbest radikallerinden rastgele oluşan oldukça dallı ve karmaşık bir hidrofobik polimerdir. Bu karmaşıklık, lignini oluşturan monomerlerin sayısından değil, bu monomerlerin bağlanma şekline kaynaklanmaktadır (Vanholme ve ark., 2008).

Aynı zamanda β -D-glukopiranozların β -1,4 ve β -1,3 glikozit bağları ile lineer olarak bir araya gelen likenan organik bileşiği de genel olarak yulaf ve arpa gibi bitkilerin hücre duvarında mevcut olarak bulunmaktadır. Yapısında bulundurduğu β -1,4 bağlarının oranı

oldukça yüksektir yaklaşık olarak (% 70) (Perlin ve Suzuki, 1962). Likenanın katabolizmasında görevli olan enzim grubunda β -glukanaz veya likenaz (EC 3.2.1.73) olarak bilinmektedir (Chen ve ark., 1997).

1.7. Rumen Fungusların Hücre Duvarı Katabolizmasındaki Yeri

Rumen fungusları bitkisel materyal üzerinde kolonize olarak (Şekil 1.1) bitkisel substratın katabolizmasında etkili rol oynadıkları bilinmektedir (Bauchop, 1984). Özellikle Joblin (1989)'in *in vitro* çalışmalarında *Caecomyces* sp. izolatına ait rumen fungusların bitki hücre duvarında kolonize olduğunu ve hücre duvarını parçalandığı rapor etmişlerdir. Theodorou ve ark. (1989)'da *Neocallimastix* sp. izolatının saman hücre duvarının yapısında bulunan polisakkarittin ortalama olarak %70'e yakın kısmının enzimatik olarak yıkıldığını belirtmişlerdir. Buna göre rumen fungusları rumen içerisinde bulunan mevcut polisakkaritlerin parçalanmasında görevli olan enzimlerinin büyük bir çoğunluğunu rizoidlerde, rizomiselyumlarında bulundurarak hücre dışına sekresyon yapabilmektedirler. Ek olarak rumen funguslarının üremesinde görevli olan zoosporların da polisakkaritlerin parçalanmasında görevli olan enzimleri bulundurduğu da bilinmektedir (Williams ve Orpin, 1987).



Şekil 1.2. Rumen fungusun *in vitro* ortamda bitkisel materyal üzerine kolonizasyonu

1.8. Rumen Fungusların Lignoselülotik Enzimleri ve Potansiyel Kullanımları

Rumen fungusları bitki biyokütlesini birincil olarak katabolize eden, rizoidal büyüme yoluyla bitki dokusunu açma ve lignoselülozik biyokütlenin farklı bileşiklerini parçalamak ve ayırmak için bir enzim grubu üretme yeteneğine sahiptir (Cheng ve ark., 2009). Rumen fungusları hetero/homo-polisakkarit yapılu bileşiklerin hidrolizinde görevli olan enzim çeşitlerini sentezleyebilmektedir (Sharada ve ark., 2013). Genellikle selülaazlar olarak adlandırılan bir grup enzim, selülozdaki β -1,4 glikozidik bağları, üç farklı enzim tipini içeren üç ayrı enzimatik aktivite yoluyla sinerjik olarak katabolize ederler. Selülaaz enzim grubu içerisinde bulunan endoglukanazlar (EC 3.2.1.4) selüloz iplikçiklerinin amorf bölgelerini katabolize ederek oligosakkaritleri meydana getirirken ve ekzoglukanazlar enzimatik (EC 3.2.1.176; EC 3.2.1.91) selobiyozu oluştururken selobiyohidrolazlar (EC 3.2.1.21) ise glikoz molekülünü oluşumunu sağlamaktadır (Wang ve ark., 2014).

Rumen fungusları bitki hücre duvarının yapısında bulunan heteropolisakkarit hemiselüloz bileşiğinin katabolik faaliyetinde de aktif rol oynamaktadır. Bu polisakkaritin yapısında bulunan β -glukanları, mannanları ve ksilanları parçalamak için gerekli olan enzimleri sentezlediği bilinmektedir (Aylward ve ark., 1999).

Selülotik ve hemiselülotik enzimlerin çoğu, selülozom olarak bilinen çok enzimli bir kompleksin parçasıdır. Selülozomlar ilk olarak Clostridiaceae bakteri ailesinde tanımlanmış ve rumen fungusları bu özelliği gösteren tek ökaryotik temsilcileri olmuştur (Felix ve ark., 1993). Günümüze kadar selülozomlar *Piromyces* sp., *Orpinomyces* sp. ve *Neocallimastix* sp. izolatlarına ait bazı türler için tanımlanmıştır (Dollhofer ve ark., 2015).

Rumen fungusları ligninin katabolizmada aktif rol oynayamayabilmektedir. Çünkü lignin yapısında bulunan aromatik halkanın parçalanabilmesi için ortamda oksijen'e ihtiyaç duyulmaktadır (Berg ve ark., 2014).

Ayrıca rumen fungusları hemiselüloz ve lignin arasındaki bağı kesen ve bu iki bileşiği ayırarak selüloz ve hemiselülozu daha fazla bozunma için daha kolay erişilebilir hale getiren feruloil esteraz (EC 3.1.1.73) enzimi de ürettiği (Nagpal ve ark., 2009) ve likenaz (glukanaz) enzimi de hücre duvarının hidrolizinde aktif rol oynadığı bilinmektedir

(Ljungdahl, 2008). Zhou ve ark. (1994), *Neocallimastix* sp. izolatına ait olan *celA* gen bölgesinin hem selüloz hem de likenaz aktivitesi gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Dijkerman ve ark. (1996), *Piromyces* sp.'ye ait selüloz enzimlerinin substrat tutunma hızlarının düşük olmasına rağmen enzim aktivitesinde herhangi bir düşüş olmadığını tespit etmişlerdir. Chen ve ark. (1997), *Orpinomyces* sp. izolatına ait likenaz enzimi sentezleyen gen bölgesinin tespitini gerçekleştirerek ilgili gen bölgesinin *E.coli* suşuna klonlanmasını sağlamışlardır. Likenin ve arpa beta-glukan hidrolizinin ana ürünleri olan trioz ve tetraoz oluşumunu gözlemleyerek ilgili enzimini kodlayan *LicA* gen bölgesinin bildirilen ilk 1,3-1,4-beta-D-glukanaz olduğunu tespit etmişlerdir.

Blum ve ark. (1999), *Neocallimastix* sp. ve *Piromyces* sp. izolatları tarafından sentezlenen likenaz enziminin varlığını gözlemleyerek ilgili genin izolasyonunu sağlamışlardır. Liu ve ark. (2001), *Piromyces* sp.'ye ait karboksimetil selüloz enzimini kodlayan gen bölgesini tespitini gerçekleştirmişlerdir. İlgili gen bölgesinden sentezlenen enzimin in vitro çalışma şartlarını rapor etmişlerdir. Buna göre enzimin optimum aktivite koşulları pH 5.5 ve 50°C olduğu, 55°C'de 10 dakika muamele edildiğinde enzim aktivitesinin yaklaşık olarak %50'sinin kaybolduğunu gözlemlemişlerdir. Herhangi ve ark. (2003), *Piromyces* sp. izolatına ait ksilozun ksiloz izomeraz ve D-ksilulokinaz aracılığıyla metabolize ettiğini rapor etmişlerdir. Aynı zamanda Ksiloz izomeraz enzimi sentezleyen gen bölgesinin *Saccharomyces cerevisiae* 'a klonlanması sonrasında 25±13 nmol min/mg protein değerinde enzimsel bir aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Cheng ve ark. (2003), *Piromyces* sp. izolatına ait selüloz enzimini sentezleyen gen bölgelerinin (*cel5B*, *cel6A*) klonlanması gerçekleştirmişlerdir. İlgili gen bölgelerinin üye olduğu glikozit hidrolaz enzim ailelerinin tespitini sağlamışlardır.

Ljungdahl (2008), *Orpinomyces* sp. izolatına ait çok sayıda selüloolitik ve hemiselüloolitik enzimler (ksilanaz, likenaz, mannanaz) üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Çömlekçioğlu ve ark. (2010), *Orpinomyces* sp. (GMLF18) izolatına ait beta-(1,3-1,4)-glukanazı (*licA*) kodlayan bir gen bölgesinin izolasyonun gerçekleştirmişlerdir. *E. coli*'de eksprese edilen enzim, en yüksek aktiviteyi pH 5.0-6.0'da ve 40-50 °C sıcaklıklarda gösterdiğini rapor etmişlerdir. Aynı zamanda enzimin 40 °C'de stabil olduğu ancak *LicA* aktivitesinin %12'si 50 °C'de 20 dakikada kaybolduğunu gözlemlemişlerdir. Çömlekçioğlu ve ark. (2017), *Neocallimastix* sp ve *Orpinomyces* sp. izotlarına ait olan *XynA-7* ve *CelA-5*

gen bölgeleri üzerindeki çalışma sırasında CelA-5 gen bölgesi üzerinden sentezlenen enzimin selüloz dışında likenan substratı üzerinde de etkili olduğunu gözlemlemişlerdir. İlgili gen bölgesinin likenaz aktivitesine sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Xue ve ark. (2017), *Piromyces* sp.'ye ait transformanttan selülaz enziminin yüksek aktivite gösterdiğini ve halostabilite kabiliyetini koruduğunu da gözlemlemişlerdir. Çalışmalarında *Piromyces* sp.'ye ait selülaz sentezleyen gen bölgelerinin, promotör *glaA* ile yapılandırılmış bir vektör tarafından verimli bir şekilde eksprese ederek. Ekzoglukanaz ve endoglukanaz orijinal suşun sırasıyla 0.21 U/mL ve 4.51 U/mL'sinden transformantın sırasıyla 0.81 U/mL ve 19.10 U/mL'sine yükseltildiğini tespit etmişlerdir. Kar ve Torcan (2022), *Neocallimastix* spp. izolatına ait likenaz enziminin *in vitro* ortamda çalışma şartlarını rapor etmişlerdir. İlgili enzimin spesifik enzim aktivitesini maksimum 157.36 ± 3.83 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein olarak gözlemlemişlerdir.

1.9. Glukanaz'ların Kullanım Alanları

1.9.1. Glukanazlar'ın Gıda Endüstrisinde Kullanılması

Tohumlardan yağ ve suyunun ayrıştırılması, meyve sularında dekantasyon, tohumların eşit su emiliminin sağlanması, soya sosu gibi fermente soya gıdalarının üretiminde soya fasulyesinin kabuklarının uzaklaştırılması, hindistan cevizi ve soya fasulyesinden protein ayrıştırılması, mısırdan nişasta üretilmesi, gıda katkı maddesi olarak kullanılan ezilmiş lignoselüloz malzemenin ayrıştırılması, biyoetanol üretimi için substrat elde edilmesi, polisakkaritlerin, proteinlerin, enzimlerin ve aroma maddelerinin salınmasını kolaylaştırmak için bitkilerin hücre duvarlarını uzaklaştırmasında aktif olarak kullanılmaktadır (Bhat ve Bhat, 1997).

1.9.2. Glukanazlar'ın İçecek Endüstrisinde Kullanılması

Endo- β -(1,3)-(1,4)-glukanazlar bitkilerin tohumlarında bulunan endosperm hücrelerinde α -amilazın nişastaya erişimini kolaylaştırdıkları için içecek mayalama endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Beckmann ve ark., 2006). Ayrıca rekombinant mayadan türetilen β -1,3- ve β -1,4-glukanazlar, şarap aromasını arttırmak, bira

filtrasyonunu ve arpada yer alan β -1,3 ve β -1,4 hidrolizinde de kullanılmaktadır (Bhat ve Bhat, 1997).

1.9.3. Glukanazlar'ın Hayvan Yemi Endüstrisinde Kullanılması

Likenaz, β -glukanı diğer glukanazlardan daha fazla hidrolize ettiği için, kümes hayvanları ve domuz yemi üretiminde giderek daha fazla önem kazanmaktadır (Beckmann ve ark., 2006). Başka bir ifade ile geviş getirenlerin ve tek mideli hayvanların yem sindirilebilirliğini artırmak, lignoselüloz maddeleri ön işleme tabi tutmak, tohumları ayırmak ve geviş getirenlerin selüloz kullanımını artırmak için silaj yapımında kullanılırlar (Bhat ve Bhat, 1997).

1.9.4. Glukanazlar'ın Tekstil Endüstrisinde Kullanılması

Fazla boyayı kumaşlardan uzaklaştırmak (biyotaşlama), çoklu yıkamalardan sonra pamuklu kumaştan mikrolifleri çıkarmak, renk parlaklığını artırmak ve yumuşaklığı geri kazandırmak için kullanılırlar (Bhat ve Bhat, 1997).

2. TEZİN AMACI VE ÖNEMİ

Rumen fungusları (Anaerobik Fungus) memeli herbivorlarının bağırsaklarındaki etkili lif sindirici mikroorganizmalardır. Bu onların bitki yapılarının içine girme yeteneği ile ilişkili olan birleşik mekanik ve enzimatik aktivitelerinden kaynaklanmaktadır (Orpin, 1975; Ho ve ark., 1988; Lee ve ark., 1999). AF keşfedilmelerinden bu yana, anaerobik mantarlar hayvan beslenmesi ve biyoenerji uygulamaları için ham bitki biyokütlesini kolayca parçalama yeteneğine sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu mikroorganizmalar, çeşitli teknolojiler için kullanılabilecek çok sayıda biyosentetik potansiyele sahiptirler; bu özellikleri içerisinde ön plana çıkan nokta ise enzimsel özellikleridir.

Likenaz, anaerobik fungusların çalışılan tüm endopolisakkarithidrolaz enzimleri içerisinde aktif olan enzimlerden biridir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, bu çalışmanın amacı; Tunceli’de yayılış gösteren dağ keçilerinden izole edilen *Piromyces* sp.’lere ait likenaz enzimlerinin karakterizasyonu ve biyoteknolojik açıdan kullanım potansiyellerini değerlendirmektir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1.Kullanılan Kimyasalar

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar aksi ifade edilmediği sürece yüksek saflık derecesinde kullanılmak üzere Sigma (Almanya) ve Merck (Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Tunceli çevresinde yayılış gösteren dağ keçilerine ait dışkı örnekleri anoksik saklama kaplarına konularak yaklaşık olarak 60 dk içerisinde laboratuara ulaştırılmıştır. Oksijen ile teması en az düzeyde olan örneklerden rumen fungus izolasyon işlemi yapılmıştır. Daha sonra izolasyonu ve morfolojik olarak sınıflandırılması yapılan rumen fungusları -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Rumen Sıvısının Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan rumen sıvısını temini Tunceli mezbanesinde kesilen ruminant hayvanlara ait olan rumen (işkembe)’den sağlanmıştır. Rumen sıvısının alınması sırasında sıvı içerisinde bulunan büyük yapılı partiküllerin uzaklaştırılması için çift katlı bir tülbent yardımı ile süzülerek erlenmayere aktarımı gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık olarak 2 saat boyunca çökmesi beklenen rumen sıvısı plastik falkon tüplerine (50 mL) eşit hacim olacak şekilde aktarılmıştır. Daha sonra falkon tüpleri 10 dk boyunca 3500 g’de santrifüj işlemine tabi tutulmuştur (en az 2 kere). Santrifüjleme sonrası üst sıvılar farklı bir falkon tüplerine transfer edilerek -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Anaerobik Besiyeri ve Özelliği

Orpin (1976) tarafından rumen fungusların *in vitro* ortamda optimum gelişim gösterdiği basal besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri içeriği Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Rumen fungusların *in vitro* ortamda optimum gelişim gösterdiği besiyeri ve içeriği

Kimyasallar	Miktar/Birimi (1 L)
Mineral Solusyon-A	150 ml/L
Mineral Solusyon-B	150 ml/L
Rumen sıvısı	150 ml/L
NaHCO ₃	6 g/L
Yeast Extract	2,5 g/L
dH ₂ O	550 ml/L

Mineral Solusyon-A	Miktar/Birimi (1 L)
K ₂ HPO ₄	3g/L

Mineral Solusyon-B	Miktar/Birimi (1 L)
KH ₂ PO ₄	3g/L
(NH ₄)SO ₄	6g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6g/L
CaCl ₂	0,4g/L
NaCl	6g/L

Rumen fungusları için *in vitro* basal besiyeri hazırlanırken Sistein-HCl ve Resazurin hariç Tablo 3.1.'de verilen bütün kimyasallar uygun oranlarda erlen içerisine alınarak kaynatılmıştır. Ortamın anoksik olması için hazırlanan besiyeri içeriği sürekli olarak CO₂

gazı ile doyurulmuştur. Ortamda oksijen uzaklaştırılması için aynı zamanda oksijen tutucu olarak bilinen Sistein-HCl eklenmiştir. Sistemden oksijenin uzaklaştırılmış olduğunu tespit etmek için Resazurin eklemesi yapılmıştır. Anoksik koşullar bozulmaksızın hazırlanan besiyeri Hungate tüplerine veya uygun serum şişelerine çalışılması planlanan hacim şeklinde doldurularak (CO₂ gazı veilerek) 110°C’de 10 dk boyunca otoklavlanmıştır.

3.2.4. Dışkıdan Rumen Fungus İzolasyonu ve İnkübasyonu

Dışkıdan rumen fungus izolasyonu için 10 gr dışkı örneği 100 mL başlık 4.2.3’de verilen basal besiyerinde çözündürülmüştür. Daha sonra eldeki süspansiyondan 10 mL alınarak içerisinde sadece saman (10 gr) bulunan Hungate tüplerine anoksik koşullar bozulmaksızın seyreltme işlemine tabi tutulur. Bu işlem $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, \dots, 10^{-7}$ olacak şekilde gerçekleştirilir. Seyreltme işlemi sonunda elde edilen bütün örnekler 39 °C’de 3-7 gün boyunca inkübasyona bırakılır (Theodorou ve ark., 1993).

3.2.5. Rumen Funguslarının Saflaştırılması ve Alt Kültüre Alınması

Joblin (1981) garafından rumen funguslarının saflaştırılma için kullanılan ‘Roll Tüp’ yöntemi esas alınmıştır. Bu yöntemde göre anoksik koşullar bozulmaksızın Hungate tüpü içerisine %1.5 agar (g/mL) ve % 0.5 glikoz (g/mL) içeren ortam hazırlanarak otoklavlanmıştır (110°C’de 10dk). Otoklav sonrası ortalama 40 °C’ye ulaşan Hungate tüpleri içerisine 0.5 mL başlık 4.2.4’de inkübasyonu sona ermiş ve saflaştırılacak rumen fungus inokülasyonu yapılmıştır. İnokülasyon sonrası Hungate tüpleri buz dolu bir kap içerisinde yatay olarak hızlı bir şekilde döndürülmüş ve agarın donması sağlanmıştır. Ortamdan bakterilerin uzaklaştırılması için uygun oranda antibiyotik ekimi yapılmıştır. Saflaştırma işlemi sonrası çalışılması planan rumen fungusları Hungate (1969) ve Bryant (1972)’a dayalı alt kültür işlemine tabii tutulmuştur.

3.2.6. Antibiyotik

Çalışmamızda kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları Tablo 3.2’de verilmiştir. Antibiyotiklerin sterilizasyon işlemi için 0,22 µm çaplı enjektör filtresi kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Antibiyotikler ve konsatrasyonları

Antibiyotik	Son konstrasyon (µg/mL)
Kloramfenikol	100 µg/mL
Ampisilin	100 µg/mL
Streptomisin	140 µg/mL
Eritromisin	200 µg/mL

3.2.7. Rumen Funguslarının Cins Düzeyinde Tanımlanması

Çalışmamızda rumen funguslarının cins düzeyinde tespiti morfolojik tallus ve zoosporlarının sahip olduğu kamçı sayısına göre yapılmıştır.

3.3. Enzim Analizleri

3.3.1. Enzim Ekstratlarının Hazırlanması

Enzim aktivitesinin değerlendirilmesi süpernatant (hücre dışı) ve hücrel (hücre içi) olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. Süpernatant aktivite için *in vitro* koşullarda gelişimi sağlanan rumen fungusları 1200g’de 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası üst kısım uzaklaştırılmış ve ayrı bir ependorfa aktarılmıştır. Hücrel aktivitenin hesaplanması için elde kalan peletin mekanik parçalanmasının gerçekleştirilmesi sağlanmıştır. Bunun için steril ependorf tüpüne aktarılan peletler sıvı azot yardımı ile mekanik parçalanma işlemine tabii tutulmuştur. Daha sonra üzerine 25mM’lık potasyum fosfat tamponu (pH 6.5) eklenerek 10000g’de 2 dk boyunca santrifüjleme yapılmıştır. İşlem sonrası üst kısım başka bir steril ependorfa aktarılarak -20°C’de muhafazası gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesini tespiti Miller (1959)'a ait Dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Deney (DG) ve kontrol grubu (KG) olmak üzere analizler gerçekleştirilmiştir (En az 3 tekerrür olacak şekilde). DG için 225µl uygun substrat ve 25µl örnek (süpernatant/hücre) ilave edilerek 50°C'de 45 dk süre boyunca sıcak su banyosunda inkübasyona tabii tutulmuştur. İnkübasyon işlemi tamamlanan örneklerle 250µl DNS eklenmiştir. KG için 225µl substrat ve 250µl DNS ilavesi yapılarak DG için uygulanan inkübasyon işlemi uygulanmıştır. KG inkübasyon sonrası 25µl örnek ilavese yapılarak hem DG hem de KG 5 dk boyunca kaynar su içerisinde bekletilmiştir. Kaynar su banyosundan çıkarılan DG ve KG üzerine 600µl dH₂O eklenerek 540 nm dalga boyunda spektrofometre ölçümü yapılmıştır.

3.3.3. Enzimin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Enzimin çalıştığı optimum pH değerinin belirlenmesi için asetat tamponu (pH 3.5–5.0), sodyum fosfat tamponu (pH 4.5–7.0) ve TrisHCl tamponu (pH 7.5–8.0) kullanılarak substratlar hazırlanmıştır (son konsantrasyonları 50mM).

3.3.4. Enzimin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi

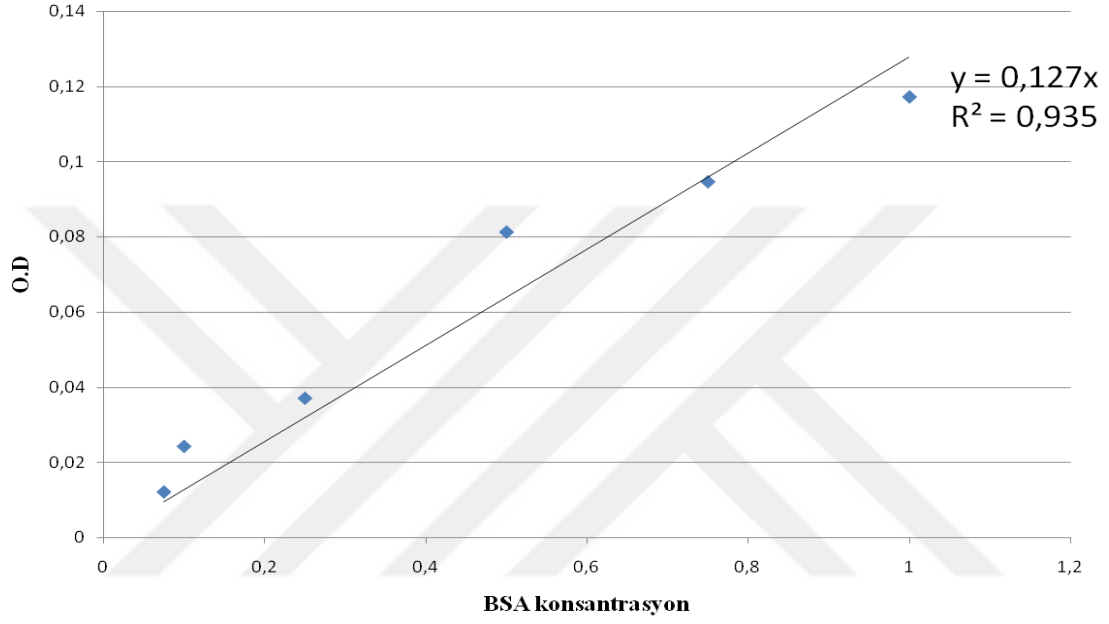
Optimum sıcaklığın tespiti için farklı inkübasyon sıcaklıkları kullanılmıştır. Bunun için kullanılacak sıcaklık değerleri 30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.3.5. Enzimin Termal Stabilitesinin Belirlenmesi

Enzimin sahip olduğu termal stabilitesinin tespiti için enzimler 40, 50, 60 ve 70°C'lik dört farklı sıcaklıkta ön inkübasyon işlemine tabii tutulmuştur. Bu işlem sırasında belirtilen her sıcaklık değerini 5, 10, 15 ve 20 dk olmak üzere farklı sürelerdeki durumlarını değerlendirilmiştir. Farklı süre ve sıcaklıkta inkübasyona bırakılan enzimler daha sonra buz üzerine alınarak DNS metoduna tabii tutulmuştur.

3.4. Protein Tayini

Bradford (1976) tarafından geliştirilen ve toplam protein konsantrasyon (TPK) tespiti için Sigma hazır kiti kullanılmıştır. Bunu için farklı yoğunluklarda Bovim Serum Albumin (BSA) kullanılmış ve regrasyon grafiği elde edilmiştir. TPK sonucu oluşan standart grafiği Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Farklı yoğunluklarda Bovim Serum Albumin (BSA) kullanılmış ve regrasyon grafiği

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Rumen fungusların aktifleştirilmesi ve kültüre Alınması

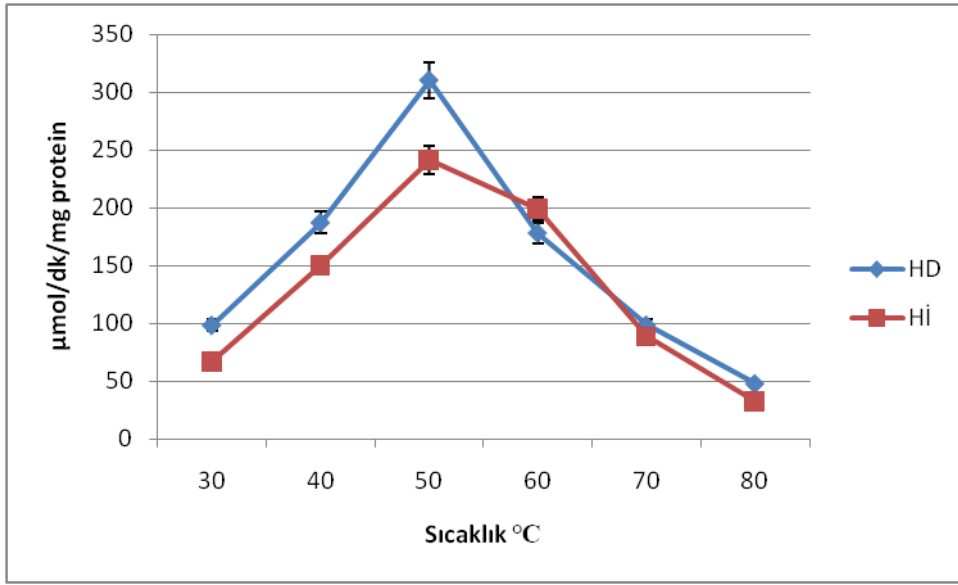
Munzur Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği (MUBAM) Laboratuvarında Tunceli’de bulunan dağ keçilerinden toplanan dışkılarından izole edilen ve sınıflandırılan rumen funguslarının %15’lik gliserol (v/v) içeren karyoviyallerde anoksik koşullar sağlanarak stok kültür koleksiyonu oluşturulmuştur (Çömlekçioglu ve ark., 2008). Çalışmada kullanılan *Piromyces* sp. (MUBAM 4) izolatu sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere kültür koleksiyonu oluşturulmuştur. Sıvı azot (-196°C) tankı içerisinde muhafaza edilen *Piromyces* sp. izolatu azot tankın içerisinde çıkarılıp, oda sıcaklığına (25°C) gelinceye kadar bekletildikten sonra sterilizasyon işlemine dikkat ederek samanlı besi yerine aktarılmıştır. Ortamon anoksik koşulların sağlanması için samanlı besiyerine CO₂ (2 atm) gazı (Balch ve Wolfe, 1976) verilerek, herhangi bir bakteriyel kontaminasyonun engellemesi için başlık 3.2.6’da verilen antibiyotik basmağı uygulanmıştır (Bauchop ve Mountford, 1981). *In vitro* ortam koşullarında rumen funguslarının hem besin gereksinimleri hem de asüksel büyüme hızından dolayı başlık 3.2.5’de belirtildiği gibi belli zaman aralıklarında alt kültür çalışması gerçekleştirilmiştir (Çömlekçi ve ark., 2008).

4.1.2. *Piromyces* sp. izolatına ait likenaz enzim üretimi ve karakterizasyonu

Rumen fungusları tarafından sentezlenen glikozit hidrolaz enzimlerinin etki mekanizması *in vitro* ortamda da gözlemlenebilmektedir (Karaman ve ark., 2022). Rumen fungusları tarafından üretilen fungal enzimlerin hem ruminant hem de endüstriyel alnalarda kullanımı oldukça önemlidir (Cheng ve ark., 2015). Bundan dolayı MUBAM 4 kültür koleksiyonu ile kodlanmış olan rumen fungusun sahip olduğu likenaz enziminin kantitatif analizi gerçekleştirilmiştir.

4.1.2.1. *Piromyces* sp. izolatına ait likenaz enziminin optimum sıcaklığın belirlenmesi

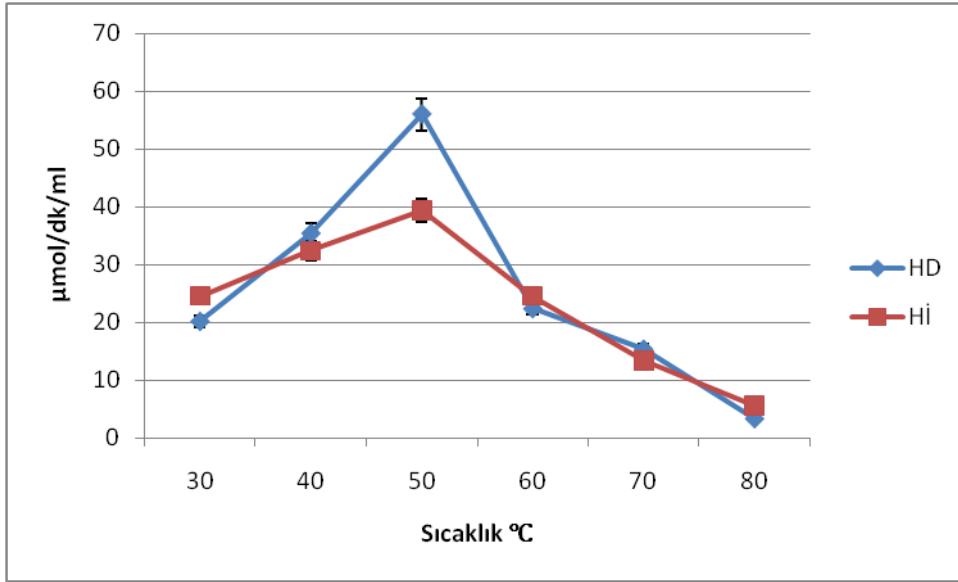
Piromyces sp. (MUBAM 4) izolatına ait likenaz enziminin farklı sıcaklıklardaki süpernatant (HD) ve hücresel (Hİ) spesifik enzim aktivitesi ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. *Piromyces* sp. izolatına ait likenaz enziminin farklı sıcaklıklardaki süpernatant (HD) ve hücresel (Hİ) spesifik enzim aktivitesi

Piromyces sp.’ye ait likenaz enzimin süpernatant (HD) enzim aktivitesinin 60°C hariç çalışılan bütün sıcaklık aralığında hücresel (Hİ) aktiviteye göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda ortam sıcaklığın 30°C olduğu zaman diliminde Hİ’nin spesifik enzim aktivitesinin 66,89 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein, HD’nın ise 98,5 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olduğu tespit edilmiştir. İlgili enzimin optimum çalıştığı sıcaklık değerinin 50°C olduğu ve bu sıcaklıkta Hİ enzim aktivitesinin 241,2 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein, HD enzim aktivitesinin ise 310,1 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olduğu görülmüştür. Ortam sıcaklığının yükselmesine bağlı olarak likenaz enziminin etkinliğinde de azalmalar gözlemlenmiştir. Özellikle 70°C’de HD enzim aktivitesi 88,4 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein iken Hİ enzim aktivitesi 98,7 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak bulunmuştur. Ortam sıcaklığının 80°C olması ile HD ve Hİ enzim aktiviteleri sırası ile 48,1 ve 32,7 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak ilgili izolata ait

toplam enzim aktivitesi değerlendirilmeside gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.2’de verilmiştir.



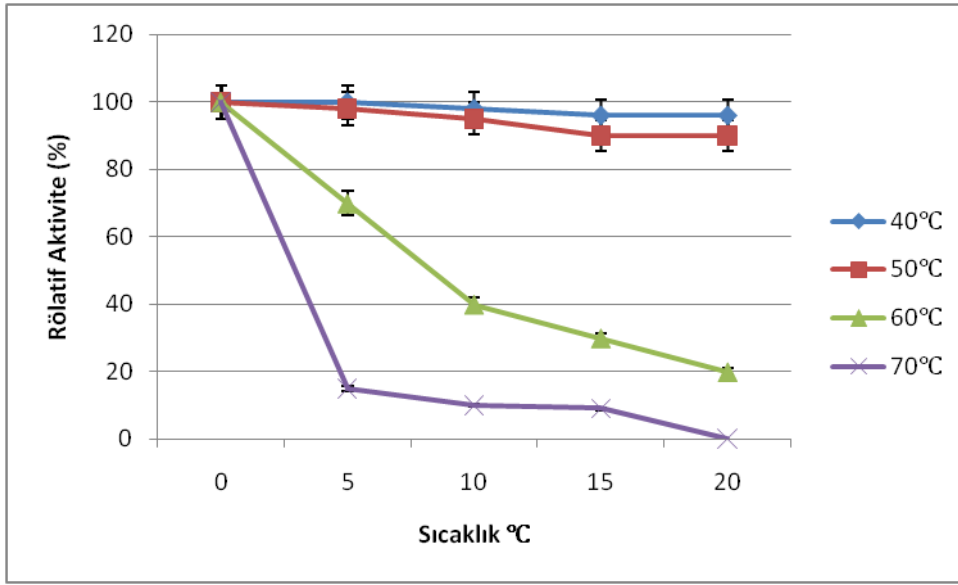
Şekil 4.2. *Piromyces* sp. izolatına ait likenaz enziminin farklı sıcaklıklardaki süpernatant (HD) ve hücresel (HI) toplam enzim aktivitesi

Piromyces sp. izolatına ait sıcaklık-toplam enzim aktivitesine göre ortam sıcaklığının 50°C olması ile enzim aktivitesinin diğer sıcaklık değerlerine göre daha fazla etkinlik gösterdiği (HI: 39,4 µmol/dk/ml ve HD: 56,0 µmol/dk/ml) tespit edilmiştir. Aynı zamanda *in vitro* ortam koşullarının 30°C olduğu durumda HD ve HI toplam enzim aktivitelerinin sırası ile 20,19 ve 24,6 µmol/dk/ml olduğu gözlemlenmiştir. Sıcaklık değerinin 60°C olması ile enzim aktivitesinde azalma gözlemlenmiş (HD: 22,4 0 µmol/dk/ml ve HI: 24,60 µmol/dk/ml) ve ortam sıcaklığının artmasına bağlı olarak aktivitenin de giderek düştüğü tespit edilmiştir.

Piromyces sp. izolatına ait sıcaklık enzim aktivitesi sonuçlarına göre hem spesifik hem de toplam aktivitenin 50°C’de optimum etkinliğe sahip olması ile ilgili enzimin optimum *in vitro* çalışma sıcaklığının tespiti gerçekleştirilmiştir. Rumen funguslarının *in vitro* ortamda sahip likenaz enzimlerin 45-55°C arasında etkinlik gösterdiği bilinmektedir (Chen ve ark., 1997).

4.1.2.2. *Piromyces* sp. izolatına ait likenaz enziminin termal stabilitesinin belirlenmesi

Endüstriyel anlamda enzimin termal stabilitesinin olabilmesi için 50°C'lik ortam sıcaklığında uzun süre etkinlik göstermesi gerekmektedir (Gupta ve ark., 1999). Bunun için çalışmamızda kullanılan izolata ait termal stabilize tespiti gerçekleştirilmiş ve Şekil 4.3'de verilmiştir.



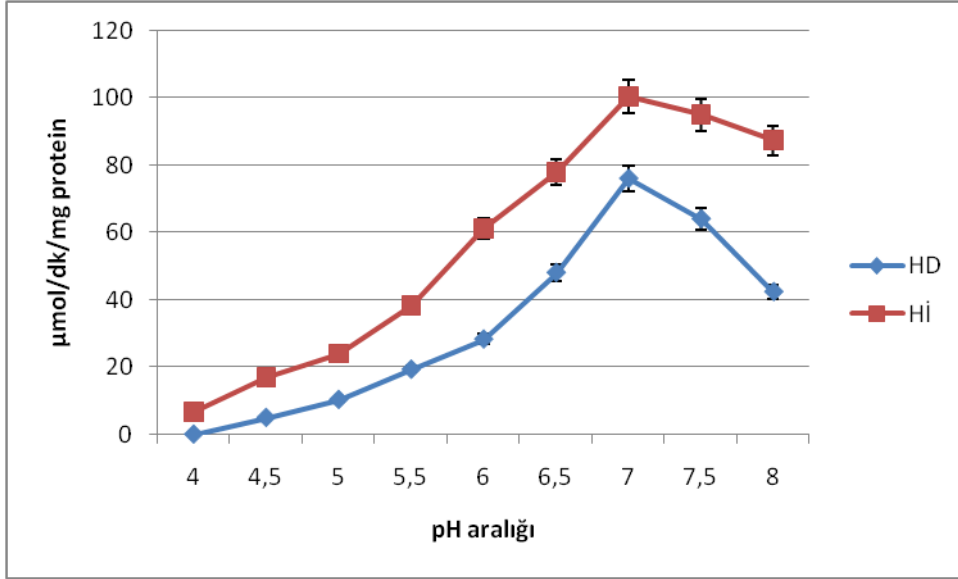
Şekil 4.3. *Piromyces* sp. izolatına ait likenaz enziminin termal stabilitesi

İlgili izolatın sahip olduğu likenaz enzimin *in vitro* koşullarda 50°C'de optimum aktiviteye sahip olmasına rağmen termal stabilitesinin düşük olduğu düşünülmektedir. Çünkü likenaz enzimin 50°C'de ön inkübasyonlu denemesinde kısa süre içerisinde aktivitesini %10 oranında kayıp ettiği tespit edilmiştir. Chen ve ark. (1997) ilgili enzimin ortam sıcaklığının 50 °C olması ile aktivitesinde (24 saatlik ön inkübasyon) %59 oranında azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

4.1.2.3. *Piromyces* sp. izolatına ait likenaz enziminin optimum pH'ın belirlenmesi

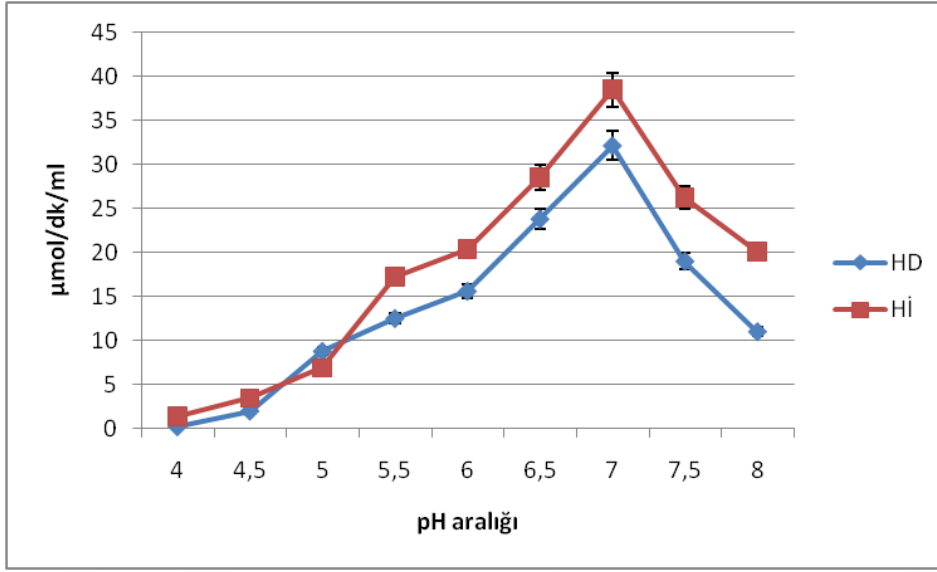
Enzimlerin sahip olduğu kimyasal özelliklerinden dolayı yapısındaki aminoasitlerin çalıştığı belli bir pH aralığı mevcuttur (Bisswanger, 2014). Bundan dolayı *Piromyces* sp.

izolatına ait likenaz enziminin de çalıştığı optimum pH aralığının tespiti gerçekleştirilmiş ve Şekil 4.4 ve 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.4. *Piromyces* sp. izolatına ait likenaz enziminin farklı pH aralığındaki süpernatant (HD) ve hücresel (Hİ) spesifik enzim aktivitesi

İlgili enzim ortam pH'sının 4.0 olması ile HD spesifik enzim aktivitesi 0,09 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein ve Hİ spesifik enzim aktivitesinin 6,8 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olduğu gözlemlenmiştir. Enzim ortam pH'sının 7.0 olması ile optimum bir aktiviteye ulaştığı ve HD 76,2 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein ve Hİ 100,4 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olduğu tespit edilmiştir. *In vitro* ortam pH'sının 7.5 olması ile aktivitede düşüşün başladığı (HD:64,2 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein ve Hİ:95,1 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) görülmüştür. Aynı zamanda enzimin optimum pH tespiti için toplam enzim aktivitesi de kıyaslanmış ve Şekil 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.5. *Piromyces* sp. izolatına ait likenaz enziminin farklı pH aralığındaki süpernatant (HD) ve hücresel (HI) toplam enzim aktivitesi

Piromyces sp. izolatına ait pH-toplam enzim aktivitesine göre ortam pH'sının 7.0 olduğu durumda enzimin optimum düzeyde çalıştığı tespit edilmiştir. Enzimin bu pH'daki sahip olduğu HD ve HI toplam aktivite değerleri sırası ile 32,14 $\mu\text{mol/dk/ml}$ ve 38.5 $\mu\text{mol/dk/ml}$ 'dir. *In vitro* ortam pH'sının 7.5 olması ile HD toplam aktivite 19 $\mu\text{mol/dk/ml}$ ve HI toplam aktivite 26,2 $\mu\text{mol/dk/ml}$ olarak tespit edilmiş ve enzimin aktisinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. Rumen funguslarına ait enzimlerin *in vitro* koşullarda 4.0-7.5 pH aralığında etkinlik gösterdiği de bilinmektedir (Chen ve ark., 1994).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız doğrultusunda Tunceli yöresine ait dağ keçilerinden izole edilen rumen fungus izolasyonu ve tanımlanmasına bağlı olarak *Piromyces* sp. (MUBAM 4) izolatına ait likenaz enziminin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

İlgili enzimin çalıştığı optimum sıcaklığın 50°C olduğu ve süpernatant (HD) spesifik enzim aktivitesinin 310,1 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein toplam enzim aktivitesinin ise 56 $\mu\text{mol/dk/ml}$ olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak hücresel (Hİ) aktivelerin sırası ile 241,2 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein ve 39,4 $\mu\text{mol/dk/ml}$ olduğu görülmüştür. Termaş stabilesinin aynı sıcaklık değerinde yaklaşık olarak 15 dk'lık ön inkübasyon sonrası %10 oranında azaldığı tespit edilmiştir.

Enzimin optimum çalıştığı pH değeri 7.0 olarak tespit edilmiştir. Bu pH değeri hem süpernatant (HD) hem de hücresel (Hİ) enzim aktivitesi dikkate alınarak bulunmuştur. Enzimin ilgili pH değerinde optimum spesifik aktivitesi Hİ değeri 100,4 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein iken HD değeri ise 76,2 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak bulunmuştur. Ek olarak toplam aktiviteler sırası ile 38,5 $\mu\text{mol/dk/ml}$ (Hİ) ve 32,14 $\mu\text{mol/dk/ml}$ (HD) olarak tespit edilmiştir.

Rumen fungal likenaz enzimin endüstriyel olarak kullanılması için termal stabilitesinin ayarlanması gerekli olduğu ve bunun için ilgili enzimi sentezleyen gen bölgesinin uygun vektörler kullanılarak klonlanması ile bu bölgelerde CRISPR sistemi ile modifikasyonlar oluşturularak termal stabilitenin gerçekleştirilebileceği düşünülmüştür.

6. KAYNAKLAR

- Agarwal, N., Kamra, D. N., Chaudhary, L. C.,** 2015. Rumen microbial ecosystem of domesticated ruminants. *Rumen microbiology: from evolution to revolution*, 17-30.
- Aylward, J. H., Gobius, K. S., Xue, G. P., Simpson, G. D., Dalrymple, B. P.,** 1999. The Neocallimastix patriciarum cellulase, CelD, contains three almost identical catalytic domains with high specific activities on Avicel. *Enzyme and microbial technology*, 24(8-9), 609-614.
- Balch, W. E., Wolfe, R.,** 1976. New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of Methanobacterium ruminantium in a pressureized atmosphere. *Applied and environmental microbiology*, 32(6), 781-791.
- Barr, D. J. S., Kudo, H., Jakober, K. D., Cheng, K. J.,** 1989. Morphology and development of rumen fungi: Neocallimastix sp., Piromyces communis, and Orpinomyces bovis gen. nov., sp. nov. *Canadian journal of botany*, 67(9), 2815-2824.
- Barr, D. J. S., Kudo, H., Jakober, K. D., Cheng, K. J.,** 1989. Morphology and development of rumen fungi: Neocallimastix sp., Piromyces communis, and Orpinomyces bovis gen. nov., sp. nov. *Canadian journal of botany*, 67(9), 2815-2824.
- Bauchop, T.,** 1984. Rumen anaerobic fungi and the utilization of fibrous feeds. *Biotechnology and Recombinant DNA Technology in the Animal Production Industries, Reviews in Rural Science* (6), 118-123.
- Bauchop, T., Mountfort, D. O.,** 1981. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens. *Applied and environmental microbiology*, 42(6), 1103-1110.
- Bisswanger, H.,** 2014. Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1-6), 41-55.
- Blum, D. L., Li, X. L., Chen, H., Ljungdahl, L. G.,** 1999. Characterization of an acetyl xylan esterase from the anaerobic fungus Orpinomyces sp. strain PC-2. *Applied and environmental microbiology*, 65(9), 3990-3995.
- Bradford, M. M.,** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Braune, R.,** 1913. *Untersuchungen uber die im Wiederkauermagen vorkommenden Protozoen*. Friedrich-Wilhelms-Universitat zu Berlin..

- Breton, A., Bernalier, A., Bonnemoy, F., Fonty, G., Gaillard, B., Gouet, P., 1989.** Morphological and metabolic characterization of a new species of strictly anaerobic rumen fungus: *Neocallimastix joyonii*. *FEMS microbiology letters*, 58(2-3), 309-314.
- Brookman, J. L., Mennim, G., Trinci, A. P., Theodorou, M. K., Tuckwell, D. S., 2000.** Identification and characterization of anaerobic gut fungi using molecular methodologies based on ribosomal ITS1 and 18S rRNA. *Microbiology*, 146(2), 393-403.
- Bryant, M. P., 1972.** Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *The American journal of clinical nutrition*, 25(12), 1324-1328.
- Calabrò, S., Guglielmelli, A., Iannaccone, F., Danieli, P. P., Tudisco, R., Ruggiero, C., Infascelli, F., 2012.** Fermentation kinetics of sainfoin hay with and without PEG. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96(5), 842-849.
- Callaghan, T. M., Podmirseg, S. M., Hohlweck, D., Edwards, J. E., Puniya, A. K., Dagar, S. S., Griffith, G. W., 2015.** *Buwchfawromyces eastonii* gen. nov., sp. nov.: a new anaerobic fungus (Neocallimastigomycota) isolated from buffalo faeces. *MycologyKeys*, 9, 11-28.
- Chen, H., Li, X. L., Ljungdahl, L. G., 1997.** Sequencing of a 1, 3-1, 4-beta-D-glucanase (lichenase) from the anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2: properties of the enzyme expressed in *Escherichia coli* and evidence that the gene has a bacterial origin. *Journal of bacteriology*, 179(19), 6028-6034.
- Chen, H., Li, X. L., Ljungdahl, L. G., 1997.** Sequencing of a 1, 3-1, 4-beta-D-glucanase (lichenase) from the anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2: properties of the enzyme expressed in *Escherichia coli* and evidence that the gene has a bacterial origin. *Journal of bacteriology*, 179(19), 6028-6034.
- Cheng, Y. F., Edwards, J. E., Allison, G. G., Zhu, W. Y., Theodorou, M. K., 2009.** Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in consecutive batch culture. *Bioresource technology*, 100(20), 4821-4828.
- Cheng, Y. S., Chen, C. C., Huang, J. W., Ko, T. P., Huang, Z., Guo, R. T., 2015.** Improving the catalytic performance of a GH11 xylanase by rational protein engineering. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 9503-9510.
- Cholewińska, P., Czyż, K., Nowakowski, P., Wyrostek, A., 2020.** The microbiome of the digestive system of ruminants—a review. *Animal health research reviews*, 21(1), 3-14.
- Coleman, G. S., 1975.** The interrelationship between rumen ciliate protozoa and bacteria. *Digestion and Metabolism in the Ruminant*.

- Çömlekcioglu, U., Gunes, M., Altun, H., Ekiz, D. O., Aygan, A., 2017.** Coexpression of rumen fungal xylanase and bifunctional cellulase genes in *Escherichia coli*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60.
- Çömlekcioglu, U., Özköse, E., Yazdic, F., Akyol, I., Ekinci, M., 2010.** Polysaccharidase and glycosidase production of avicel grown rumen fungus *Orpinomyces* sp. GMLF5. *Acta Biologica Hungarica*, 61(3), 333-343.
- Çömlekçioglu, U., Akyol, İ., Kar, B., Özköse, E., Ekinci, M. S., 2008.** Anaerobik rumen funguslarının izolasyonu, tanımlanması ve kültür koleksiyonunun oluşturulması. *Hayvansal Üretim*, 49(2).
- Dagar, S. S., Kumar, S., Griffith, G. W., Edwards, J. E., Callaghan, T. M., Singh, R., Puniya, A. K., 2015.** A new anaerobic fungus (*Oontomyces anksri* gen. nov., sp. nov.) from the digestive tract of the Indian camel (*Camelus dromedarius*). *Fungal Biology*, 119(8), 731-737.
- Dehority, B. A., 1998.** Microbial interactions in the rumen. *Revista de la Facultad de Agronomía LUZ*, 15, 69-86.
- Dore, J., Stahl, D. A., 1991.** Phylogeny of anaerobic rumen Chytridiomycetes inferred from small subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *Canadian Journal of Botany*, 69(9), 1964-1971.
- Eckburg, P. B., Lepp, P. W., Relman, D. A., 2003.** Archaea and their potential role in human disease. *Infection and immunity*, 71(2), 591-596.
- Edwards, J. E., Kingston-Smith, A. H., Jimenez, H. R., Huws, S. A., Skøt, K. P., Griffith, G. W., Theodorou, M. K., 2008.** Dynamics of initial colonization of nonconserved perennial ryegrass by anaerobic fungi in the bovine rumen. *FEMS microbiology ecology*, 66(3), 537-545.
- Edwards, J. E., Shetty, S. A., van den Berg, P., Burden, F., van Doorn, D. A., Pellikaan, W. F., ... & Smidt, H., 2019.** Study title: Multi-kingdom characterization of the core equine fecal microbiota based on multiple equine (sub) species.
- Ellis, M., Egelund, J., Schultz, C. J., Bacic, A., 2010.** Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface?. *Plant physiology*, 153(2), 403-419.
- García, J. J., Bartolomé, D. J., Posado, R., Zúñiga, J. A., Montañés, M., 2018.** Weather conditions and rumen temperature and pH in lidia cattle. *J. Vet. Sci. Technol*, 9(532), 10-4172.
- Gold, J. J., Heath, I. B., Bauchop, T., 1988.** Ultrastructural description of a new chytrid genus of caecum anaerobe, *Caecomycetes equi* gen. nov., sp. nov., assigned to the Neocallimasticaceae. *Biosystems*, 21(3-4), 403-415.

- Gruninger, R. J., Puniya, A. K., Callaghan, T. M., Edwards, J. E., Youssef, N., Dagar, S. S., Elshahed, M. S., 2014.** Anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), 1-17.
- Gupta, R., Gupta, K., Saxena, R. K., Khan, S., 1999.** Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 21, 135-138.
- Hanafy, R. A., Elshahed, M. S., Youssef, N. H., 2018.** *Feramyces austinii*, gen. nov., sp. nov., an anaerobic gut fungus from rumen and fecal samples of wild Barbary sheep and fallow deer. *Mycologia*, 110(3), 513-525.
- Hanafy, R. A., Elshahed, M. S., Liggenstoffer, A. S., Griffith, G. W., Youssef, N. H., 2017.** *Pecoramyces ruminantium*, gen. nov., sp. nov., an anaerobic gut fungus from the feces of cattle and sheep. *Mycologia*, 109(2), 231-243.
- Hanafy, R. A., Lanjekar, V. B., Dhakephalkar, P. K., Callaghan, T. M., Dagar, S. S., Griffith, G. W., ... & Youssef, N. H., 2019.** Seven new Neocallimastigomycota genera from fecal samples of wild, zoo-housed, and domesticated herbivores: Description of *Ghazallomyces constrictus* gen. nov., sp. nov., *Aklioshbomyces papillarum* gen. nov., sp. nov., *Agriosomyces longus* gen. nov., sp. nov., *Capellomyces foraminis* gen. nov., sp. nov. and *Capellomyces elongatus* sp. nov., *Joblinomyces apicalis* gen. nov., sp. nov., *Khoyollomyces ramosus* gen. nov., sp. nov., and *Tahromyces munnarensis* gen. nov., sp. nov. *bioRxiv*, 642694.
- Hanafy, R. A., Lanjekar, V. B., Dhakephalkar, P. K., Callaghan, T. M., Dagar, S. S., Griffith, G. W., ... & Youssef, N. H., 2020.** Seven new Neocallimastigomycota genera from wild, zoo-housed, and domesticated herbivores greatly expand the taxonomic diversity of the phylum. *Mycologia*, 112(6), 1212-1239.
- Harholt, J., Suttangkakul, A., Vibe Scheller, H., 2010.** Biosynthesis of pectin. *Plant physiology*, 153(2), 384-395.
- Ho, Y. W., Bauchop, T., 1991.** Morphology of three polycentric rumen fungi and description of a procedure for the induction of zoosporogenesis and release of zoospores in cultures. *Microbiology*, 137(1), 213-217.
- Ho, Y. W., Abdullah, N., Jalaludin, S., 1988.** Penetrating structures of anaerobic rumen fungi in cattle and swamp buffalo. *Microbiology*, 134(1), 177-181.
- Ho, Y. W., Abdullah, N., Jalaludin, S., 1994.** *Orpinomyces intercalaris*, a new species of polycentric anaerobic rumen fungus from cattle. *Mycotaxon (USA)*.
- Ho, Y. W., Abdullah, N., Jalaludin, S., 2000.** The diversity and taxonomy of anaerobic gut fungi. *Fungal Diversity*, 4, 37-51.

- Ho, Y. W., Bauchop, T., Abdullah, N., Jalaludin, S., 1990.** Ruminomyces elegans gen. et sp. nov., a polycentric anaerobic rumen fungus from cattle. *Mycotaxon*, 38, 397-405.
- Hobson, P. N., Wallace, R. J., Bryant, M. P., 1982.** Microbial ecology and activities in the rumen: Part I. *CRC critical reviews in microbiology*, 9(3), 165-225.
- Huang, Y., Marden, J. P., Julien, C., Bayourthe, C., 2018.** Redox potential: an intrinsic parameter of the rumen environment. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 102(2), 393-402.
- Hungate, R. E., 1969.** Chapter IV A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In *Methods in microbiology* (Vol. 3, pp. 117-132). Academic Press.
- Joblin, K. N., 1989.** Physical disruption of plant fibre by rumen fungi of the Sphaeromonas group. *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*, 259-260.
- Joblin, K. N., Naylor, G. E., 2002.** The ruminal mycoplasmas: a review. *Journal of Applied Animal Research*, 21(2), 161-179.
- Joshi, A., Lanjekar, V. B., Dhakephalkar, P. K., Callaghan, T. M., Griffith, G. W., Dagar, S. S., 2018.** Liebetanzomycespolymorphus gen. et sp. nov., a new anaerobic fungus (Neocallimastigomycota) isolated from the rumen of a goat. *MycoKeys*, (40), 89.
- Jullian, V., Riondet, C., de Vaux, A., Alcaraz, G., Fonty, G., 1998.** Comparison of metabolic activities between Piromyces citronii, an equine fungal species, and Piromyces communis, a ruminal species. *Animal feed science and technology*, 70(1-2), 161-168.
- Kamra, D. N., 2005.** Rumen microbial ecosystem. *Current science*, 124-135.
- Kar, B., Torcan, B., 2022.** Isolation, morphological identification, and xylanase characteristics of anaerobic gut fungi Neocallimastix from Anatolian wild goat. *Journal of Basic Microbiology*.
- Kar, B., Özköse, E., Ekinci, M. S., 2021.** The comparisons of fatty acid composition in some anaerobic gut fungi Neocallimastix, Orpinomyces, Piromyces, and Caecomyces. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93.
- Karaman, A., 2018.** ‘Rumen bakteriyal ve fungal populasyon dinamiğinin RT-PCR ile moleküler düzeyde belirlenmesi’ Doktora Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş, 15 s
- Karaman, A., Yücel, H., Ekinci, K., Cömertpay, S., 2022.** Comparing Cellulotic Enzyme Activities of Neocallimastix sp. in Orpin’s and Menke’s Media. *Mantar Dergisi*, 13(1), 55-61.

- Kohl, K. D., Dearing, M. D., 2016.** The woodrat gut microbiota as an experimental system for understanding microbial metabolism of dietary toxins. *Frontiers in microbiology*, 7, 1165.
- Lee, S. S., Shin, K. J., Kim, W. Y., Ha, J. K., Han, I. K., 1999.** The Rumen Ecosystem: As a Fountain Sources of Nobel Enzymes-Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 12(6), 988-1001.
- Liebetanz, E., 1910.** Die parasitischen protozoen des wiederkäuermagens. *Archiv für Protistenkunde*, 19, 19-80.
- Liu, J. H., Tsai, C. F., Liu, J. W., Cheng, K. J., Cheng, C. L., 2001.** The catalytic domain of a *Piromyces rhizinflata* cellulase expressed in *Escherichia coli* was stabilized by the linker peptide of the enzyme. *Enzyme and microbial technology*, 28(7-8), 582-589.
- Mao, H., Zhang, Y., Yun, Y., Ji, W., Jin, Z., Wang, C., Yu, Z., 2021.** Weaning age affects the development of the ruminal bacterial and archaeal community in hu lambs during early life. *Frontiers in Microbiology*, 12, 636865.
- Miller, G. L., 1959.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Nandi, A., Sharma, K., Puri, B. M., Puri, B. R., Bose, M., 2020.** BACTERIOPHAGES: Genius Viruses Leading the Future of Biotechnology. *ScienceOpen Posters*.
- Orpin, C. G., 1975.** Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Microbiology*, 91(2), 249-262.
- Orpin, C. G., 1976.** Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. *Microbiology*, 94(2), 270-280.
- Orpin, C. G., Bountiff, L., 1978.** Zoospore chemotaxis in the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*. *Microbiology*, 104(1), 113-122.
- Özköse, E., Thomas, B. J., Davies, D. R., Griffith, G. W., & Theodorou, M. K., 2001.** *Cyllamyces aberensis* gen. nov. sp. nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. *Canadian Journal of Botany*, 79(6), 666-673.
- Özköse, E., Ekinci, M. S., Akyol, İ., 2003.** Biyoteknolojik Potansiyel Olarak Anaerobik Funguslar: Kültüre Alınmaları ve Morfolojileri. *KSU Fen ve Mühendislik Dergisi*, 6(1), 129-139.
- Rose, J. K., Lee, S. J., 2010.** Straying off the highway: trafficking of secreted plant proteins and complexity in the plant cell wall proteome. *Plant Physiology*, 153(2), 433-436.

- Russell, J. B., Muck, R. E., Weimer, P. J., 2009.** Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. *FEMS microbiology ecology*, 67(2), 183-197.
- Scheller, H. V., Ulvskov, P., 2010.** Hemicelluloses. *Annual review of plant biology*, 61, 263-289.
- Sharada, R., Venkateswarlu, G., Venkateshwar, S., Rao, M. A., 2013.** PRODUCTION OF CELLULASE-A REVIEW. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 3(4).
- Smith, P. E., Waters, S. M., Gómez Expósito, R., Smidt, H., Carberry, C. A., McCabe, M. S., 2020.** Synthetic sequencing standards: a guide to database choice for rumen microbiota amplicon sequencing analysis. *Frontiers in Microbiology*, 11, 606825.
- Somerville, C., 2006.** Cellulose synthesis in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22, 53-78.
- Stabel, M., Hanafy, R. A., Schweitzer, T., Greif, M., Aliyu, H., Flad, V., ... & Youssef, N. H., 2020.** *Aestipascuomyces dupliciliberans* gen. nov, sp. nov., the first cultured representative of the uncultured SK4 clade from aoudad sheep and alpaca. *Microorganisms*, 8(11), 1734.
- Theodorou, M. K., Davies, D. R., Jordan, M. G., Trinci, A. P., Orpin, C. G., 1993.** Comparison of anaerobic fungi in faeces and rumen digesta of newly born and adult ruminants. *Mycological research*, 97(10), 1245-1252.
- Theodorou, M. K., Longland, A. C., Dhanoa, M. S., Lowe, S. E., Trinci, A. P., 1989.** Growth of *Neocallimastix* sp. strain R1 on Italian ryegrass hay: removal of neutral sugars from plant cell walls. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(6), 1363-1367.
- Vanholme, R., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W., 2008.** Lignin engineering. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 278-285.
- Vinzelj, J., Joshi, A., Insam, H., Podmirseg, S. M., 2020.** Employing anaerobic fungi in biogas production: challenges & opportunities. *Bioresource technology*, 300, 122687.
- Voigt, K., James, T. Y., Kirk, P. M., Santiago, A. L. M. D. A., Waldman, B., Griffith, G. W., ... & Lee, H. B., 2021.** Early-diverging fungal phyla: taxonomy, species concept, ecology, distribution, anthropogenic impact, and novel phylogenetic proposals. *Fungal Diversity*, 1-40.

- Wang, H. C., Chen, Y. C., Hseu, R. S.,** 2014. Purification and characterization of a cellulolytic multienzyme complex produced by *Neocallimastix patriciarum* J11. *Biochemical and biophysical research communications*, 451(2), 190-195.
- Wang, L., Zhang, K., Zhang, C., Feng, Y., Zhang, X., Wang, X., & Wu, G.,** 2019. Dynamics and stabilization of the rumen microbiome in yearling Tibetan sheep. *Scientific Reports*, 9(1), 1-9.
- Williams, A. G.,** 1986. Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiological reviews*, 50(1), 25-49.
- Williams, A. G., Orpin, C. G.,** 1987. Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi grown on a range of carbohydrate substrates. *Canadian journal of microbiology*, 33(5), 418-426.
- Wong, K. K., Tan, L. U. L., Saddler, J. N.,** 1988. Multiplicity of beta-1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological reviews*, 52(3), 305-317.
- Xue, D. S., Liang, L. Y., Zheng, G., Lin, D. Q., Zhang, Q. L., Yao, S. J.,** 2017. Expression of *Piromyces rhizinflata* cellulase in marine *Aspergillus niger* to enhance halostable cellulase activity by adjusting enzyme-composition. *Biochemical engineering journal*, 117, 156-161.
- Zhong, Y., Xue, M., Liu, J.,** 2018. Composition of rumen bacterial community in dairy cows with different levels of somatic cell counts. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3217.