

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



TUNCELİ'DEKİ DAĞ KEÇİLERİNDEN İZOLE EDİLEN
***NEOCALLİMASTIX* SP.'LERE AİT KSİLANAZ ENZİMİNİN**
KARAKTERİZASYON

Berat TORCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAR

TUNCELİ-2021

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

TUNCELİ'DEKİ DAĞ KEÇİLERİNDEN İZOLE EDİLEN
***NEOCALLIMASTIX SP.*'LERE AİT KSİLANAZ ENZİMİNİN**
KARAKTERİZASYON

Berat TORCAN
(190090005)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAR

TUNCELİ-2021

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**TUNCELİ'DEKİ DAĞ KEÇİLERİNDEN İZOLE EDİLEN
NEOCALLİMASTİX SP.'LERE AİT KSİLANAZ ENZİMİNİN
KARAKTERİZASYON**

**Berat TORCAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 14 / 12/ 2021 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

İmza

Dr. Öğr. Üyesi S. KİRAZ
Harran Üniversitesi

BAŞKAN

İmza

Dr. Öğr. Üyesi B. KAR
Munzur Üniversitesi

DANIŞMAN

İmza

Dr. Öğr. Üyesi F. C. YAZDINÇ
Munzur Üniversitesi

ÜYE

Bu tez, Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Enstitü Müdürü

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

Proje No:YLMUB020-12

NOT: Bu tezde 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.

İmza
Berat TORCAN

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAR

TEŞEKKÜRLER

Tez çalışmam sürecinde desteklerini benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAR'a , çalışmalarım süresince ihtiyaç duyduğum her türlü bilgi, kaynak vb. durumlar için destek olan, gerek kişisel gerekse bilimsel tecrübeleriyle bana bakış açısı kazandıran değerli hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ferit Can YAZDIÇ'a , Sayın Dr. Öğr. Üyesi Altuğ KARAMAN'a ve arkadaşım Şevval KAYGUSUZ'a teşekkür ederim.

Berat TORCAN
TUNCELİ - 2021



İÇİNDEKİLER

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	I
TEŞEKKÜRLER.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLolar LİSTESİ	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT	VIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Rumenlerin Mikrobiyal Ekosistemi	2
1.2. Rumen Mikroflorasının Tespiti	3
2. ANAEROBİK FUNGUSLAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER	4
2.1. Anaerobik Funguslar Taksonomisi.....	4
2.2. Anaerobik Fungusların Yaşam Döngüsü.....	8
2.2.1. Anaerobik funguslarda monosentrik yaşam döngüsü.....	10
2.2.3. Anaerobik funguslarda polisentrik yaşam döngüsü.....	11
2.3. Anaerobik Fungusların Spor Formları.....	11
2.4. Anaerobik Fungusların Dağılımı	12
2.4.1. Sindirim sistemi organlarında bulunan anaerobik funguslar	12
2.4.2. Anaerobik fungusların dünya genelinde dağılımları	12
2.5. Anaerobik Fungusların Kültüre Alınması	13
2.6. Anaerobik Fungusların cinsleri	14
2.6.1. Neocallimastix sp.	14
2.6.2. Orpinomyces sp.	15
2.6.3. Cyllamyces sp.....	16
2.6.4. Anaeromyces sp.....	16
2.7. Anaerobik Rumen Funguslarının Enzimleri.....	16
2.7.1. Anaerobik fungusların enzimatik yıkımı	16
2.7.2. Fibrolitik enzim sistemleri.....	17
2.7.2.1. Selülozlar	18
2.7.2.2. Amilaz	18
2.7.2.3. Proteazlar	19
2.7.2.4. Pektinazlar	19
2.7.2.5. Ksilanazlar	20
2.8. Anaerobik Fungusların Enzim Genetiği.....	21
3. MATERYAL VE METOT	23
3.1. Besiyeri Hazırlanması ve Sterilizasyonu	23
3.1.1. Rumen sıvısının saflaştırılması ve saklanması	23
3.1.2. Anaerobik besiyeri.....	24
3.1.3. Anaerobik besiyerinde bakteri büyümesini engelleyici antibiyotik ilavesi.....	25
3.2. Anaerobik Fungusların İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	26
3.2.1. Anaerobik fungusların izolasyonu.....	26
3.2.2. Anaerobik fungusların saflaştırılması.....	27
3.3. Enzim Analizleri.....	28
3.3.1. Enzim ekstraktlarının hazırlanması	28
3.3.2. Enzim aktivitesinin belirlenmesi	28
3.3.3. Fibrolitik enzim çeşitliliğinin incelenmesi	28

3.3.4. Optimum sıcaklık değerin belirlenmesi.....	28
3.3.5. Optimum pH değerin belirlenmesi	29
3.3.6. Termal stabilitenin saptanması	29
3.3.7. pH stabilitesinin belirlenmesi	29
3.3.8. Protein tayini	29
3.3.9. Neocallimastix Standartlar	30
4. BULGULAR VE TARTISMA	32
4.1. Enzimlerin Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi	32
4.2. Enzimlerin Optimum pH'larının Belirlenmesi	36
4.4. DAF Ksilanazların Termalstabiliteleeri	40
4.5. Anaerobik Fungusların Fibrolitik Enzimlerinin Kantitatif Ölçümü	43
4.6. Metal İyonları	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
6. KAYNAKLAR.....	48



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Anaerobik fungusların yaşam döngüleri.....	8
Şekil 1.2. Anaerobik fungusların yaşam döngüsü	9
Şekil 1.3. Anaerobik Fungusların Zoosporu.....	11
Şekil 1.4. Neocallimastix sp.....	14
Şekil 1.5. Orpinomyces sp.....	15
Şekil 1.6. Rumen sıvısının hazırlanması.....	22
Şekil 1.7. Yabani keçilerden dışkı örneklerinin alınması.....	23
Şekil 1.8. Anaerobik Fungusların izalasyonu.....	25
Şekil 1.9. Anaerobik Fungusların Saflaştırılması.....	27
Şekil 2.1. Farklı BSA konsantrasyonları ile elde edilen kalibrasyon grafiği ve denklemi.....	20
Şekil 2.2. Glikoz standartı	30
Şekil 2.3. Ksiloz Standart.....	31
Şekil 2.4. DAF-1-Samanlı ortamda gelişen <i>Neocallimastix sp</i>	33
Şekil 2.5. DAF-2-Samanlı ortamda gelişen <i>Neocallimastix sp</i>	33
Şekil 2.6. DAF-3-Samanlı ortamda gelişen <i>Neocallimastix sp</i>	34
Şekil 2.7. DAF-1-Glikozlu ortamda gelişen <i>Neocallimastix sp</i>	34
Şekil 2.8. DAF-2-Glikozlu ortamda gelişen <i>Neocallimastix sp</i>	35
Şekil 2.9 DAF-3-Glikozlu ortamda gelişen <i>Neocallimastix sp</i>	36
Şekil 3.1. Samanlı DAF KSilanaz pH.....	37
Şekil 3.2. Samanlı DAF Likenaz pH.....	38
Şekil 3.3. Samanlı DAF CMCaz pH.....	38
Şekil 3.4. Glikozlu DAF Ksilanaz pH.....	39
Şekil 3.5. Glikozlu DAF Likenaz pH.....	40
Şekil 3.6 Glikozlu DAF CMCaz pH.....	40
Şekil 3.7. DAF-1-Glikozlu ortamda gelişen <i>Neocallimastix sp</i>	41
Şekil 3.8. DAF-2-Glikozlu ortamda gelişen <i>Neocallimastix sp</i>	41
Şekil 3.9. DAF-3-Glikozlu ortamda gelişen <i>Neocallimastix sp</i>	42
Şekil 4.1. DAF-1-Samanlı ortamda gelişen <i>Neocallimastix sp</i>	42
Şekil 4.2. DAF-2-Samanlı ortamda gelişen <i>Neocallimastix sp</i>	42
Şekil 4.3. DAF-3-Samanlı ortamda gelişen <i>Neocallimastix sp</i>	43

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Anaerobik fungusların sınıflandırılması.....	5
Tablo 1.2. Anaerobik fungusların farklı morfolojik özellikleri.....	6-7
Tablo 1.3. Anaerobik fungus besiyeri içeriği.....	24-25
Tablo 1.4. <i>Neocallimastix sp.</i> DAF1, DAF2 ve DAF3'ün samanlı ortamdaki hücre dışı toplam ($\mu\text{mol/dk/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) ksilanaz enzim aktivitesinin günlere göre belirlenmesi.....	43
Tablo 1.5. <i>Neocallimastix sp.</i> DAF1, DAF2 ve DAF3'ün glikozlu ortamdaki hücre dışı toplam ($\mu\text{mol/dk/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) ksilanaz enzim aktivitesinin günlere göre belirlenmesi.....	44
Tablo 1.6. Metal iyonlarının ve kimyasal reaktiflerin konsantrasyonlarının DAF1 ksilanaz enzimleri üzerindeki etkileri ($\% \pm \text{St.Hata}$).....	44
Tablo 1.7. Metal iyonlarının ve kimyasal reaktiflerin konsantrasyonlarının DAF2 ksilanaz enzimleri üzerindeki etkileri ($\% \pm \text{St.Hata}$).....	45
Tablo 1.8. Metal iyonlarının kimyasal reaktiflerin konsantrasyonlarının DAF3 ksilanaz enzimleri üzerindeki etkileri ($\% \pm \text{St.Hata}$).....	46

ÖZET

Doğadan, çeşitli endüstriler için suş mühendisliğini ve biyolojik işlemeyi yürütmeye devam eden çok sayıda mantar enzimi tanımlanmıştır. Bununla birlikte, bir dizi dal araştırılmış olsa da, mantar krallığının büyük çoğunluğu endüstriyel uygulamalar için keşfedilmemiş durumda. *Neocallimastigomycota* gibi anaerobik mantarlar, son zamanlarda mantar krallığı arasında biyokütleyi bozan enzimlerin en büyük çeşitliliğini barındırdığı tespit edilmiştir. Anaerobik funguslar (AF), doğada yenilenebilir enerji kaynağı olarak bulunan lignoselülozik biyokütlenin sindirilmesinde rol oynayan, genellikle herbivor hayvanların, son çalışmalarla deniz hayvanları ve sürüngenlerin de sindirim sisteminde bulundukları belirlenen, şimdiye kadar bilinen tek zorunlu AF grubunu oluşturan ender canlılardır. Biyoteknolojik uygulamalar açısından önemli olan rumen fungusları, Tunceli’de yayılış gösteren Anadolu Yaban Keçilerine (*Bezoar-Capra aegagrus*) ait dışkı örneklerinden izole edilmiş, morfolojik olarak cins düzeyinde *Neocallimastix spp.* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatlardan yüksek enzim aktivitesine sahip olanlar seçilerek (DAF1, DAF2 ve DAF3) diğer analizlerde kullanılmıştır. Ksilanaz, likenaz ve karboksimetil selüloz enzimlerinin çalıştığı optimum pH, sıcaklık, inkübasyon süreleriyle enzimlerin termal stabilitesi belirlenmiştir. Enzim aktiviteleri yüksek oranda ekstraselüler olarak bulunmuştur. Enzim aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık, ksilanı kullanılan izolatlarda sırasıyla 6 ve 50°C olarak belirlenmiştir. Samanlı besiyerinde geliştirilen izolatların (DAF1,DAF2 ve DAF3) ksilanazları için spesifik aktivite için sırasıyla 499±19,29, 560,42±9,39 ve 513,01±29,22 µmol/dk/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca çalışmada kullanılan metal iyonlarının 1 mM konsantrasyonları enzim aktivitesi üzerinde olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Anaerobik funguslar, *Neocallimastix*, Dağ keçileri, ksilanaz

ABSTRACT

Characterization of Xylanase Enzyme From *Neocallimastix* Sp.'s Isolated From Mountain Goats in Tunceli

Numerous fungal enzymes have been identified from nature that continue to drive strain engineering and bioprocessing for a variety of industries. However, while a number of branches have been explored, the vast majority of the fungal kingdom remains unexplored for industrial applications. Anaerobic fungi, such as *Neocallimastigomycota*, have recently been found to harbor the greatest diversity of biomass-degrading enzymes among the fungal kingdom. Anaerobic fungi (AF) are rare organisms that play a role in the digestion of lignocellulosic biomass, which is a renewable energy source in nature. Rumen fungi, which are important in terms of biotechnological applications, were isolated from stool samples of Anatolian Wild Goats (*Bezoar-Capra aegagrus*) distributed in Tunceli, morphologically at genus level *Neocallimastix* spp. has been defined as. Among these isolates, those with high enzyme activity (DAF1, DAF2 and DAF3) were selected and used in other analyzes. The thermal stability of the enzymes was determined with the optimum pH, temperature, incubation times of xylanase, lichenase and carboxymethyl cellulase enzymes. Enzyme activities were found to be highly extracellular. The optimum pH and temperature for enzyme activity were determined as 6 and 50°C, respectively, in the isolates using xylan. The specific activity for xylanases of the isolates (DAF1, DAF2 and DAF3) grown in straw medium was found to be 499 ± 19.29 , 560.42 ± 9.39 and 513.01 ± 29.22 $\mu\text{mol/min/ml}$, respectively. In addition, 1 mM concentrations of metal ions used in the study have been shown to have a positive effect on enzyme activity.

Keywords: Anaerobic fungi, *Neocallimastix*, Mountain goats, xylanase

1. GİRİŞ

Otçul hayvanlar yeni herbivorların bir kısmının gastrointestinal sistemlerinde de bulunan mikroorganizmalar tarafından salgılanan çeşitli karbonhidrat hidrolize edici enzimlerin bitkisel meteryallerdeki karbonhidratları kullanırlar. Otçul hayvanların performansı ve üretimi, mikrobiyal ekosistem ve mikroorganizmalarla yakından ilişkilidir. Bundan dolayı bilim adamlarının mikroorganizmaları izole etmemeyi, tanımlamayı ve karakterize edilmiştir. Bununla birlikte, anaerobik funguslar (AF), fiziksel ve biyokimyasal reaksiyonlar yoluyla lifi bozarlar. Lif bozulması sırasında, anaerobik funguslar rizoid liflerini lif matrisine nüfuz eder ve hem karbonhidrat hidrolize edici enzimler hem de protein hidrolize edici enzimle salgılar.

Kırk yıldan fazla bir süredir, anaerobik funguslar karbonhidrat parçalayan enzimler, hayvansal üretimde, gıda, kâğıt, kumaş ve biyoenerji gibi diğer endüstriler için umut verici kaynaklar edilmiştir. Bu nedenle, bir çok bilim adamı anaerobik fungusların otoburların ön bağırsaklarından ya da arka bağırsaklarından izole edip tanımladı.. Bununla birlikte, kültür koşullarındaki zorluklar nedeniyle otçulların gastrointestinal sisteminden yalnızca sınırlı sayıda anaerobik funguslar izole edilmiştir.

Ayrıca, anaerobik mantarların sekans analizi, yüksek adenin (A) ve timin'in(T) tekrarlarını engellenmiştir. Son zamanlarda, yeni nesil sıralayıcı (NGS) kullanılarak yüksek verimli sıralamanın geliştirilmesi, fungal genom ve kültürlenme tekniği olmadan analiz yapıldı. Rumen'in mikrofloras bakımından zengin olmasından dolayı ruminantlar tarafından daha fazla parçalanmalarına sebep olmaktadır. Bundan dolayı ruminantlarda bitki hücre duvarının yıkımı rumen'de meydana gelir. Bu yıkımda protozoalar, funguslar ve bakteriler gerçekleştirir (Coleman,1978). Zaten yaklaşık olarak son 50 yıldaki gelişmelere bakılırsa sadece bitki ile beslenenlerin sindirim sistemlerindeki mikroorganizmalar ve rumen ekosistemi hakkında daha fazla bilgi elde edilmiştir. Ancak sindirim sistemlerinde bulunan bakterilerin kültüre alınması ve karakterize olmaları bu kadar ileri seviyedeyken diğer bir mikroorganizma olan fungusların son 25-30 yıl içerisinde önemleri anlaşılmıştır. Fungusların anaerobik olarak yaşamlarını sürdüremeyecek görüşünü (Foster, 1949), Orpin'in (1975) de anaerobik fungusların zoosporlar olduğunu göstermesiyle bu tez çürütülmüş ve anaerobik funguslar üzerinde çalışmalar hızlanmıştır. Bu çalışmalardan itibaren anaerobik fungusların ruminant ve memeli herbivorların sindirim sistemlerindeki varlığında kesinleşti.

Geviş getiren ve ot ile beslenen hayvanların mideleri 4 kısımdan oluşmaktadır. Bunlar retikulum, omasum, rumen ve abomasum. Bunlar içerisinde en büyük kısmı rumen oluşturmaktadır. Retikulumla beraber koyunlarda 10 sığırlarda ise 150 litredir (Hotsan and Wallace, 1982a).

Yeni Dünya'ya gelmiş ruminantların mide kısmında bulunan rumen işlevsiz ve küçük haldedir. Bunun sebebi o dönemde temel besin kaynağının süt olmasıdır. Hayvanın 2-3 haftalık olmasıyla beraber midesine oluşturan 4 kısımdan biri olan rumen büyümeye ve işlevini artırmaya başlar, bunun sebebi ise sütün yanında tahıl ve samanı tüketmesidir. Yani Rumen'in büyümesinde tahıl ve saman etkin bir rol oynamaktadır. Hayvanın otlamaya başlamasıyla beraber Rumenlerin işlevi artar ve hayvanın 6 ile 9 haftalık olduğu zaman rumen'in tamamen olgunlaşır.

1.1. Rumenlerin Mikrobiyal Ekosistemi

Herbivorların sindirim sistemleri birçok kısımdan oluşur. Bunlardan kısaca bahsederek ince bağırsak, kalın bağırsak, mide borusu, vb. organlardır.. Ancak bazı otçulların sindirim sisteminde bulunan mideye ek olarak dört bölüm daha bulunmaktadır. Bunlar retikulum, rumen, omasum ve abomasum dır.

Herbivorların kendi aralarında geviş getiren ve geviş getiremeyen olarak iki gruba ayrılırlar. Otçulların bu iki grubunda da ruminant ve sekum mideleri, yedikleri lifli bitkilerden daha fazla yararlanmak için bunların midede parçalanma sürelerini uzatmaktadır (Savage, 1977). Fakat bu durumunun rumenin kapasitesini belirli miktarda kısımtır, buda otçul hayvanların yem alımını kısıtlamaktadır. Otçullar tarafından alınan besinlerden daha iyi yararlanmak için ve ihtiyaçları olduğu besin maddelerini almaları için mikroorganizmalar işlenmektedir.

Anaerobik fungusların keşfi Orpin(1975) tarafından yapıldığı zamana kadar, rumenin sadece protoza ve bakterilerden meydana geldiği söylenmekteydi. Orpin(1975) tarafından yapılan bu keşiften sonra büyük bir olasılıkla bütün otçulların rumen fungusları izole olmuştur (Ho ve Abdullah, 1999). İzole olan bu rumen funguslar 6 cins olarak belirlenmiştir. Yapılan bu sınıflandırmada rumen fungusların tallus gelişimine ve morfolojisine bakılarak yapıldı.

Rumenler 3 ana yaşam evresine sahiptirler. Bunlar hareketli zoospor evresi, üreme evresi ve hareketsiz vejetatif evresidir. Bu yaşam evrelerinin dışında rumenlerin

sindirim sistemlerini meydana getiren herhangi bir bölümden ya da dışkıdan izole edildikleri için dirençli spor kesesinden bir yapı oluşturarak yukarda belirtilen 3 ana yaşam evresi ek olarak başka bir yaşam evresinin vardır (Theodorou ve ark., 1990; Davies ve ark., 1993).

1.2. Rumen Mikrofloransının Tespiti

Yeni doğan geviş getirenlerin rumenlerinde selülozik mikroorganizmalar bulunmaz ve yedikleri süttten gerekli besinleri sağlarlar. Streptococcus ve Lactobacillus, yeni doğan geviş getiren hayvanların sindirim sistemine hakimdir ve geviş getirenlerin ana besin kaynağı süttür (Hobson and Wallace, 1982b). Yetişkin hayvanların aksine, yeni doğan ve yavru hayvanların yemek borusunda sadece laktik asit bakterileri değil, aynı zamanda diğer mikrobiyotlarda bulunur.

Anaerobik sindirim mantarlarının ortak habitatı, yetişkin ruminantların sindirim sistemidir, ancak yeni doğan hayvanlardan 7. günden önce anaerobik funguslar izole edilmemiştir. Fonty ve arkadaşları (1987) Çiftlik koşullarında yetiştirilen veya beslenmeleri yetişkin hayvanlardan 2 ila 110 gün süreyle ayrılmış kuzuların rumenindeki mikrobiyal popülasyonları belirlemek için çalışmalar yapmıştır.

Theodorou ve arkadaşları (1993) da 4-5 haftalık yeni doğan kuzu ve buzağların taze dışkılarında anaerobik mantarları başarıyla gözlemledi. Elde edilen verilere göre farklı olgunluktaki otçulların sindirim sistemi organlarında bulunan anaerobik mantar sayısının farklı olduğu söylenebilir. Protozoa, rumendeki üç ana mikrobiyal gruptan biri olmasına rağmen, yeni doğan kuzuların sindirim sisteminde nispeten geç gözlenmiştir. Doğumdan sonraki 15 ila 20 gün içinde yeni doğan kuzuların rumeninde protozoa gözlemledi. Protozoa ve bakterilerin yetişkin hayvanlardan yavrulara dönüşümü emzirme, tükürük veya su paylaşımı yoluyla olabildiği düşünülmektedir. Çünkü geviş getirme sürecinde çok miktarda rumen içeriği ağza doğru hareket etmekte ve kalış süresince işkembe mikroorganizmaları tükürük ile temas etmektedir (Hobson, 1971). Öte yandan, anaerobik mantarların otçullar arasında tükürük veya yemle kontamine olmuş dışkı yoluyla aktarıldığı söylenir.

Theodorou ve arkadaşları (1990) Anaerobik mantarların kuru dışkıdan 10 ay sonra izole edilmesi bu görüşü desteklemektedir.

2. ANAEROBİK FUNGUSLAR HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Fungal alemde, Neocallimastigomycota şimdiye kadar belirlenmiş tek zorunlu anaerobik fungustur. Bu filumun üyeleri, hareketsiz evrenin, yeni nesli serbest bırakmak için patlayan bir veya daha fazla sporangia içinde kamçılı zoosporlar ürettiği, değişen bir yaşam döngüsü sergiler (Theodorou ve ark., 1996). Hareketli zoosporlar daha sonra besin açısından zengin ortamları kolileşerek, bitki biyokütlesini oluşturur (Griffith ve Baker, 2010; Dollhofer ve ark., 2015). Buda Anaerobik bağırsak mantarlarının rumen ortamında bitki biyokütlesinin ilk kolonizörü olarak görülmesine yol açan bir gözlem.

Neocallimastigomycota'nın farklı karmaşık bitki biyokütlesini bozma yeteneği temel olarak iki fizyolojik özellikten kaynaklanır: birincisi, mekanik parçalanmaya yol açan (hif ve / veya apressoria benzeri) büyüme modelleri ve ikincisi, salgıladıkları geniş enzim dizileri. Bu enzimler arasında farklı glikozit hidrolazlar, polisakkarit liyazlar ve karbonhidrat esterazlar bulunur (Wang ve ark.,2011).

Neocallimastigomycota'nın genomik yapısı (büyük genom, yüksek AT içeriği, çok katlı tekrarlar) sekanslama girişimlerini engelleyip genom birleştirme ve sekans hizalamalarını zorlaştırır, ancak son on yılda ise genomik bilgide bir artış görülmektedir (Youssef ve diğerleri). Bununla birlikte, ilgili dizilerin nitelikleri, Anaerobik fungusların zorlu genom yapısı nedeniyle büyük ölçüde değişir. Bütün genom dizilemesini mümkün kılmak için dizileme tekniklerinin yanı sıra ilgili biyoinformatik araçların iyileştirilmesi gereklidir.

Neocallimastigomycota'nın genomik ve transkriptomik konusu üzerine yapılmış bir çalışmada bkz. (Edwards ve ark. (2017). DNA dizi verilerinin incelenmesinden sonra, genetik değiştirme protokolleri üzerinde girişimler yapılmıştır. Durand ve ark.. (1997), AF türlerinin geçici dönüşümü için bir protokol önerirken, Calkins ve ark. (2018), gelişimsel olarak senkronize edilmiş zoosporların önceki koleksiyonuna dayanan RNA girişimine dayalı genomik değişiklik için bir protokol oluşturdu (Calkins ve diğerleri, 2016).

2.1. Anaerobik Funguslar Taksonomisi

Rumende anaerobik fungusların keşfi diğer mikroorganizmalara göre yeni olduğu için, cins ve tür belirleme kriterleri tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır ve bu konu hala eleştiriye açıktır (Ho ve Barr, 1995). Açıkça tanımlanmış morfolojik özelliklerin olmaması

nedeniyle, anaerobik fungusların tanımlanması ve sınıflandırılması zordur. Sonuç olarak, yaklaşık 30 yıl önce rapor edilmiş olmasına rağmen, anaerobik fungusların çeşitliliği hakkında çok az şey bilinmektedir. Zoosporlarının ince yapısı düşünüldüğünde, anaerobik mantarlar Chytrid sırasına göre Spizellomycetales düzeninde ortaya çıkar.

Başlangıçta multiflagella tek merkezli anaerobik *Neocallimastix* fuungusunu içeren yeni bir callimastigaceae familyası oluşturulmuştur, ancak daha sonra bu kategori altında tüm tek merkezli, çok merkezli, monoflagellated ve polyflagellated zoosporlar Anaerobik funguslara dahil edilmiştir (Heath ve ark., 1983; Barr ve ark., 1989).

Filogenetik analize dayalı Rumen fungusların Clostridium'un en temel türü olduğuna dair raporlar bulunsa da, fuguslar diğer gruplardan ayrılmıştır, ancak son moleküler filojeni analizine bağlı olarak, fungus aleminde kapsamlı bir filogenetik sınıflandırması yapılmış ve anaerobik rumen fungusu olarak sınıflandırılmıştır.

Tablol 1.1. Anaerobik fungusların sınıflandırılması

Alem	Fungi
Filum	Neocallimastigomycota
Sınıf	Neocallimastigomycetes
Takım	Neocallimastigales
Familya	Neocallimastigaceae
Cins	<i>Neocallimastix</i> , <i>Piromyces</i> , <i>Orpinomyces</i> , <i>Cyllamyces</i> , <i>Caecomyces</i> , <i>Anaeromyces</i>
Tür	<i>frontalis</i> , <i>communis</i> , <i>joyonii</i> , <i>aberensis</i>

Pek çok türün farklı morfolojik özelliklere sahip olması, rumen funusların sistemindeki temel sorun olarak kabul edilmektedir(Barr ve ark., 1989). Ek olarak, rumen funguslarının sıcaklı'ğa duyarlılığı, fungusun gelişim aşamalarının mikroskop altında incelenmesini engeller (Ho ve Barr, 1995). Optik mikroskopi ile gözlemlenen çeşitli morfolojik özellikler, cins düzeyinde anaerobik fungusları tanımlamak için yeterliyse, bu morfolojik özellikler kültür koşullarına göre değişebilir. Yapısal özelliklerin besiyerinde kullanılan karbon kaynağına, kültürün yaşına ve kullanılan yönteme bağlı olarak değişir (Barr ve ark., 1995).

Liebetanz, ilk olarak *Piromyces* cinsinin adının *Piromonas* olduğunu, ancak *Piromonas* adının protozoa ile karıştırıldığından dolayı geçersiz olduğunu bildirdi. *Piromonas communis* adı ilk olarak Orpin (1977a) tarafından anaerobik funguslar için kullanılmıştır. Günümüzde anaerobik fungusların 20 cins altında 43 türü tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır.

Tablo 1.2. Ruminal anaerobik fungusların sınıflandırılması ve farklı morfolojik özellikleri gösterilmiştir.

Cins	Tür	Kamçı Sayısı	Tallus Yaprakları	Rizoid Şekilleri
<i>Agriosomyces</i>	<i>A. longus</i>	Tek	Monosentrik	Dallanmış
<i>Aklioshbomyces</i>	<i>A. papillarum</i>	Tek	Monosentrik	Dallanmış
<i>Buwchfawromyces</i>	<i>B. eastonii</i>	Tek	Monosentrik	Dallanmış
<i>Capellomyces</i>	<i>C. elongates</i>	Tek	Monosentrik	Dallanmış
	<i>C. foraminis</i>	Tek	Monosentrik	Dallanmış
<i>Joblinomyces</i>	<i>J. apicalis</i>	Tek	Monosentrik	Dallanmış
<i>Khoyollomyes</i>	<i>K. ramosus</i>	Tek	Monosentrik	Dallanmış
<i>Oontomyces</i>	<i>O. anksri</i>	Tek	Monosentrik	Dallanmış
<i>Pecoramyces</i>	<i>P. ruminantium</i>	Tek	Monosentrik	Dallanmış
<i>Piromyces</i>	<i>P. citronii</i>	Tek	Monosentrik	Dallanmış
	<i>P. communis</i>	Tek	Monosentrik	Dallanmış
	<i>P. cryptodigmaticus</i>	Tek	Monosentrik	Dallanmış
	<i>P. dumbonicus</i>	Tek	Monosentrik	Dallanmış
	<i>P. finnis</i>	Tek	Monosentrik	Dallanmış
	<i>P. irregularis</i>	Tek	Monosentrik	Dallanmış
	<i>P. mae</i>	Tek	Monosentrik	Dallanmış

	P. minutus	Tek	Monosentrik	Dallanmış
	P. polycephalus	Tek	Monosentrik	Dallanmış
	P. rhizinflatus	Tek	Monosentrik	Dallanmış
	P. spiralis	Tek	Monosentrik	Dallanmış
Tahromyces	T. munnarensis	Tek	Monosentrik	Dallanmış
Liebetanzomyces	L. polymorphus	Tek	Monosentrik	Dallanmış
Feramyces	F. austinii	Çok	Monosentrik	Dallanmış
Ghazallomyces	G. constrictus	Çok	Monosentrik	Dallanmış
Neocallimastix	N. californiae	Çok	Monosentrik	Dallanmış
	N. cameroonii	Çok	Monosentrik	Dallanmış
	N. frontalis	Çok	Monosentrik	Dallanmış
	N. hurleyensis	Çok	Monosentrik	Dallanmış
	N. patriciarum	Çok	Monosentrik	Dallanmış
	N. variabilis	Çok	Monosentrik	Dallanmış
Anaeromyces	A. contortus	Tek	Polisentrik	Dallanmış
	A. elegans	Tek	Polisentrik	Dallanmış
	A. mucronatus	Tek	Polisentrik	Dallanmış
	A. polycephalus	Tek	Polisentrik	Dallanmış
	A. robustus	Tek	Polisentrik	Dallanmış
Orpinomyces	O. bovis	Çok	Polisentrik	Dallanmış
	O. intercalaris	Çok	Polisentrik	Dallanmış
	O. joyonii	Çok	Polisentrik	Dallanmış
Caecomycetes	C. churrovii	Tek	Monosentrik	Küresel
	C. communis	Tek	Monosentrik	Küresel

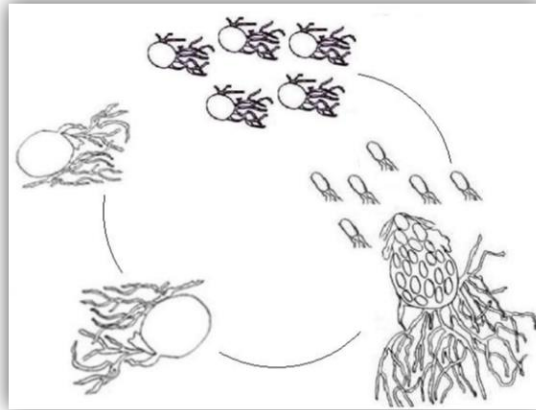
	<i>C. equi</i>	Tek	Monosentrik	Küresel
	<i>C. hurleyensis</i>	Tek	Monosentrik	Küresel
	<i>C. sympodialis</i>	Tek	Monosentrik	Küresel
<i>Cyllamyces</i>	<i>C. aberensis</i>	Çok	Polsentrik	Küresel

2.2. Anaerobik Fungusların Yaşam Döngüsü

Anaerobik funguslardan yaşam döngüsü, hareketli ve hareketsiz sporangia'yı içerebilen tallus aşamaya kadar değişir. Zoosporlar bitkiye bağlandıktan sonra, sporangia ve rizomlar içeren büyük bir bitkisel yapı oluştururlar.

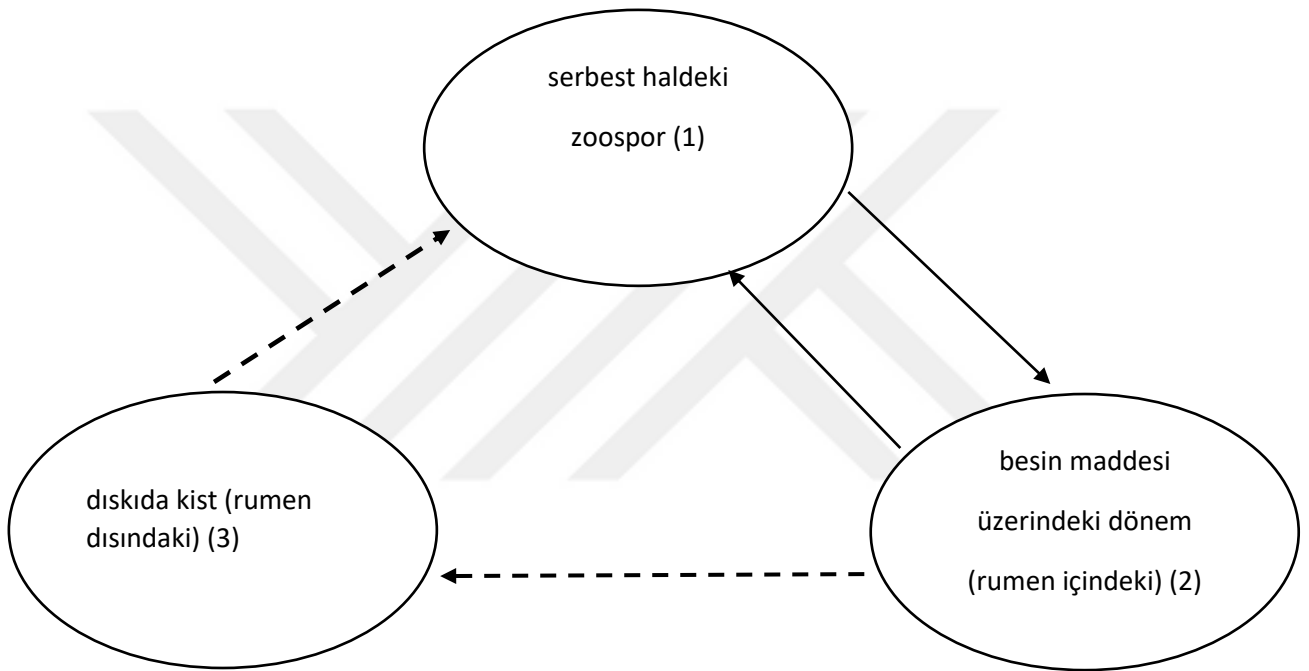
Tek merkezli funguslarda endojen ve eksojen vardır. Tek merkezin fungusların gelişiminde, her tallusta bir sporangia vardır ve sadece çekirdek içerir (Barr ve ark., 1989).

Çok merkezli fungusların, kistleri oluşturan zoosporlardan rizoma taşınır ve nükleer bölünme yoluyla her bir birey fungusların farklı kısımlarında birkaç sporangia oluşturur (Barr ve ark., 1989). Bu nedenle, çok merkezli funguslarda zoospor görülmez, çünkü üremek için zoosporları serbest bırakmalarına gerek yoktur. Zoospor oluşumundan sonra, serbest yüzen zoosporlar rumen sıvısında birkaç saat hareket edebilir. Zoosporlar, yeni yenen bitki kısımlarına kemotaksis yoluyla doğrudan yönlendirilir. Zoosporlar, substrata alınmadan önce kamçısını kaybederler ve bitkisel büyüme başlar ve kök benzeri yapı gelişir (Orpin ve Bountiff, 1978).



Şekil 1.1. Anaerobik fungusların yaşam döngüsü

Anaerobik funguslar, doğaları gereği anaerobik ve oksijene toleranssız olmalarına rağmen, taze dışkıdan ayrılabilir ve kuru dışkıda 10 ay yaşayabilir (Lowe et al., 1987b; Wubah et al., 1991a). Bu sonuçlar, anaerobik fungusların oksijene karşı önemli bir toleransa sahip olabileceğini göstermektedir (Davies et al., 1993a, b). Buna göre şu sonuca vardılar. Anaerobik fungusların yaşam döngüleri üç kısımdan oluşur 1) serbest zoosporlar, 2) vejetatif tallus (rumen içindeki), 3) hayatta kalabilen yapılar (rumen dışındaki).



Şekil 1.2. Anaerobik fungusların yaşam döngüleri (Davies et al., 1993b). Sürekli oklar normal yaşam halkasını gösterirken, kesikli oklar dışkıdaki oksijene dayanıklı alternatif halkayı göstermektedir.

Çok merkezli fungusların yaşam döngüsü, tek merkezliye göre daha kısadır. Çok merkezli fungusların, kapsüllenmiş zoosporlar substrat partikülleri üzerinde filizlenir ve kök benzeri yapılar oluşturur. Çekirdek, kapsüllenmiş zoosporların dışındaki rizomlara göç eder ve zoosporlar işlevsiz hale gelir.

2.2.1. Anaerobik funguslarda monosentrik yaşam döngüsü

Tek merkezli bir fungusun yaşam döngüsü aktif zoosporangium, besleyici olmayan zoosporangium ve bu aşamalar arasındaki değişimlerden oluşur. Flagellar zoosporlar sporangia'dan salınır ve kistleri oluşturmak için flagella saçar. Kistlerin çimlenmesi, germ tüplerinin üretimi yoluyla gerçekleşir ve ardından rizoidler gelişir (Orpin, 1977). Hücre gövdesi sporangia'da büyür ve döngü tamamlandıktan sonra sporangia'dan salınır.

Sporangia'dan boşaltıldıktan sonra, zoosporlar genellikle birkaç saat rumen sıvısı içinde yüzer ve rumende ki bitki kısımlarına yapışır. Zoosporlar, taze bitki parçalarına yapışmadan önce genellikle flagella'yı kaybeder(Heath ve ark., 1986). Bu kistler bitki hücre duvarlarına zarar verebilir ve hücrelerde nodüllere neden olabilir. çimlenme. Bu nedenle vejetatif büyüme dönemi başlar. Bu dönemde, nükleer fisyonun neden olduğu nükleer (çekirdek) proliferasyon nedeniyle, sporangia'da birçok zoospor oluşur(Munn, 1994).

Anaerobik bakteri, *Chemophora*, *Piromyces* ve *Neocallimastix*'in rizobyumu yüksek bir dallanma oranı gösterirken, *Cyllamyces* ve *Caecomycetes*'in çoğu tek bir doğrusal rizobi yapısına sahiptir. Gelişmiş zoosporlar, sporangia'da kapsülden ayrılır. Sonrasında zoosporlar serbestçe yüzmeye başlar. Böylece monosentrik yaşam döngüsü tamamlanır (Munn, 1994; Ozkose ve ark., 2001).

Wubah ve ark. (1991), *Neocallimastix sp.* Georgia ineğinden izole edilmiştir. Gelişmiş Tali'den yetiştirilen bu türün morfolojik çalışmasında, zoosporlarının geriye dönük 9-16 flegella olduğunu ve şekillerinin sıvı ortamda oval olabileceğini, ancak agarda olacaktır.

Monosentrik funguslarda, ya sporangia'da kistler oluşur ve endojen büyümesi adı verilen çekirdekler içeren zoosporlar oluşur sonrasında çekirdekler zoosporlardan göç ederek sporangia oluşturur, buna eksojen büyüme denir. Her iki durumda da, tek merkezli fungus bir sporangia oluşturur ve yalnızca sporangia bir çekirdek içerir (Barr ve ark., 1989). Bu nedenle, tek merkezli funguslarda tek bir üreme noktası vardır.

2.2.3. Anaerobik funguslarda polisentrik yaşam döngüsü

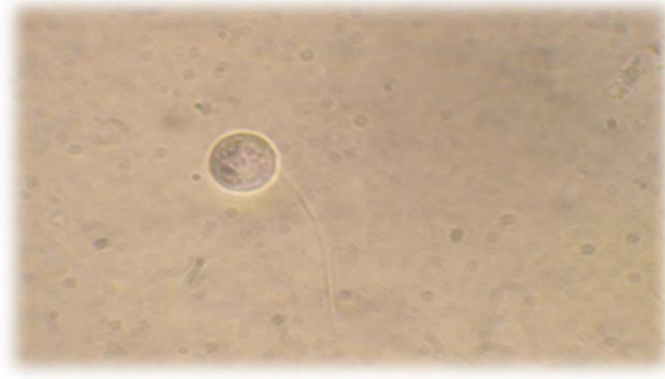
Çok merkezli funguslarda hücre çekirdeği, kistleri oluşturan zoosporlardan rizoide geçer. Nükleer bölünme yoluyla, her fungus farklı kısımlarında birkaç sporangia oluşur (Barr ve ark., 1989). Bu nedenle, çok merkezli mantarlar zoosporlarını salmadan çoğalırlar. Bundan ötürü, bu fungusların zoosporların görülmesi zordur.

Tek merkezli fungusların aksine, çok merkezli funguslar teoride sonsuz bir yaşam döngüsüne sahiptir. Yani hayatta kalmak için zoosporların salınmasına gerek duymazlar. Büyüme şekilleri uzun mantarlarınkine benzer ve liflerle çoğalırlar (Ho ve Bauchop, 1991). Tek merkezli funguslarla karşılaştırıldığında, çok az zoospor üretirler (Phillips ve Gordon, 1989).

2.3. Anaerobik Fungusların Spor Formları

"Spor" terimi, yeniden üretilebilir anlamına karşılık gelen geniş bir terimdir. Bununla birlikte, birçok bilim insanı, sınırlı ve kesin tanımlar yerine genel tanımlamalar yapmıştır. Gregory'nin (1966) tanımına göre spor, düşük su içeriği ve düşük metabolizma hızı ile uygulanabilir bir yapıdır. Alexopoulos ve Mims'e (1979) göre sporlar, aynı türden yeni bireylerin üretimine katılan, embriyo içermeyen basit üreme birimleridir.

Funguslar tarafından üretilen sporlar zenospor ve memnospor olmak üzere ikiye ayrılabilir. Zoosporlar, conidia, sporangia sporları ve sporesporlarla temsil edilen sporidia, genellikle kısa bir süre yaşar ve yeni funguslar oluşturmak yayılırlar. Öte yandan, zoosporlar ve zigotik sporlar tarafından temsil edilen kökenlerinden sapmaz ve zorlu çevre koşulları altında yeni nesil funguslara yaşam hakkı sağlar (Özköse ve ark., 2003).



Şekil 1.3. Anaerobik Fungusların Zoosporu

2.4. Anaerobik Fungusların Dağılımı

2.4.1. Sindirim sistemi organlarında bulunan anaerobik funguslar

Anaerobik funguslar, Asya fillerinden antiloplara kadar birçok otobur hayvanın sindirim sisteminden veya dışkı örneklerinden izole edildi (Trinci, 1994). Anaerobik funguslar spesifik konakçı mikroorganizmalar olmamasına rağmen, rumeni olmayan otçullardan izole edilebilecekleri bildirilmemiştir. Rumenin anaerobik fungusların ana yaşam alanıdır. Ancak bitki biyokütlesinin sindirimi sırasında bitki kısımlarına tutunan zoosporlar ve talli ağdan ayrılır; ve ince ve kalın bağırsaklara da aktığı söylenmektedir (Dehority ve Orpin, 1997). Davis'in raporuna göre, anaerobik funguslar; mide, ince bağırsak, mukus ve kalın bağırsak dahil olmak üzere tüm sindirim kısımlarından ayrılır. Anaerobik fungusları çamur, atık su ve lağım pisliği gibi sindirim sistemi dışındaki habitatlardan izole etmek için çok az sayıda çalışma yapılmıştır (Orpin, 1976; Orpin and Joblin, 1988) ve bu çalışmaların hiçbiri başarılı olamamıştır.

2.4.2. Anaerobik fungusların dünya genelinde dağılımları

Anaerobik Funguslar ilk olarak Birleşik Krallık'ta Orpin(1975) tarafından keşf edilmiştir. Bu keşiften sonra, anaerobik funguslar dünyanın farklı yerlerinde yaşayan otoburlardan izole edilmiştir.

Bilinen raporlara göre Bauchop (1979) tarafından Yeni Zelanda'da; Akin ve arkadaşları (1983) tarafından A.B.D.'de; Orpin ve arkadaşları (1985) tarafından Norveç'te;

Novazamska (1987) tarafından Çekoslovakya'da; Ho ve arkadaşları (1988) tarafından Malezya'da; Gold ve arkadaşları (1988) tarafından Kanada'da; Ushida ve arkadaşları (1989) tarafından Japonya'da; Phillips ve Gordon (1989; 1992) tarafından Avustralya'da; Morrison ve arkadaşları (1990) tarafından Güney Afrika Cumhuriyeti'nde; Kostyukovsky ve arkadaşları (1991) tarafından Rusya'da; Teunissen ve arkadaşları (1991a,b) tarafından Hollanda'da; Breton ve arkadaşları (1991) tarafından Tanzanya'da; Gaillard-Martinie ve arkadaşları (1995) tarafından Fransa'da; Ozkose ve arkadaşları (2001) tarafından İngiltere'de; Cheng ve arkadaşları (2007) tarafından Tayvan'da; Şili ve Çin'de izolasyonlar yapılmıştır.

2.5. Anaerobik Fungusların Kültüre Alınması

Rumenin redoks potansiyeli -250 ile -450 mV arasında olduğu için rumen yüksek derecede anaerobik bir ortamdır.(Hobson and Wallace, 1982b). Normal koşullar altında, rumenin pH'ı yaklaşık 6.5 ve sıcaklık 39 ° C'dir. Laboratuvar koşullarında yapılan çalışmalarda benzer rumen koşulları elde edilmiştir. Rumen bakterileri üzerine araştırma yapan bilim insanlar rumen için birçok kültürel teknik geliştirdiler.

Anaerobik funguslar genellikle sıvı ortamda, 10 ml Hungate tüplerde veya 60 ml serum şişelerinde gelişir. Anaerobik fungusların büyümesinin sürekli çalkalanan kültürlerde de gerçekleşir (Zhu et al., 1996; 1997). Joblin (1981), anaerobik fungusların çoğalmasının ve ayrılmasının "dönen tüp tekniği" ile de gerçekleştirilebileceğini göstermiştir.

Genel olarak, ortama resazurin ekledikten sonra besiyeri açık sarıya dönerse, bu, besiyerde oksijen olmadığı anlamına gelir. Ancak koyu kahverengiye dönerse oksitlenir. Kimyasal indirgenme olarak ortama sıklıkla sodyum sülfat veya sistein hidroklorür eklenir. Bir tampon olarak sodyum bikarbonat (NaHCO₃) ekledikten sonra, ortamın pH'ı 6.5 ile 8.5 arasındadır. Fungusların kültür ortamı ayrıca mineraller, proteinler ve vitaminler içerir (Orpin, 1976). Santrifüjlü rumen suyu, birçok kültür ortamı için önemli bir katkı maddesi olmasına rağmen, anaerobik funguslar rumen suyu olmadan da kültürleri yapılabilir (Lowe et al., 1985).

Kültür ortamında Çözünür veya çözünmez substratlar, karbon kaynakları olarak kullanılır. Ortamda çözünür enerji kullanıldığında sabit kültürün inkübasyon süresi 1-3

gündür; aksi takdirde selüloz ya da buğday samanı gibi enerji kullanıldığında 4-7 gün arasında değişecektir (Özköse ve ark., 2003).

İnkübasyondan sonra funguslar yeni bir ortama aktarılmalıdır. Kuluçka döneminin son aşamasında özellikle fermantasyonun son ürünü uçucu yağ asitleri açığa çıktığı için ortamın pH değeri düşer. PH değeri fungusun hayatta kalması için uygun değeri aşarsa, fungusun yaşamı için uygun ortam olmaz (Joblin and Naylor, 1993). Bu nedenle fungus belirli bir büyüme hızına ulaştıktan sonra yeni bir ortama aktarılmalıdır.

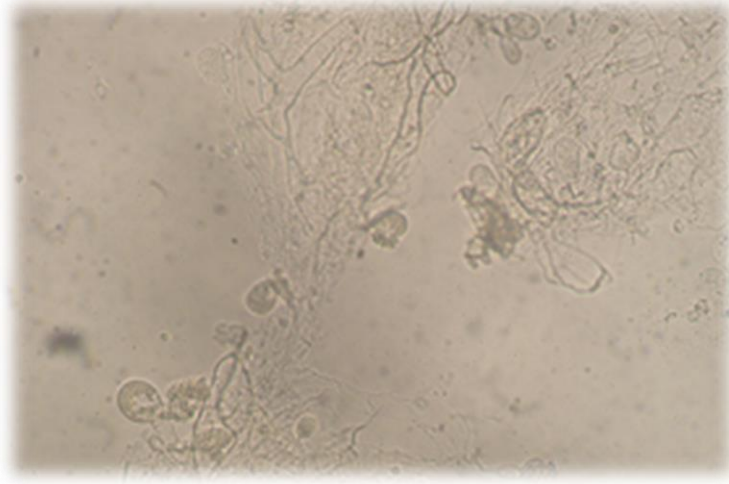
Anaerobik funguslar, laboratuvar koşullarında kesikli kültürde 5-15 gün yaşarlar (Milne et al., 1989).

2.6. Anaerobik Fungusların cinsleri

2.6.1. Neocallimastix sp.

Cyclopis'in vücut boşluğunda yaşayan tek hücreli, çok hücreli bir parazit, Weissenberg (1912, 1950) tarafından *Callimastix cyclopis* adını veren ve bir protozoon olduğuna inanan Weissenberg (1912, 1950) tarafından tanımlanmıştır. Braune (1913), koyun ve sığır rumeninde benzer bir organizma gözlemledi ve buna *Neocallimastix Frontalis* adını verdi. Bu isim rumen organizması için kullanılmıştır, Bu organizmanın vejetatif aşaması (Orpin, 1975) ökarpik, tek merkezli, hücre duvarında kitin içeriyordu (Orpin, 1977a) ve morfolojik olarak bazı chytridiomycete funguslara benziyordu. Bu türün, polifagellat zoosporuna rağmen, chytrid benzeri bir fungus olduğu sonucuna varıldı.

Bauchop & Mountfort (1981) ayrıca, bazı açılardan Braune (1913) tarafından tarif edilene benzer şekilde, rumenden izole edilmiş poli kamçılı zoosporlarla bir anaerobik fungus türünü inceledi. Heath, Bauchop & Skipp (1983), *Neocallimastix* jenerik adını doğrulamış ve tür olarak *N. frontalis*'i belirlemiştir. Cins, yeni *Neocallimastigomycota* Heath ailesine yerleştirildi ve Barr (1980) tarafından orijinal tanımının uygun şekilde değiştirilmesinden sonra *Spizellomyces* Tales sırasına yerleştirildi.

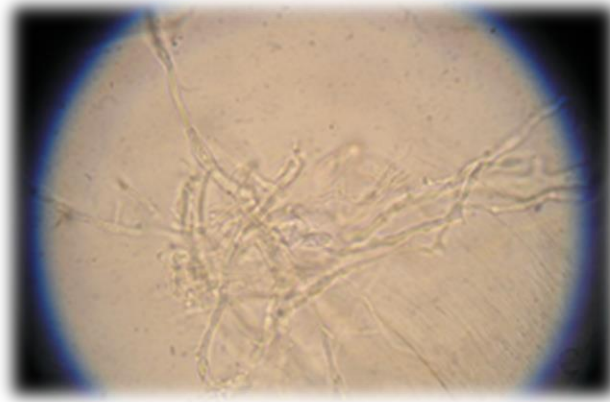


Şekil 1.4. *Neocallimastix sp.*

2.6.2. Orpinomyces sp.

Orpinomyces sp.'nin ilk tanımlamasını Barr. ve Ark., (1989) yapmıştır. Çok merkezli algler, çok merkezli zoosporlar ve geniş çekirdekli kök benzeri rizomiselyum vardır (Breton ve ark., 1989).

1989'da Barr. Ve ark., tarafından tanımlaması yapılan *Orpinomyces sp.* *Orpinomyces joyonii* olarak sınıflandırılmıştır. 1994 ise Ho. ve Ark., *Orpinomyces* cinsinin ikinci türü olarak bilenen *Orpinomyces intercalaris*'i tanımladılar.



Şekil 1.5. *Orpinomyces sp.*

2.6.3. *Cyllamyces* sp.

Özköse ve ark. (2001), inek dışkılarından izole ettikleri anaerobik fungus, şimdiye kadar keşfedilen *Neocallimastigaceae* ailesinin son cinsidir. *Cyllamyces* sp. Zoosporları küresel kamçı, tek kamçı ve bazen çift kamçılıdır. Birden fazla sporangia ve çok merkezli yaşam döngüleri bakımından *Bacillus*'tan farklıdır.

2.6.4. *Anaeromyces* sp.

Breton vd. (1990) sığır rumeninden yeni bir anaerobik fungus izole etmişlerdir. Bu fungus, çok çekirdekli rizosfer miselyumu, poliklonal asit zoosporangium ve tek flagella zoosporları içeren çok merkezli alglerle karakterizedir

2.7. Anaerobik Rumen Funguslarının Enzimleri

Orpin (1975), *N. frontalis* ve *P. Communis* yaşam döngülerini incelemiştir. Bununla beraber , daha önce protozoa olarak kabul edilen flagellar hücrelerin aslında temel anaerobik fungus zoosporları olduğundan anaerobik funguslar üzerindeki araştırmalar olmuştur. Sonraki birkaç yıl içinde Orpin, koyun rumeninden, zoosporlar ve sabit zoospor keseli anaerobik fungus tespit etti ve onlara *Neocallimastix. frontalis*, *Sphaeromonas communis* ve *Piromonas communis* adını verdi (Orpin,1975; 1976; 1977).

Işık mikroskobu altında yapılan araştırmalara ek olarak, morfolojik verilerden elde edilen bulgular da daha sağlam bir temele, yani zoospor dilimlerinin örneklenmesi ve bu dilimlerin ince yapı özelliklerinin elektron mikroskobu altında incelenmesine dayanmaktadır.

2.7.1. Anaerobik fungusların enzimatik yıkımı

Rumen mikrobiyal ekosisteminde anaerobik funguslar, en dirençli bitki dokuları da dahil olmak üzere bitki hücre duvarlarını hızla kolonize edebilen bir grup mikroorganizmadır (Borneman ve ark., 1991). Anaerobik funguslar esas olarak rumen içindeki bitkilerin kök ve yapraklarının kan damarı dokularına uzun süre yerleşir ve rumen içinde kalır (Akin ve ark., 1983).

Ksilanaz ve glikozidaz üzerinde fungal karboksimetil selülaaz (KMSaz), ferulik asit ve fumarik asit önleyici bir etkiye sahip olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, anaerobik mantarların bu fenolik bileşikler tarafından kimyasal olarak uyarılır(Wubah ve Kim, 1996).

Çok merkezli funguslar, köksap hücrelerini bitki parçalarına sıkıca tutunurlar ancak tek merkezli funguslar göre bitki hücre duvarlarını daha zor kolonileşirler(Borneman ve ark., 1989). Çok merkezli fungusların aksine, tek merkezli funguslar rizobisi substratın yüzeyinde nadir olarak görülürler (Webb ve Theodorou, 1988). Tek merkezli fungus *Neocallimastix* sp. GMLF1 ve çok merkezli fungus *Orpinomyces* sp. Bitki kısımlarının GMLF 6 tarafından kolonizasyonu görülür.

Caecomyces spp. Küresel rizomlara sahip olmaları, bitki dokularının derinliklerine girmelerini engeller (Joblin, 1989)(Gordon ve Phillips, 1989). Öte yandan, miselyal anaerobik mantarlar bitki dokularında aşırı büyür, onları rizosfer hifleri ile sarar ve epidermal bariyeri (koruyucu mumsu tabaka) yok ederek bitki hücre duvarlarını tahrip eder(Akin, 1994). Funguslar, selüloz ve hemiselüloz gibi hücre duvarı karbonhidratlarını bitki parçalarına bağlı alanlardan fermente eder(Grenet ve Barry, 1988).

Rumen bakterileri tarafından kısmen parçalanmış fenolik bitki dokuları, rumen fungusları tarafından tamamen parçalanabilir (Borneman ve ark., 1991).

2.7.2. Fibrolitik enzim sistemleri

Polisakkaritleri parçalayan anaerobik fungusların enzimlerinin çoğu rizomdan, rizosferde hiflerde ve ayrıca hücrelerin dışından salgılanır (Lowe ve ark., 1987). Ayrıca, anaerobik fungus zoosporlarını polisakkarit parçalayıcı enzimler üretir (Williams ve Orpin, 1987a). Öte yandan, immünofloresan teknolojisi, ribozom açısından zengin vejetatif hücrelerin, veziküllerin, ve hücre duvarlarının yüzeyinde bulunan zoospor çimlenmesinden başlayan enzimleri içerir. Spor oluşumu sırasında enzim üretiminin önemli ölçüde azaldığını göstermektedir. Bugüne kadar çalışılan tüm rumen fungus türlerinin selüloz, hemiselüloz ve nişasta kullanmışlardır(Breton ve ark., 1995).

Rumen funguslarının amiloglikosidaz (Pearce ve Bauchop, 1985), selülaaz (Mounfort ve Asher, 1985), amilaz (Mountfort ve Asher, 1988), ksilanaz (Mountfort ve Asher, 1989), feruloyl ve p-kumaril esteraz (Borneman ve ark., 1990), pektin liyaz (Gordon ve Phillips, 1992), proteaz (Asao ve ark., 1993), β -glikosidaz (Chen ve ark.,

1994), 1,3-1,4-beta-D-glukanaz (Chen ve ark., 1997) ve β -ksilosidaz (Gomez de Segura ve ark., 1998), enzimlerini üretmiştir.

2.7.2.1. Selülozlar

N. frontalis'in selüloz geni, katabolit inhibisyonu ile düzenlenir ve glikoz eklendiğinde, selüloz üretimi neredeyse duraksar (Mountfort ve Asher, 1985). Ama anaerobik bakterileri içeren vejetatif suşların sırasıyla yüksek seviyelerde endoglukanaz ve sellobiyohidrolaz ürettiği söylenmiştir (Fliegerova ve ark., 2004). Yeni *callimastix sp'nin* endoglukanaz üretimi Karboksimetil selüloz (KMS), avisel ve lifli selüloz gibi karbon kaynaklarının varlığında indüklenerek en üst seviyeye ulaşır (Comlekcioglu ve ark., 2008). Bununla birlikte, mayalayıcıdaki *Nepenthes frontalis* Sürekli kültürde selüloz parçalarak enzim üretir.(Ekinci ve ark., 2006). Gözlemlere göre rumen mantarlarının selüloolitik enzimleri için optimal sıcaklık ve pH değeri sırasıyla 40-50 derece ve 5,9-7,5 derece arasındır (Mountfort ve Asher, 1985; Chen ve ark., 1994; Ye ve ark., 2001).

Anaerobik funguslar ayrıca selüloz parçalanması için gerekli olan endo 1,4- β -glukanaz, ekzo 1,4-glukanaz (selobiyohidrolaz) ve β -glukozidaz üretirler (Williams ve Orpin, 1987b; Borneman ve ark., 1989). Raporlara göre, metanojenlerle birlikte kültürlen N. frontalis'in selüloz aktivitesi, en aktif selüloz kaynağı olarak kabul edilmiştir(Wood ve ark., 1986). Rumen bakterilerinin β -glikosidazı hücrelidir. Bu sebepten dolayı fungal β -glikosidaz, rumen sıvısından fibrozun uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynar ve selüloz hidrolizine bağlı olarak biriken fibrozun inhibisyonunu önler (Chen ve ark., 1994).

2.7.2.2. Amilaz

Yeni *callimastix*'in gözeneksiz kültüründen elde edilen enzim özütü, nişasta üzerinde aktiftir ve nişastanın hidrolizi nedeniyle tek bir ürün olarak glikoz elde edilir, bu da hidrolizin amiloglukosidaz tarafından katalize edildiğini gösterir (Pearce ve Bauchop, 1985).

Neocallimastix, *Piromyces* ve belirtilmemiş izolatın nişasta ve maltoz içeren kültüründe α -glukozidaz ve β -maltosidaz salgılar (Williams ve Orpin, 1987b). *Nepenthes frontalis*'in nişasta ve maltoz kültüründe Selüloz, ksilan, selobiyoz, glikoz ve ksiloz varlığında α -amilaz, α -amilaz üretimini indüklerken sentez derecesi düşüktür. Ek olarak,

maltoz, maltobiyoz, maltobiyoz ve uzun zincirli oligosakaritler son ürünler haline getirildi, ancak glikoz görülmemiştir (Mountfort ve Asher, 1988). *Yeni Callimastix*, *Piromyces* ve *Orpinomyces*'in hücre dışı nişasta yıkım aktivitesi raporlarına göre (Yanke ve ark., 1993), bu yüksek içerikli funguslar mısır nişastasını buğday ve arpa nişastasından daha hızlı ayrıştırıyor (McAllister ve ark., 1993).

2.7.2.3. Proteazlar

N. frontalis'in, çoğu hücre dışında salgılanan yüksek aktiviteye sahiptir (Wallace ve Joblin, 1985). Proteoliz EDTA gibi kenetleme maddeleri tarafından aktivitenin engellenmesi, enzimin bir metaloproteaz olduğunu gösterir (Wallace ve Joblin, 1985). *Nepenthes frontalis*'in proteazının rumen bakterilere eşdeğer olmasına rağmen, aktiviteleri bazı aerobik mantarlarıki kadar iyi değildir. Rumen funguslarının proteazları, gelişmeleri için amino asitler sağlarlar. Raporlara göre, diğer hücre dışı mantar enzimlerinin (selüloz, ksilanaz) aktivitesini değiştirir ya da bitki materyallerine nüfuz eder..

Aktif selüloolitik rumen bakterilerinin sıklıkla proteolitik aktiviteye sahip olmadığı ve bu iki özelliğin rumen funsunlarında bulunmasının özel bir durumdur (Wallace ve Joblin, 1985). *Yeni callimastix*, *Piromyces*, *Caecomycetes* ve polikentrik funguslara ait 7 suşun proteaz aktiviteleri inlenmiştir. Tüm suşlarda aminopeptidaz aktivitesi, her iki suşta da endopeptidaz aktivitesi görülürken hiçbir Karboksipeptidaz aktivitesi suşta görülmedi (Michel ve ark., 1993). *Yeni callimastix*'in proteolitik aktivitesi Rumen bakterisinden daha yüksek olması, önemli bir avantajdır (Asao ve ark., 1993).

Rumen mantarlarının hücre ve hücre dışı proteolitik aktivitesinin eşit olduğu, ancak hücre dışındaki spesifik aktivitenin daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Yanke ve ark., 1993).

2.7.2.4. Pektinazlar

Nepenthes frontalis'in hidrolizine girememesi, pektinaz olmadığını gösterir (Pearce ve Bauchop, 1985). Benzer sonucu Williams ve Opin Patrick *Nepenthes* ve *P. communis* Pektinden sınırlı miktarda indirgeyici şeker salındığı rapor etmişlerdir. Rumen mantarları, tek enerji kaynağı olarak pektin veya hidrolizatı D-galakturonik asit ve poligalakturonik asit kullanan ortamda gelişme göstermemiştir (Phillips ve Gordon, 1988). *Yeni callimastix*'in çim yaprakları içeren kültürlerde pektin bozucu enzimler ürettiği, ancak

pektinin hidrolizatının funguslar tarafından büyümesi için kullanılamadığı görülmüştür (Gordon ve Phillips, 1992). Bu durum şu görüşü desteklemektedir: Rumen fungusları rumendeki uzun yaşam döngüsü (yaklaşık 24 saat) ile ilişkili olabilir, çünkü pektin rumen mikroorganizmalarındaki bitkilerdeki tüm fibriller arasında en hızlı fermente eden polimerdir (Bauchop, 1986).

Pektinin anaerobik fungal hidrolizinin, linyin ve hemiselüloz arasındaki bağı kırarak funusun diğer kullanılamaz karbonhidratlardan yararlanmasına izin vermiştir (Theodorou ve ark., 1996).

2.7.2.5. Ksilanazlar

Ksilanaz, incelenen anaerobik fungusların tüm endopolisakkarit hidrolazları arasında en aktif enzimdir. Ksilanaz aktivitesinin, endoglukanaz aktivitesine göre 5-7 kat daha yüksektir (Borneman ve ark., 1989). Ancak Tripathi ve ark. (2007), çalışmalarında izole edilen 12 mantarın, ksilanaz aktivitesine göre daha yüksek endoglukanaz aktivitesine sahip olduğunu bulmuşlardır. *N. frontalis* esas olarak ksilanazı kültür ortamına salgılar (Mountfort ve Asher, 1989; Pearce ve Bauchop, 1985), sadece küçük bir miktarın mantar rizobisi ile ilişkilidir (Williams ve Orpin, 1987a; Lowe ve ark., 1987).

Rumen fungusları ksilanaz üretir. Ksilan en etkili uyarıcı olmasına rağmen (Yanke ve ark., 1996), buğday samanı, selüloz, selobiyoz, glikoz veya ksiloz içeren besleyici ortamda da kullanılır. Bu sonuca dayanarak, ksilanazın bazal seviyede rumen mantarları tarafından üretildiği ve ksilan varlığında arttığı sonucuna varılabilir (Lowe ve ark., 1987). Filtre kağıdı içeren kültürlerde yetiştirilen rumen funguslarından ksilanaz aktivitesinin endoglukanaza göre daha düşüktür (Ho ve ark., 1996).

Rumen ksilanazın optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 5.5-6.5 ve 50-55 derece arasındadır (Mountfort ve Asher, 1989; Gomez de Segura ve Fevre, 1993). β -ksilosidaz, karbon kaynağı olarak *Nepenthes frontalis* kültüründe üretilir ve ksilan kültüründe bu mantarın ürünüdür (Pearce ve Bauchop, 1985). Ksilobiyoz ve küçük bir miktar gibi Ksiloligosakkaritlerin tespiti, hiçbir p-ksilosidazın üretilmiştir (Mountfort ve Asher, 1989). *Nepenthes frontalis*'ten iki p-endoksilanaz saflaştırılmış, bu enzimlerin ksilanaz I'in avisel içine emildiği ve diğerlerinin KMSaz aktivitesine sahiptir (Gomez de Segura ve Fevre, 1993). Kültürlenme sonunda, *C. communis*'in ksilanaz ve β -ksilosidazı daha yüksektir

(Gerbi ve ark., 1996). *N. frontalis*'in β -ksilosidazının çoğu hücre içinde olmasına rağmen, büyük miktarda β -ksilosidaz da hücre dışında salınır (Gomez de Segura ve ark., 1998).

2.8. Anerobik Fungusların Enzim Genetiği

Anaerobik fungal enzim sisteminin detaylı analizi enzim genlerinin karakterizasyonu Klonlama yoluyla elde edilir. İncelenecek genler genellikle saf kültürlerden (Huang ve ark., 2005) veya doğrudan rumendedir. Mikroorganizmalardan izole edilen genomik DNA'dan elde edilir (Liu ve ark., 2005). Bu genlerin yapısı, DNA sekanslama ile karakterize edilmiştir. Çeşitli endoglukanazların ve ksilanazların aynı veya farklı katalitik özelliklere sahip olduğu ve çoklu katalitik alanların (enzimlerin aktif bölgeleri) polipeptit üzerindedir (Denman ve ark., 1996). Enzim karbonhidrat bağlanma bölgesi CBD'yi, *E. coli* tarafından sentezlenen bu enzimden çıkarılması parçalama kabiliyetini büyük ölçüde azaltır (Denman ve ark., 1996). Patricia celD geni, endoglukanaz ve selobiyohidrolaz olmak üzere üç katalitik alan içerir. Selüloza bağlanma kabiliyetine sahip olan ve ikinci katalitik alanına karşı yüksek aktivitesi olmayan ksilanazı kodlayan bir gendir (Aylward ve ark., 1999). *Nepenthes frontalis* celE geninin KMS'si, avisel ve p-nitrophenyl arpayı ait olduğu görülmüştür (Xue ve ark., 1993). CelB2 geni, β -glukan, likenan, KMS ve ksilan üzerinde yüksek aktiviteye sahiptir (Ye ve ark., 2001).

Rumenfunguslarda bilinen bir selüloz kompleksinin oluşumunda önemli rol oynayan bir dock alanı vardır (Gilbert ve ark., 1992; Eberhardt ve ark., 2000; Nagy ve ark., 2007). Selüloz kompleksinin önemli bir parçası olan iskelet proteini *P. equi* detaylı bir şekilde karakterize edilmiştir (Raghothama ve ark., 2001). Dokerin alanı, polisakkaritlerin iskelet proteinlerine bağlanmasına izin vererek selüloz komplekslerinin oluşumuna izin verir. Polisakkarit hidrolaz ise dahil edilmezse ortama salgılanacak enzim kompleksine bağlanmayacaktır (Freelove ve ark., 2001). Ek olarak, rumen funguslarındaki çift alanın, selüloz kompleksini tekli docker alanından daha sıkı bağlanır (Nagy ve ark., 2007). Rumen funguslarında, farklı alanları birbirinden ayıran ve enzimin katalitik aktivitesini artırırken bu alanların bağımsız etkiler göstermesine izin veren bir "bağlayıcı" bölge de vardır (Liu ve ark., 2005).

Anaerobik funguslar ökaryotlar olmasına rağmen, DNA sıralama analizinin sonuçları nedeniyle, anaerobik mantarların ksilanaz ve selülaz genleri ile bakteriyel ksilanaz ve selülaz genleri arasında önemli bir homoloji vardır ve bazı anaerobik mantar

ksilanaz ve sel l laz genlerinde intron yoktur. Bu funguslar ve rumen bakterileri arasında yatay gen transferi olur (Chen ve ark., 1997; Akyol ve ark., 2009).

Rumendeki koşullar, genlerin aynı veya farklı mikrobiyom içinde aktarılmasına izin verir. Rumende çok sayıda mikrop bulunması, rumen mikroplarının genetik  e itlili ini arttırır. Bununla birlikte, rumenden yiyecekleri sindirme sürecinde, çok sayıda aerobik ve fakültatif mikroorganizma rumenden geçer. Rumende bulunan çok sayıda bakteriyofaj, bu mikroorganizmalardan gen aktarılır (Flint, 1994).

Tezin Amacı Ve  nemi

Bu çalışmanın amacı, Tunceli’de yayılı  gösteren da  keçilerinden izole edilen *Neocallimastix sp.*’lere ait ksilanaz enzimlerinin ve biyoteknolojik açıdan kullanım potansiyellerini değerlendirmektir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Besiyeri Hazırlanması ve Sterilizasyonu

3.1.1. Rumen sıvısının saflaştırılması ve saklanması

Bu tez çalışmasında kullanılan rumen sıvısı DERSİM Et Kombinasi'ndan, kasaplık olarak kesilen ineklerden elde edildi. Rumen sıvısı, rumenden çıkarıldıktan hemen sonra alındığı yerde süzülerek hazır halde laboratuvara getirildi. Daha sonra 14000 rpm'de 15 dakika + 4 ° C'de santrifüjlenmiştir. Rumen sıvısı buzdolabında (+ 4 ° C) 4 haftaya kadar saklanabildiğinden, rumen stok solüsyonu -20 ° C'de stoklanmış ve besiyer yapımında kullanılacağı zaman oda sıcaklığında eritilerek kullanıldı.



Şekil 1.6. Rumen sıvısının hazırlanması

Ayrıca yaban keçilerinden (en az 30 farklı), taze dışkı örnekleri öncelikle kağıt torbalar içerisine konuldu. Tüm dışkı örneklerinin kayıtları alınarak, naylon torbalar içerisinde buz üzerine yerleştirilmiş, 24 saat içinde laboratuvara transfer edildi. Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 oC de dışkı stoku oluşturulmuştur. Örnek toplamada mümkün olduğunca taze dışkının alınmasına özen gösterildi.



Şekil 1.7. Tuncelideki yaban keçi örnekleri

3.1.2. Anaerobik besiyeri

Şu anda rumen mikrobiyolojisinde kullanılan anaerobik tekniklerin ve kültür ortamlarının çoğu, Hungate yöntemine veya Bryant yöntemine dayanmaktadır.

Besiyerlerine konsantrasyonu son konsantrasyon olacak şekilde enerji glikoz, sellobiyoz, ksilan eklendi.

Tablo 1.3. Anaerobik fungus besiyeri içeriği.

		Besiyeri	Roll tüp agar
Mineral Solüsyon 1	ml	15	15
Mineral Solüsyon 2	ml	15	15
Rumen Sıvısı	ml	15	15
NaHCO₃	g	0,60	0,60
Yeast Extract	g	0,25	0,25
Tryptone-Casitone	g	1	1
Resazurin (%1)	g	0,10	0,10
Cystein HCl	g	0,10	0,10
Enerji Kaynağı	g	0,50	0,50

Agar	g	----	1,50
Saf su	ml	50	50
[*] Mineral Solüsyon 1	K ₂ HPO ₄	g	3.0
	Saf Su	ml	1000
[**] Mineral Solüsyon 2	KH ₂ PO ₄	g	3
	(NH ₄) ₂ SO ₄	g	6
	NaCl	g	6
	MgSO ₄ 7H ₂ O	g	0.6
	CaCl ₂	g	0.6
	Saf Su	ml	1000

Anaerobik fungus besiyeri içereğinde kullanılan tüm kimyasallar saf su, mineral çözelti 1, mineral çözelti 2 ve rumen sıvısı karışımında çözündürüldü. Aynı zamanda, ortam ısıtılmış bir manyetik karıştırıcıda sürekli olarak ısıtıldı ve eklenen her madde çözüldü. Besiyeri kaynamaya başladığında, sistein hidroklorür eklendi ve manyetik karıştırıcı karıştırmaya devam ederken besiyeri ortamına karbondioksit verildi. Kültür ortamını hazırlarken amaç, ısı etkisi altında ortamdaki oksijeni uzaklaştırmaktır.

Bir enerji kaynağı olarak saman kullanan besiyeri 121 ° C'de 15 dakika bekletildi; çözünür substratlar (glukoz, ksilan veya selobiyolojik gibi) kullanan ortam 110 ° C'de 10 dakika otoklavlandı. Kültür ortamına 0.22 µm membran filtre eklenir. Aksi takdirde, çözünür substratlar içeren ortamlar yüksek sıcaklıklarda karamelize olur.

3.1.3. Anaerobik besiyerinde bakteri büyümesini engelleyici antibiyotik ilavesi

Anaerobik bir ortamda olası bakteri üremesini önlemek için, ampisilin kloramfenikol hazırlama karışımı (kloramfenikol) (50 mg / ml streptomisin sülfat (streptomisin sülfat) (50 mg / ml) ve eritromisin (Eritromisin) (50 mg / ml) % 25 etanol çözülmüştür. İzole edilmiş veya saflaştırılmış anaerobik fungus kültürü ortamına

antibiyotik karışımı ekildikten sonra, bakteri üremesini önlemek için bir şırınga (nihai konsantrasyon 25 ug / ml) ile enjekte edildi.

3.2. Anaerobik Fungusların İzolasyonu ve Saflaştırılması

3.2.1. Anaerobik fungusların izolasyonu

Anaerobik fungusların izolasyonu Theodorou ve ark., (1993) seyreltme yöntemine göre gerçekleştirilmiştir ve uygulama yöntemi aşağıdaki gibidir.

Dışkı numunesi (ıslak ağırlık yaklaşık 10 g), CO₂ muamelesi altında 50 ml ortamda homojenize edildi. Seyreltilmiş numunenin yaklaşık 6 ml'sini buğday samanı içeren boş bir Hungate tüpüne aktarıldı. İlk seyreltilmiş numunenin 10 ml'sini 40 ml ortamda seyreltin ve bir pipetle donatılmış boş bir Hungate tüpüne koyuldu. Anaerobik mantarlar, 10⁻¹ ve 10⁻⁶ konsantrasyonlarında kültürlendi ve ardından 3 ila 10 gün 39 ° C'de kültürlendi.

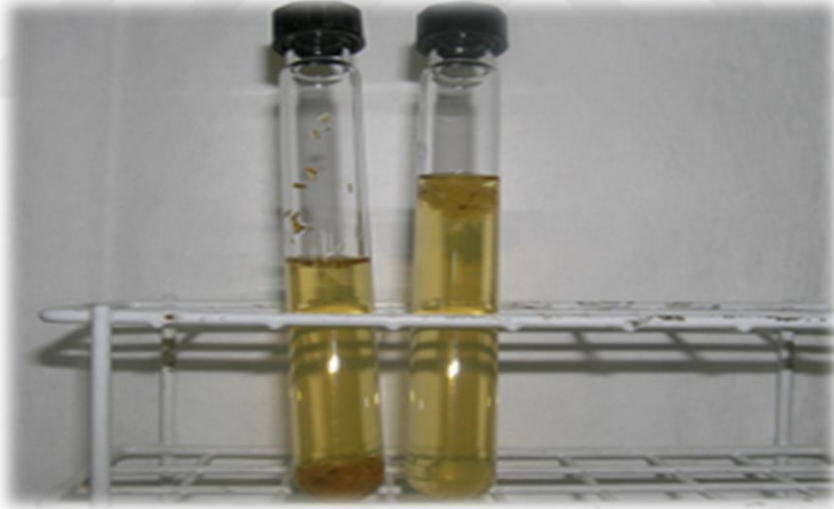


Şekil 1.8. Anaerobik Fungusların izalasyonu

3.2.2. Anaerobik fungusların saflaştırılması

Anaerobik mantarların saflaştırılmasında Hungate (1969) yöntemine dayalı Joblin'in (1981) silindir tüp yöntemi kullanıldı.

İlk olarak % 5 w / v glikoz veya fibroz içeren ortama % 1.5 w / v agar eklenmiştir. Katı ortamı sıcak su banyosunda 48 ° C'de eritin, ardından CO₂ (2-3 ml) altında bir Hungate tüpüne koyun ve otoklavlanıldı. Hazırlanan katı ortam kullanıldığında, sıcak su banyosunda eritilir ve fungusların tolere edebileceği bir sıcakta soğutuldu. Her tüpe 0,5 ml fungusa büyüme suyu enjekte edildi. Antibiyotikler eklendikten sonra, soğuk suyla doldurulmuş sıvı funguslar içeren agar ortamında, ortamı tüp duvarında dondurmak için bunları bir Hungate tüpünde eşit şekilde karıştırıldı (yuvarlanan tüp yöntemi). Fungus 39 ° C'de 3-4 gün inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda mantar kolonilerinden toplanan örnekler buğday samanı içeren sıvı bir ortama ekildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra saf bir kültür elde edildi.



Şekil 1.9. Anaerobik Fungusların Saflaştırılması

3.3. Enzim Analizleri

3.3.1. Enzim ekstraktlarının hazırlanması

Enzim özütü, hücre dışında ve hücre içinde iki farklı kısımdan hazırlandı. Enzim üretimi için çalışılacak ortam 1200 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve hücreler besleyici ortam ile birbirinden ayrıldı. Hücre dışı enzimler için süpernatant kullanıldı. Hücre enzim aktivitesini belirlemek için, santrifüjlemeden sonra elde edilen pelet temiz bir test tüpüne konuldu, pelet iki kez saf suyla yıkandı ve ardından hücreleri kırmak ve parçalamak için sıvı nitrojen ile donduruldu. Hücre materyalini 50 mM potasyum fosfat (pH 6.5) tamponuyla çözüldü. Hücreler, 10.000 g'de 2 dakika süreyle santrifüjlenerek kısmen çöktirildi ve üst katman sıvısı, temiz bir tüpe kondu ve hücre enzimi kaynağı olarak kullanılmak üzere -20 ° C'de saklandı(Çömlekcioglu, 2009).

3.3.2. Enzim aktivitesinin belirlenmesi

Enzim aktivitesini belirlemek için Miller (1959) yöntemini kullanıldı.. Reaksiyon karışımı, ham enzim özütü ve substrattan (10 mg / ml nişasta, pH 6.5) oluşturuldu. Enzim reaksiyonu 50 ° C'de 60 dakika süreyle gerçekleştirildi. 3-5 dinitrosalisilik asit (DNS) solüsyonu ekledikten sonra, enzim reaksiyonunu durdurmak için reaksiyonu 10 dakika kaynatıldı. Enzim reaksiyonundan sonra salınan indirgeyici şekerin absorbanansı, bir spektrofotometrede 540 nm'de okundu.

3.3.3. Fibrolitik enzim çeşitliliğinin incelenmesi

Fibrolitik enzim çeşitliliğinin incelenmesi için Nişasta, ksilan, karboksimetil selüloz (KMS), avisel (% 1.0, w / v) ve liken (% 0.1, w / v), pH 6.0 sodyum fosfat substratları tamponda hazırlandı. Bu substratlar üzerindeki enzim ekstresinin aktivitesini belirlemek için 3.4.3'te belirtilen standart enzim testi yapıldı.

3.3.4. Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

Enzimin en iyi aktiviteyi gösterdiği sıcaklığı belirlemek için farklı inkübasyon sıcaklıkları (30, 40, 50, 60, 70, ve 80 ° C) kullanıldı. Bu nedenle, enzim çalışmasında 3.3.2'de belirtilen aynı adımlar kullanılmış ve reaksiyonun meydana geldiği sıcaklık

değiştirildi. Bağlı aktivite, en yüksek absorbans değerinin elde edildiği sıcaklığa göre hesaplandı.

3.3.5. Optimum pH değerinin belirlenmesi

Hücre dışı enzimlerin en iyi aktiviteyi sergilediği pH değerini belirlemek için öncelikle asetat-sodyum asetat tamponu (pH 2-5.6), sodyum fosfat tamponu (pH 6-8), tris tamponu (pH 8.5-9) ve Sodyum bir borat tamponu hazırlandı. Daha sonra her tampon, 10 mg / ml nişasta içeren bir substrat çözeltisi hazırlamak için kullanıldı. 3.3.2'de belirtilen aktivite belirleme prosedürü uygulanırken, substrat olarak farklı bir pH'ta (pH 3.5-12) hazırlanan bir substrat çözeltisi kullanıldı. Bağlı aktivite, en yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değerine göre hesaplandı.

3.3.6. Termal stabilitenin saptanması

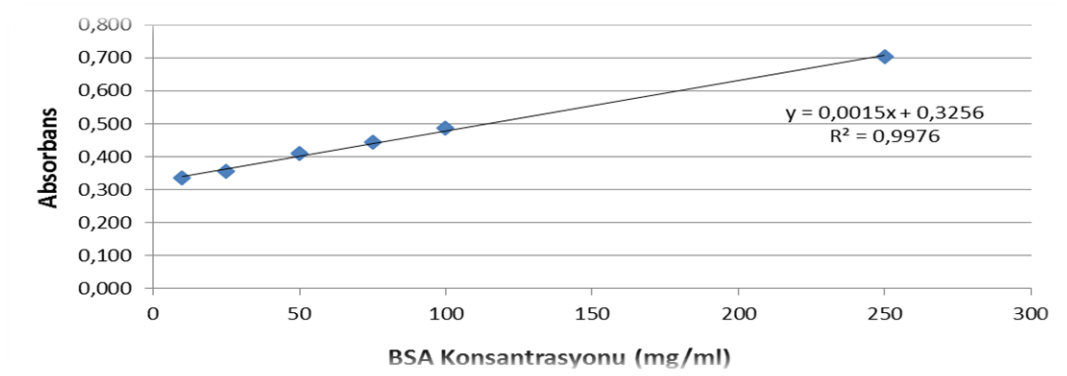
Termostabiliteyi belirlemek için enzimi farklı sıcaklıkta (5, 10, 15, 30, 60, 120 ve 240 ° C) farklı zamanlarda (40, 50, ve 60 dakika) ön inkübe edildi. Ön inkübasyondan sonra, enzimi 1 dakika buz üzerine koyuldu Substratı ekledikten sonra, 3.3.2'de belirtilen prosedüre göre optimum sıcaklıkta 60 dakika inkübe edildi. Önceden inkübe edilmeyen enzimler kontrol grubu olarak kullanıldı ve göreceli aktivite değerleri hesaplandı.

3.3.7. pH stabilitesinin belirlenmesi

pH'ın stabilitesini belirlemek için enzim farklı bir pH'ta hazırlanmış bir tamponda çözündürüldü ve enzimin en yüksek termal stabilitesine sahip olduğu sıcaklıkta 15 dakika süreyle ön inkübe edildi. Ön inkübasyondan sonra, farklı pH değerlerinde hazırlanmış tamponlarda çözünmüş enzimleri hemen buz üzerine koyuldu, optimum pH'ta hazırlanan substratı eklendi ve 3.4.3 hükümlerine göre optimum sıcaklıkta yeniden inkübe edildi. Bağlı aktivite değeri, en yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değerine göre hesaplandı.

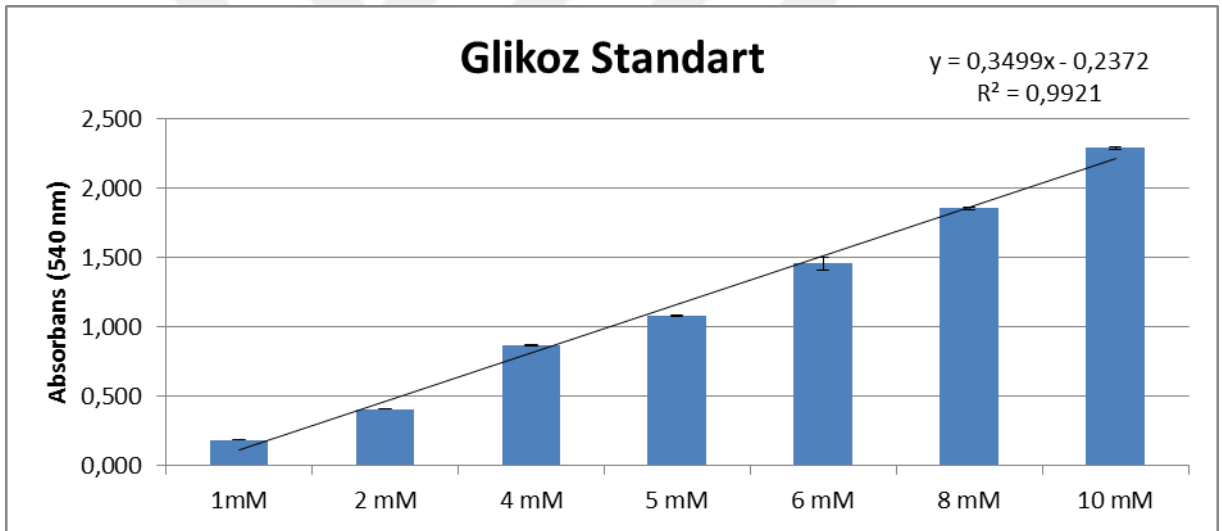
3.3.8. Protein tayini

Protein standartı olarak sığır serum albumini (BSA)'nin farklı konsantrasyonları kullanıldı. Bu amaçla 10, 25, 50, 75, 100, 250 mg/ml'lik BSA solusyonları hazırlandı.

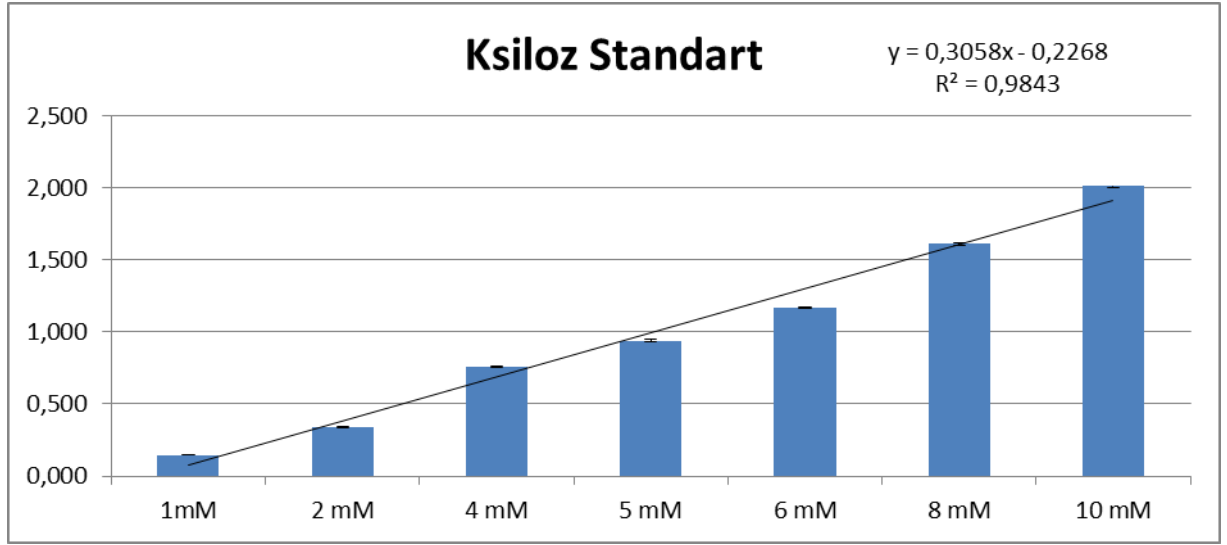


Şekil 2.1. Farklı BSA konsantrasyonları ile elde edilen kalibrasyon grafiği ve denklem

3.3.9. Neocallimastix Standartlar



Şekil 2.2. Glikoz standartı



Şekil 2.3. Ksiloz Standart

4. BULGULAR VE TARTISMA

Dağ keçilerinden izole edilen anaerobik fungus örneklerden yüksek enzim aktivitesi gösteren 3 farklı fungus üzerinde çalışma yapıldı. Bu örnekler DAF1, DAF2 ve DAF3 olarak isimlendirildi.

4.1. Enzimlerin Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi

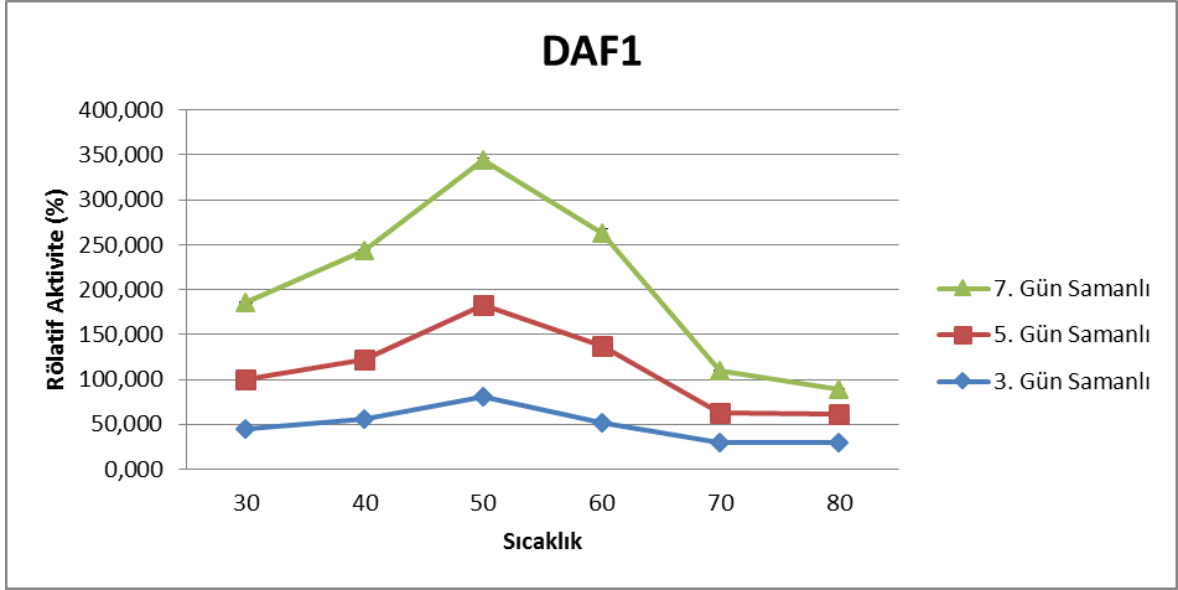
Tez çalışmam süresince fungus cinsi için maksimum sıcaklığını kontrol etmek için, hücresel ve hücre dışı selüloz, ksilanaz aktivitelerine bakıldı. *Neocallimastix sp.*'nin hücresel ve hücre dışı selüloz aktivitesinin sıcaklık değerleri grafiklerle gösterilmiştir.

Birçok araştırmacı, çalışmalarında anaerobik funguslar için en uygun sıcaklık aralığını kontrol etmiştir. Bu konudaki genel kanaat, fungusların 36 °C ile 57°C arasında yaşam döngülerini sürdürdükleri yönündedir.

Bu nedenle araştırmacılar, anaerobik rumen mantarlarının sıcaklık gereksinimleri açısından mezofilik olduğuna ve ürettikleri enzimlerde benzer davranış sergilediklerine dikkat çekti.

Bazen organizmalar mezofilik olmalarına rağmen ürettikleri enzimler farklı sıcaklık ve pH değerleri gösterebilir. Bu nedenle izole ettiğimiz fungus enziminin optimum sıcaklığını belirledik.

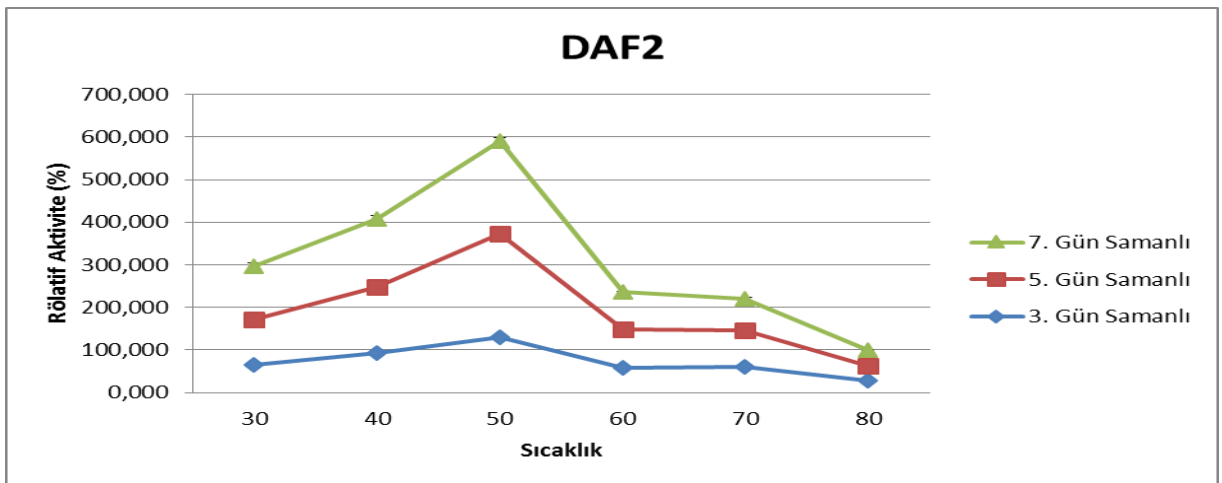
Tez araştırmamda anaerobik fungusların optimal çevre sıcaklığını kontrol edebilmek için hücre ve süpernatant (hücre dışı) içindeki CMCase, likenaz ve ksilanaz aktiviteleri test edilmiş ve enzim aktivite değerleri bulunmuştur.



Şekil 2.4. DAF-1-Samanlı ortamda gelişen *Neocallimastix sp.*

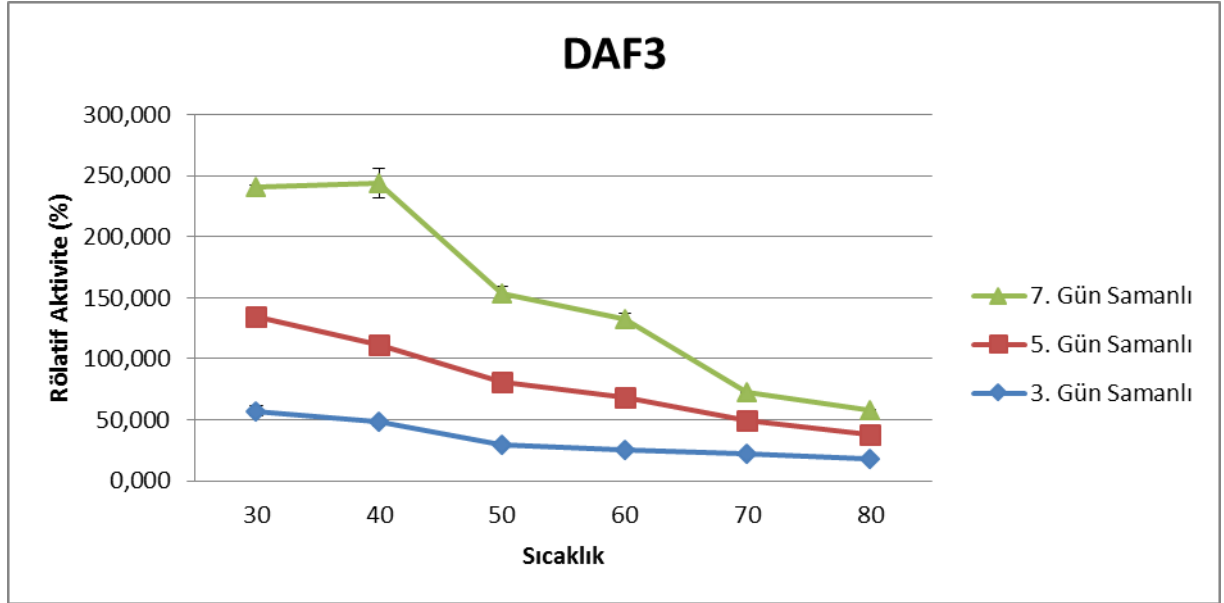
Yaptığımız çalışmalarda elde ettiğimiz veriler *Neocallimastix sp* DAF-1- samanlı için hem hüresel hemde hücre dışı enzim aktivitesi için maksimum sıcaklık değeri 45–50°C aralığındadır. *Neocallimastix sp.* üzerine yapılmış önceki çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlarla benzerdir. 50°C’den sonra ise aktivitesinin düştüğü görülmektedir.

Lowe ve ark. (1987a), *Neocallimastix sp.* DAF-1-’in 50°C’de, Hebraud ve Fevre (1988), *Neocallimastix frontalis* 45–55°C arasında maksimum enzim aktivitesi gösterdiğini belirtmişlerdir.



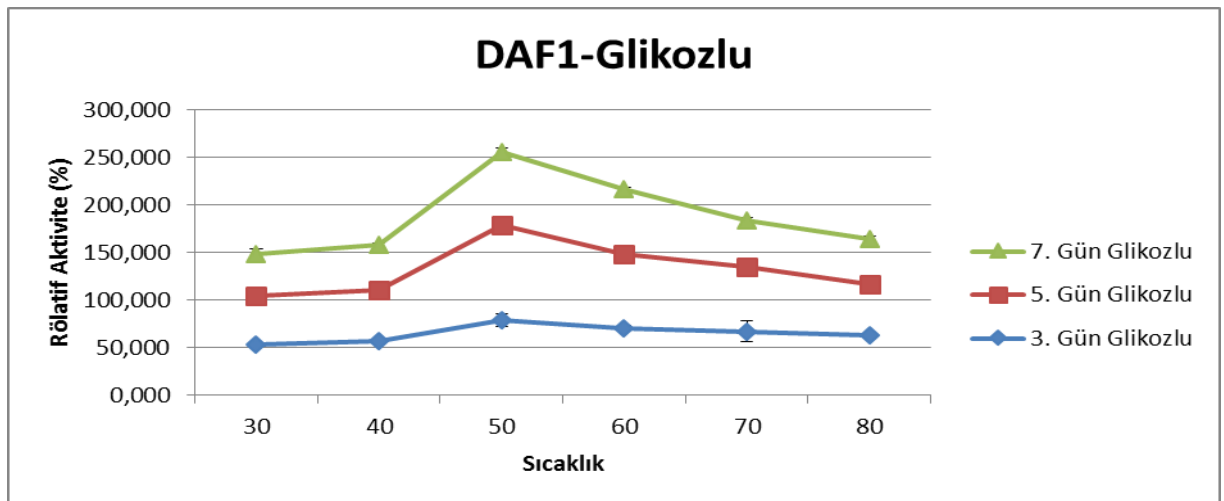
Şekil 2.5. DAF-2-Samanlı ortamda gelişen *Neocallimastix sp.*

DAF-2- için selüloz aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık değerlerine bakılmıştır. DAF-1- olduğu gibi hem hücresel hemde hücre dışı selüloz aktivitesinin 50°C de olduğu görülmüştür.



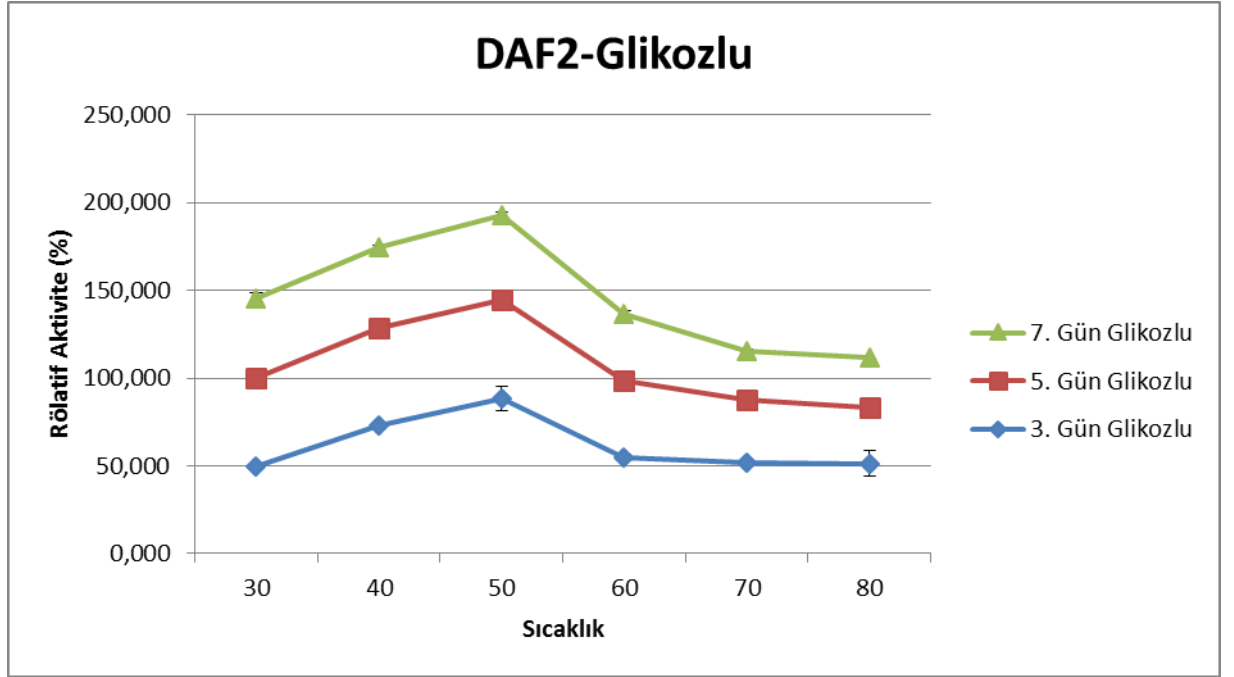
Şekil 2.6. DAF-3-Samanlı ortamda gelişen *Neocallimastix* sp.

DAF-3- Samanlı ortamda gelişen *Neocallimastix* sp. sin sıcaklık değerlerine baktığımızda enzim atvitesi DAF-1- ve DAF-2 göre farklıdır. DAF-1- ve DAF’de 50°C gösterdiği tespit edilmişti..Ançak DAF-3- ise en yüksek enzim aktivitesini 40°C’de göstermektedir. 50°C’den sonra ise enzim aktivitesinin düştüğü görülmektedir



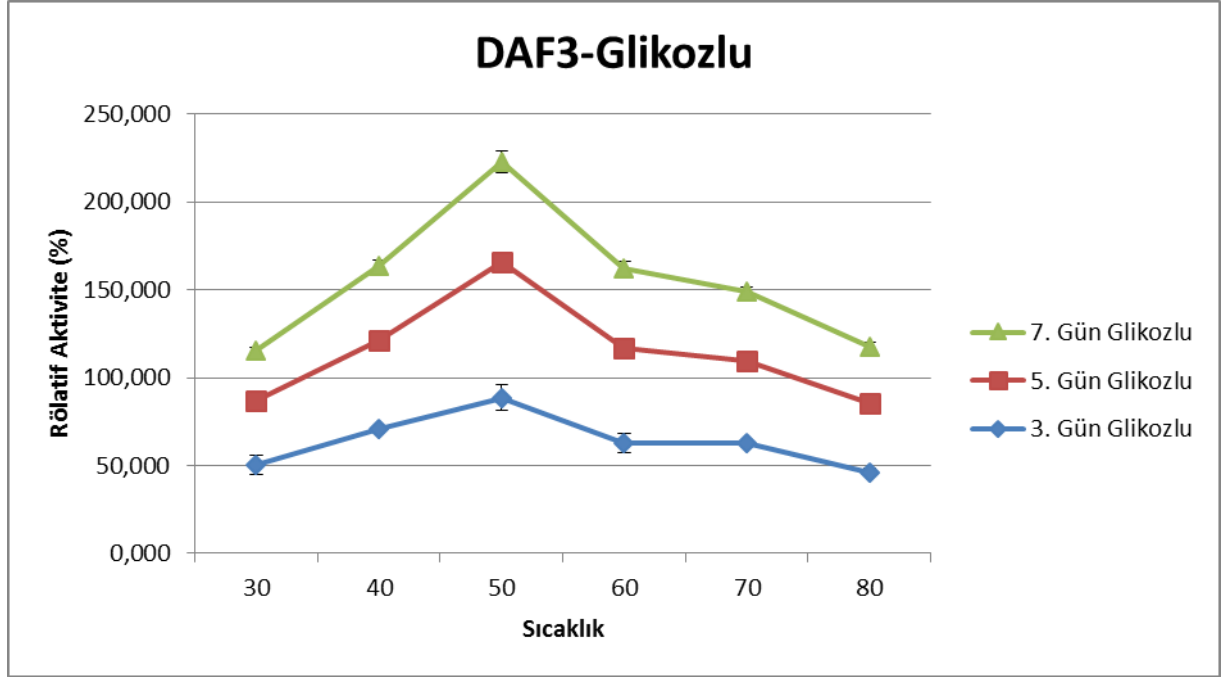
Şekil 2.7. DAF-1-Glikozlu ortamda gelişen *Neocallimastix* sp.

DAF-1-Glikozlu ortamda gelişen *Neocallimastix sp.* 3, 5 ve 7 günlerin sıcaklık değerlerine bakılarak enzim aktiviteleri elde edildi. 30°C ve 40°C enzim aktivliği sabit iken 50°C’de en yüksek enzim aktivitesine ulaşıldığı görüldü. 50°C’den sonra 3,5 ve 7 günün enzim aktivitesi düştüğü görüldü.



Şekil 2.8. DAF-2-Glikozlu ortamda gelişen *Neocallimastix sp.*

Anerobik funguslar üzerine yapılan incelemeler funguslar için yüksek sıcaklık değerinin 39 ila 55°C arasındadır Cinslere göre bu sıcaklık değerleri farklılıklar göstermektedir.



Şekil 2.9. DAF-3-Glikozlu ortamda gelişen *Neocallimastix sp.*

Genel olarak bakıldığında, hem ksilanaz hemde selüloz aktivitesi için en yüksek sıcaklık değerlerinin 45-50 °C aralıklarında olduğu gözlenmiştir. Anaeroik funguslar için hücresel enzim aktivitesinin hücre dışı enzim aktivitesinden fazla olduğu tespit edilmiştir.

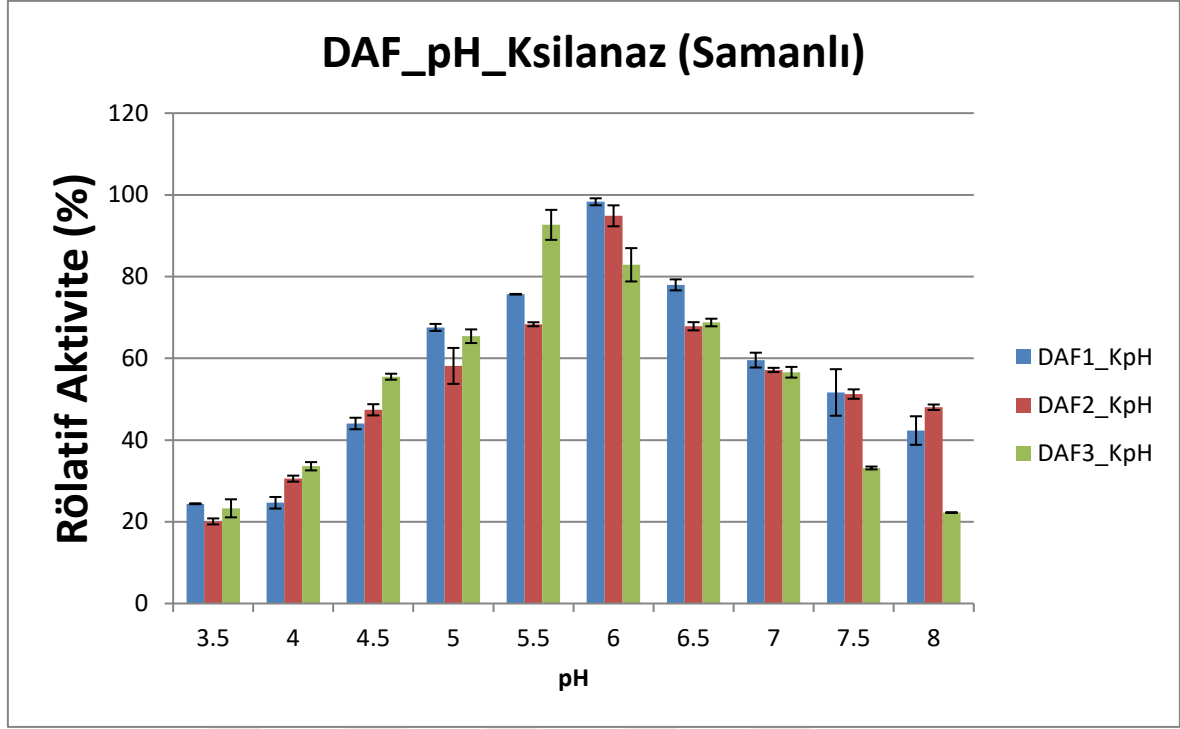
4.2. Enzimlerin Optimum pH'larının Belirlenmesi

Bu çalışmamız için izole ettiğimiz fungusların enzim aktivasyonlarını maksimum düzeye getiren pH değeri belirlemek enzim aktivitelerine bakıldı.

Neocallimastix sp.'nin DAF-1-, DAF-2- VE DAF-3- için süpernatant ve hücresel ksilanaz aktivitesinin en yüksek pH değerleri belirlenmemek için yaptığımız çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlar şekil 3.1'de gösterilmiştir.

Samanda Gelişen DAF'ların Ksilanaz, Likenaz ve CMCaz

En yüksek Sıcaklık seçilerek pH aktivitelerine bakılmıştır. (50 C).

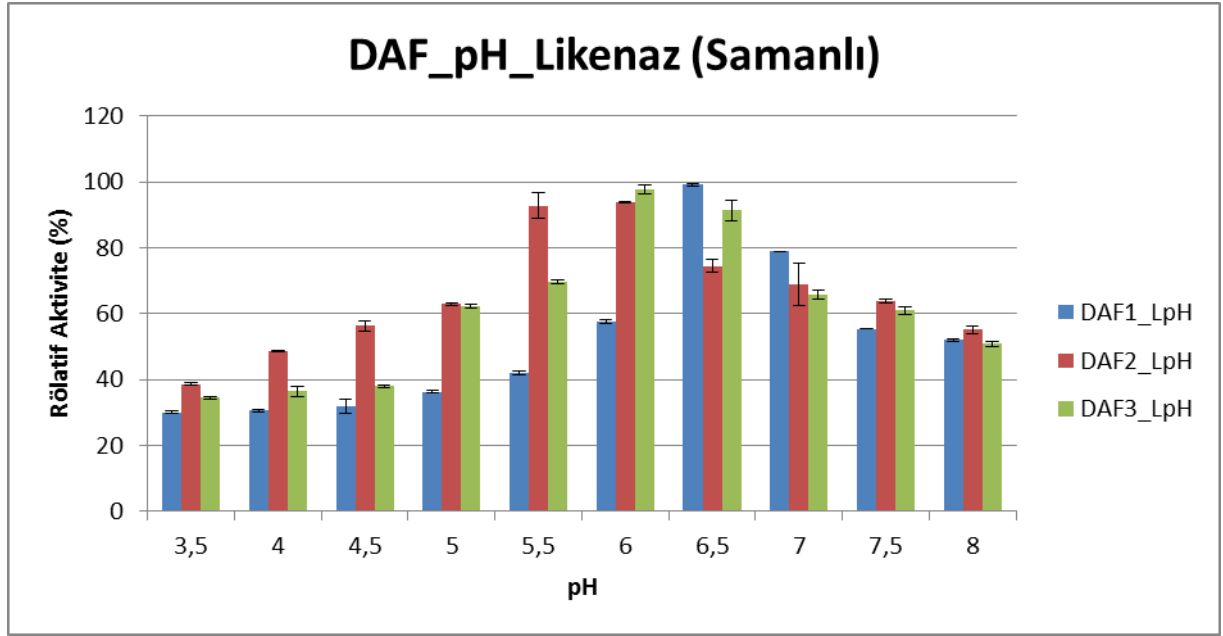


Şekil 3.1. Samanlı DAF KSilanaz pH grafiği

Yaptığımız çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlar *Neocallimastix sp.* DAF-1- DAF-2- VE DAF-3- için gerek hücresel gerekse hücre dışı ksilanaz aktivitesi maksimum pH=6, pH= 5,5 ve pH=6 olarak belirlenmiştir.

Lowe ve ark. (1987a), yaptıkları çalışmada *Neocallimastix sp.* R1'in sırasıyla; 6.0, 5.5, ve 6.0 pH'da, Lee ve ark. (1993) yaptıkları çalışmada, *Neocallimastix patriciarum*'un 6.2'de bulmuşlardır.

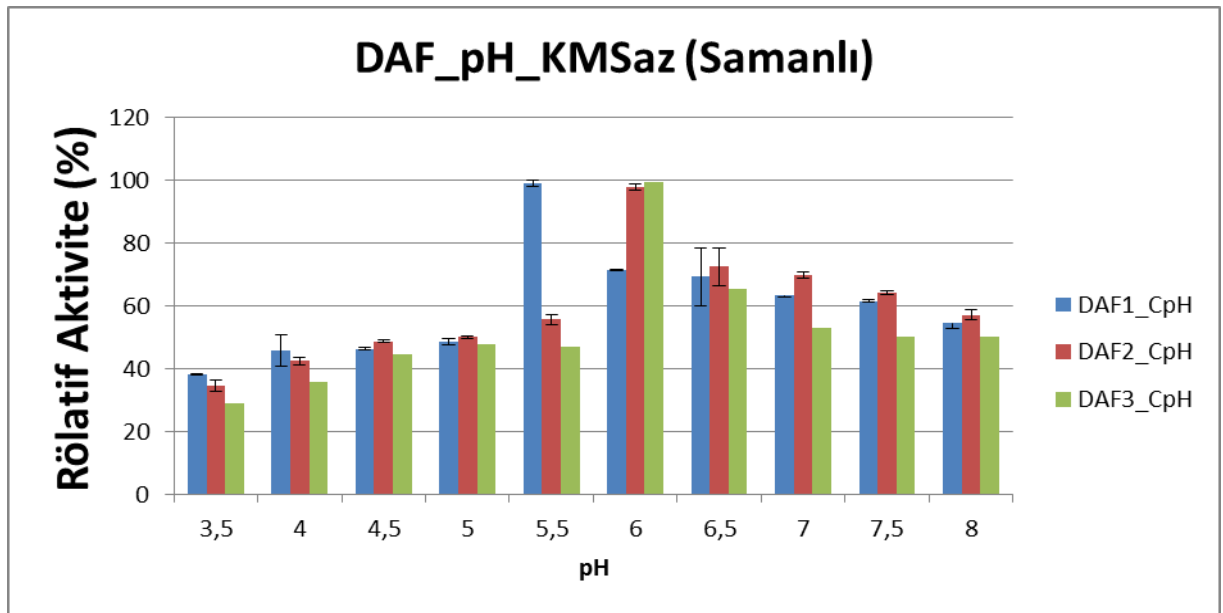
Neocallimastix sp.'nin DAF-1-, DAF-2- VE DAF-3- için süpernatant ve hücresel likenaz aktivitesinin en yüksek pH değerleri belirlenmemek için yaptığımız çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlar şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Samanlı DAF Likenaz pH

Yaptığımız çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlar *Neocallimastix sp.* DAF-1- DAF-2- VE DAF-3- için gerek hücresel gerekse hücre dışı ksilanaz aktivitesi maksimum pH=6,5, pH= 6 ve pH=6,5 olarak belirlenmiştir

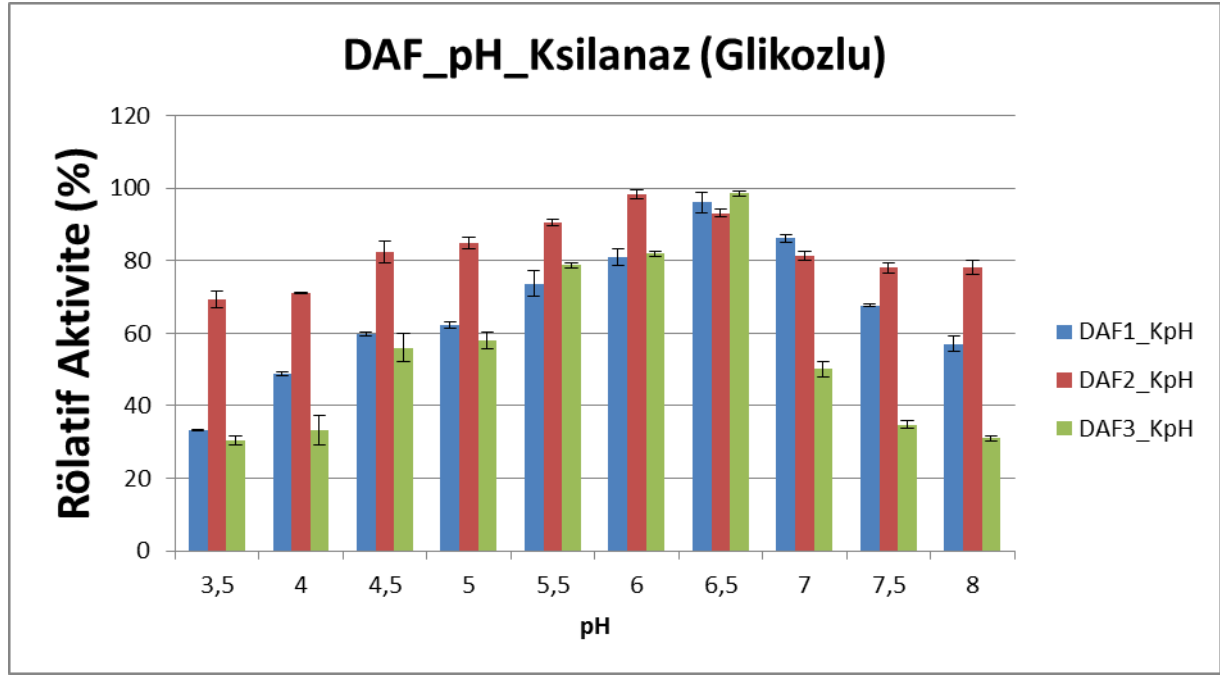
Neocallimastix sp.'nin DAF-1-, DAF-2- VE DAF-3- için süpernatant ve hücresel likenaz aktivitesinin en yüksek pH değerleri belirlenmemek için yaptığımız çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlar şekil 3.3'de gösterilmiştir



Şekil 3.3. Samanlı DAF2 Likenaz pH

Yaptığımız çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçlar *Neocallimastix sp.* DAF-1- DAF-2- VE DAF-3- için gerek hücresel gerekse hücre dışı ksilanaz aktivitesi maksimum pH=5,5, pH= 6 ve pH=6 olarak belirlenmiştir

Glikozda Gelişen DAF'ların Ksilanaz, Likenaz ve CMCaz

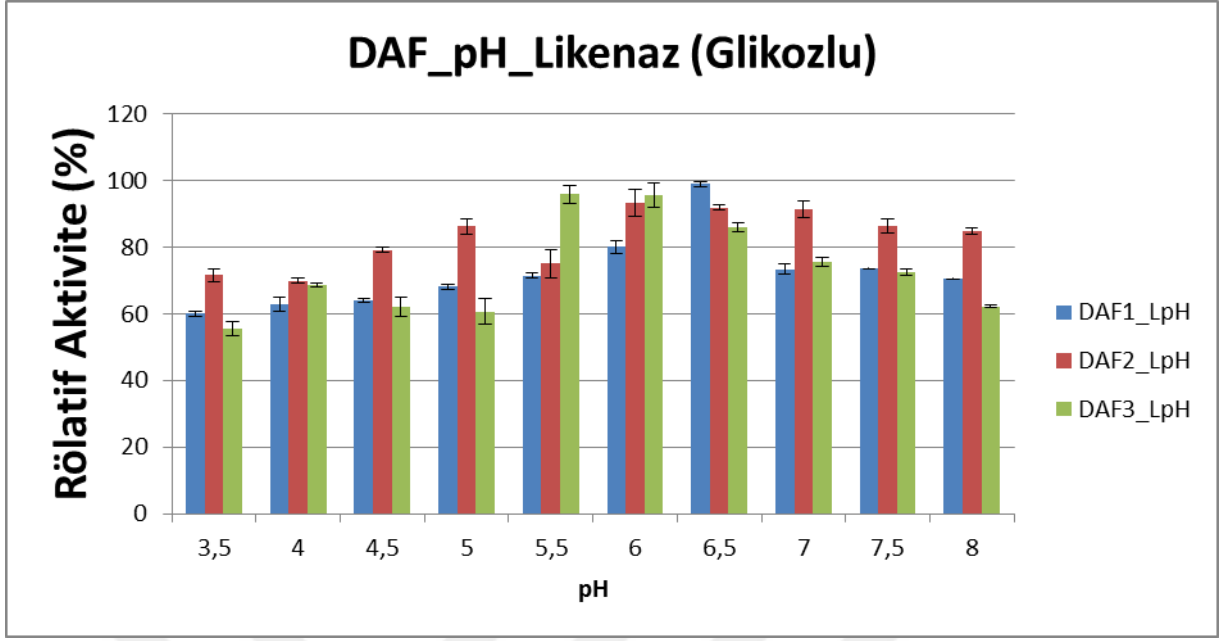


Şekil 3.4. Glikozlu DAF Ksilanaz pH

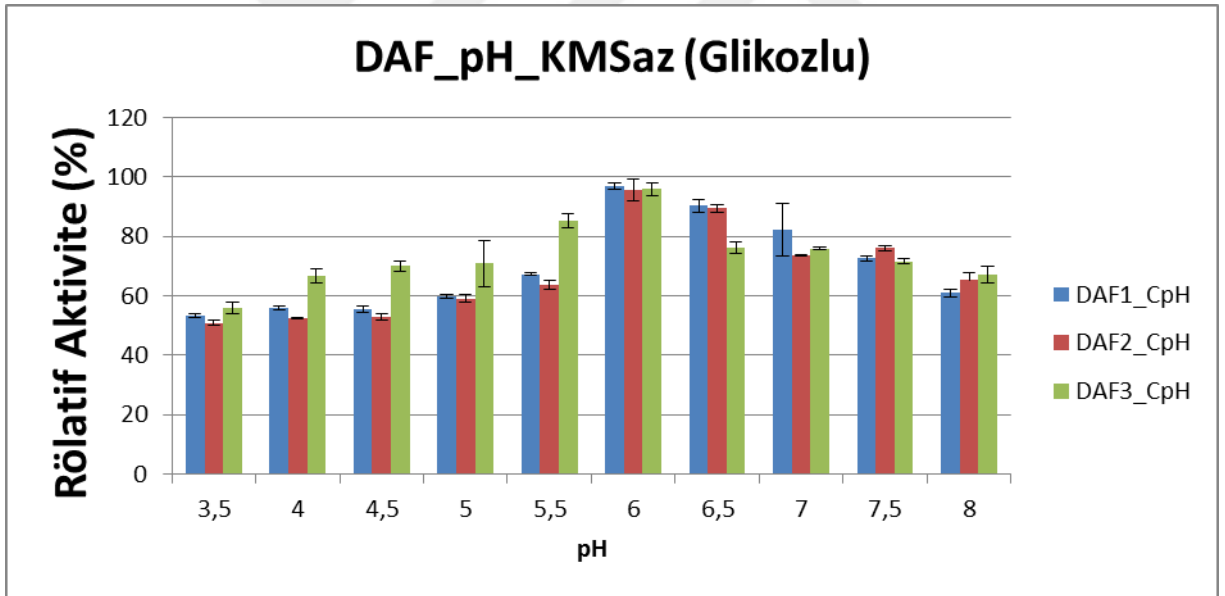
Elde elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında anaerobik funguslar için hücresel ksilanaz aktivitesinin en yüksek olduğu değerin pH=5,5-6,5 aralığında olduğu gözlenlenmiştir.

. Lowe ve ark., (1987); Gomez de Segura ve Fevre, (1993); Mountfort ve Asher; (1989), rumen funguslarının ksilanazlarının en yüksek pH aralığını belirlemek için yapılan çalışmada en yüksek pH değerini 5.5-6.5 aralığında bulmuşlardır.

Benzer şekilde yapılan çalışmalarda anaerobik fungusların en yüksek pH'larına bakılmış funguslar için en yüksek pH'nın 5.5 ila 6.7 arasında olduğunu belirtmişlerdir.



Şekil 3.5. Glikozlu DAF_Likenaz pH

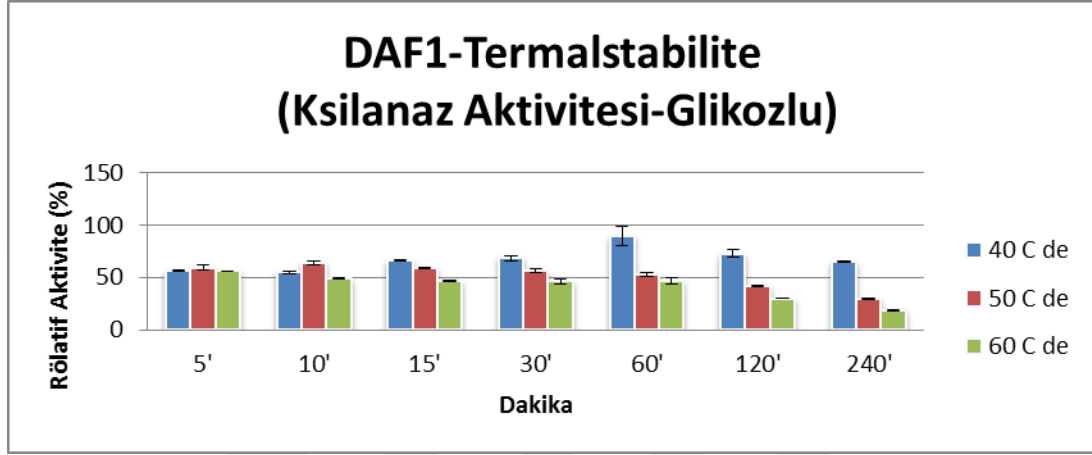


Şekil 3.6. Glikozlu DAF CMCaz pH

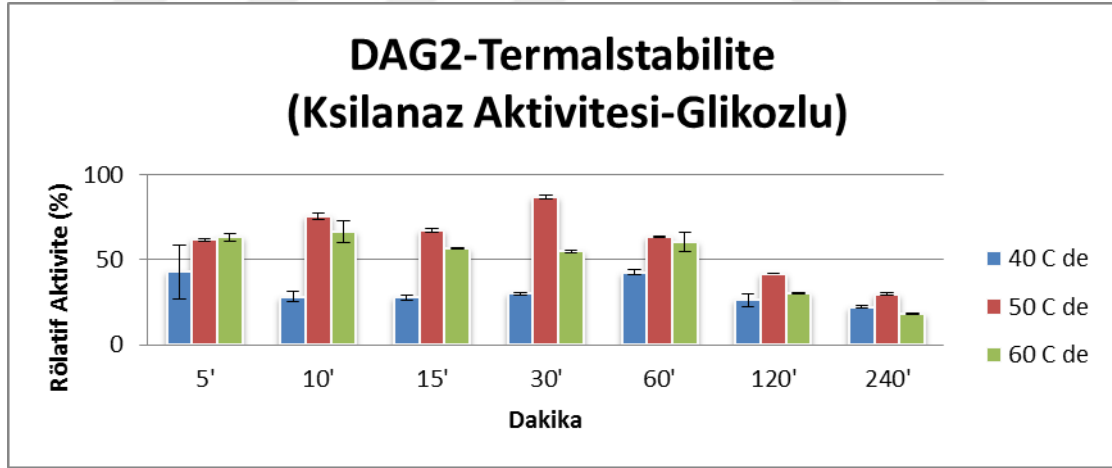
4.4. DAF Ksilanazların Termalstabiliteleri

Enzimin sıcaklığa karşı direnci için 40, 50 ve 60 oC sıcaklıklarda 5, 30, 60, 90, 120, 150, 200 dk ön inkübasyon uygulandı. Sonuc olarak enzim 40 oC’de yüksek aktivite göstermiş ve 200 dakika sonunda aktivitesini %37.67 oranında bir düşüş olduğu tespit edildi.

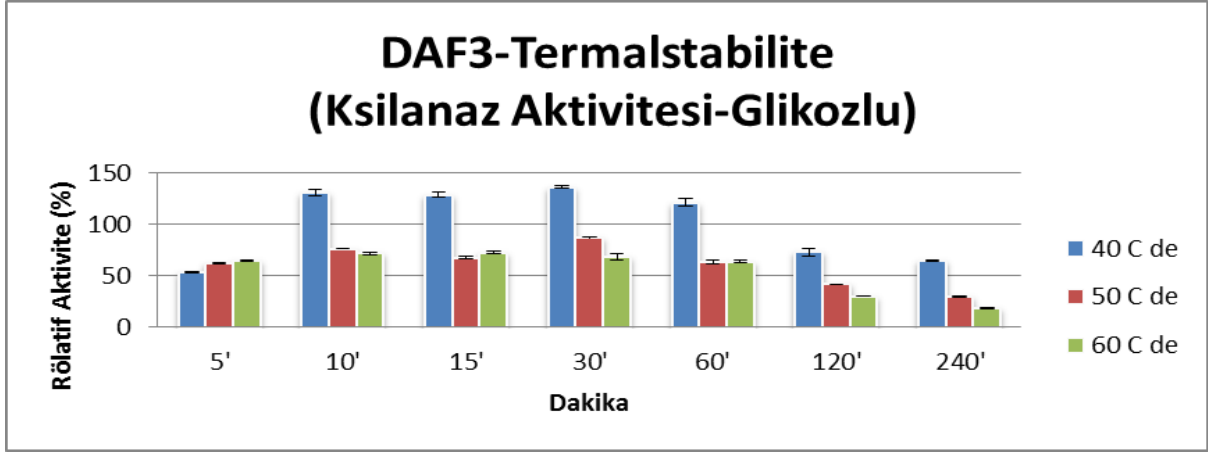
Neocallimastix 40 oC’de üzerinde aktivitesini hızlı bir şekilde kaybetmesi bu sıcaklık üzerinde enzimin stabil olmadığını göstermektedir. Rumen sıcaklığı rumen pH’sına göre daha stabildir (38-42 oC). Bu nedenle enzim sınırlı miktarda termal stabiliteye sahiptir.



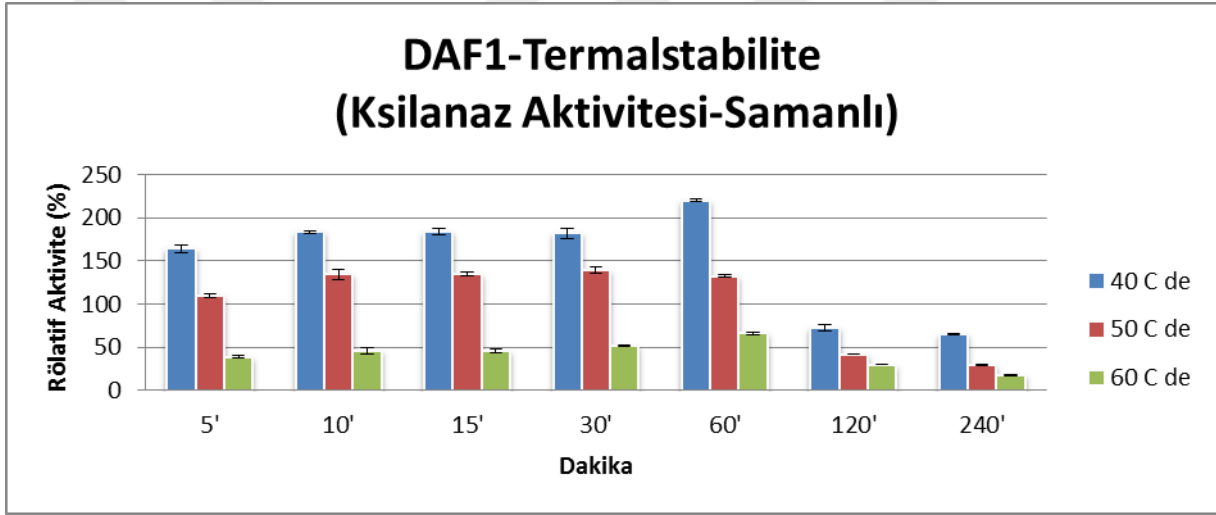
Şekil 3.7. DAF-1-Glikozlu ortamda gelişen *Neocallimastix sp.*



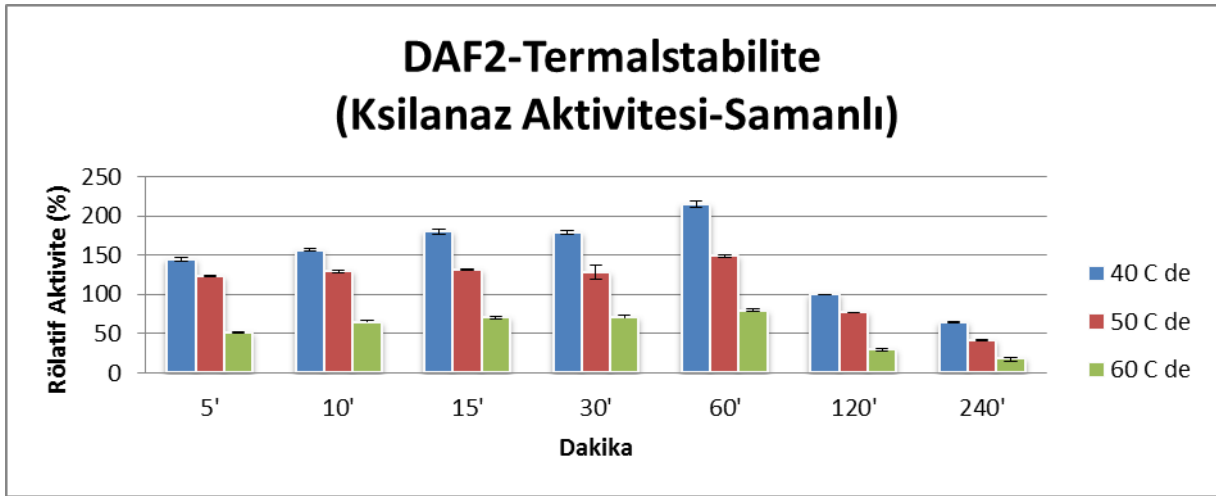
Şekil 3.8. DAF-2-Glikozlu ortamda gelişen *Neocallimastix sp.*



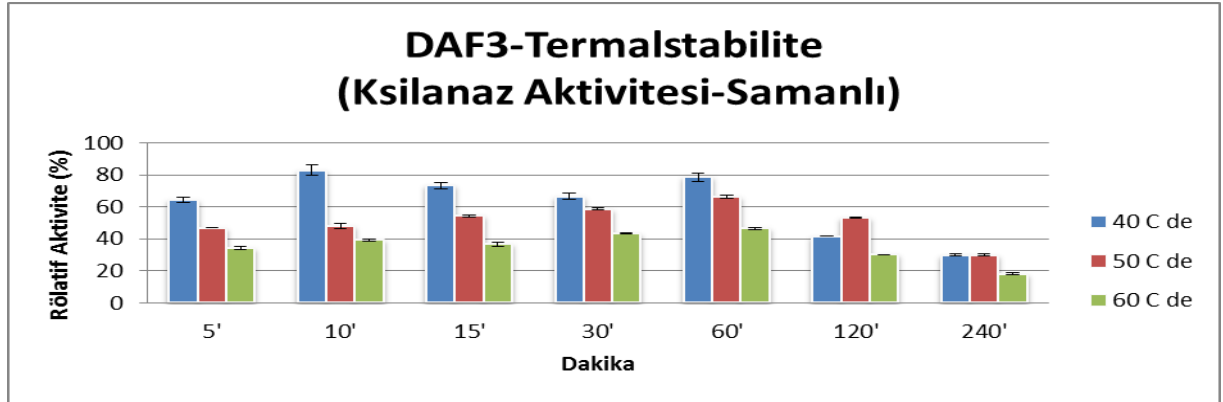
Şekil 3.9. DAF-3-Glikozlu ortamda gelişen *Neocallimastix sp.*



Şekil 4.1. DAF-1-Samanlı ortamda gelişen *Neocallimastix sp.*



Şekil 4.2. DAF-2-Samanlı ortamda gelişen *Neocallimastix sp.*



Şekil 4.3. DAF-3-Samanlı ortamda gelişen *Neocallimastix sp.*

4.5. Anaerobik Fungusların Fibrolitik Enzimlerinin Kantitatif Ölçümü

Anerobik funguslar farklı genlere sahiptirler bundan dolayı ürete bildikleri protein miktarıda farklıdır. Tez çalışmamızda kullandığımız DAF-1-, DAF-2- VE DAF-3- fungal izolenin ksilanaz, KMSaz ve Likenaz içeren ortamlarda ürete bildikleri protein miktarlarına bakıldı sonuçlar tablo 1.4 ve tablo 1.5. verilmiştir.

Tablo 1.4. *Neocallimastix sp.* DAF1, DAF2 ve DAF3'ün samanlı ortamdaki hücre dışı toplam ($\mu\text{mol/dk/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) ksilanaz enzim aktivitesinin günlere göre belirlenmesi

	Likenaz		KMSaz		Ksilanaz	
	<i>Toplam Aktivite</i>	<i>Spesifik Aktivite</i>	<i>Toplam Aktivite</i>	<i>Spesifik Aktivite</i>	<i>Toplam Aktivite</i>	<i>Spesifik Aktivite</i>
DAF1	8,20±0,04	157,36±3,83	5,58±2,79	155,84±5,75	26,73±0,23	499±19,29
DAF2	6,40±0,16	134,63±1,65	4,98±2,49	159,70±3,88	26,53±0,71	560,42±9,39
DAF3	6,82±0,01	135,56±3,30	4,20±2,10	123,57±4,70	25,94±1,02	513,01±29,22

Tablo1.5. *Neocallimastix sp.* DAF1, DAF2 ve DAF3'ün glikozlu ortamdaki hücre dışı toplam ($\mu\text{mol/dk/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) ksilanaz enzim aktivitesinin günlere göre belirlenmesi

	Likenaz		KMSaz		Ksilanaz	
	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite
DAF1	7,46 $\pm$ 0,05	155,05 $\pm$ 6,57	6,37 $\pm$ 0,06	132,31 $\pm$ 5,84	11,47 $\pm$ 0,32	238,59 $\pm$ 14,94
DAF2	5,73 $\pm$ 0,11	124,95 $\pm$ 2,19	6,63 $\pm$ 0,07	144,65 $\pm$ 1,80	8,43 $\pm$ 0,11	184,03 $\pm$ 3,30
DAF3	4,81 $\pm$ 0,04	94,36 $\pm$ 2,08	5,71 $\pm$ 0,01	111,83 $\pm$ 1,75	19,04 $\pm$ 0,14	372,94 $\pm$ 7,90

Laboratuvarımızda izole edilen farklı cins fungusların Likenaz KMSaz ve ksilanazın aktiviteleri ve bu enzimlerin hücreden mi türediği yoksa hücre dışına mı salındığı belirlendi.

Araştırma sonuçları, tüm cinslere ait KMSaz ve ksilanazın hücre içine büyük oranda salındığını, hücre dışına ise sadece küçük bir miktarının salındığını göstermektedir.

Hücrede üretilen protein içeriği son derece düşüktür ve buna karşılık gelen yüksek enzim aktivitesi, anaerobik fungusların enzim'inin çok aktif olduğunu gösterir.

4.6. Metal İyonları

Metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek için 50°C'de 1 saat ön işlem yapılmış ve kalan enzim aktivite değeri hesaplanmıştır. Enzimin kalan aktivitesinin sonuçları tablo ve şekilde gösterilmiştir.

Tablo 1.6. Metal iyonlarının ve kimyasal reaktiflerin konsantrasyonlarının DAF1 ksilanaz enzimleri üzerindeki etkileri (% $\pm$ St.Hata)

	DAF1		
	1 mM	5 mM	10 mM
Kontrol	100	100	100
KCl	75,39 $\pm$ 4,57	93,01 $\pm$ 11,79	99,70 $\pm$ 1,52
MnCl₂	183,16 $\pm$ 5,24 ★	89,67 $\pm$ 3,68	84,98 $\pm$ 3,91
BaCl₂	122,18 $\pm$ 3,23 ★	96,74 $\pm$ 3,32	78,86 $\pm$ 0,95
FeCl₃	55,30 $\pm$ 0,70	47,79 $\pm$ 1,37	32,94 $\pm$ 0,46
CoCl₂	149,05 $\pm$ 7,60 ★	120,36 $\pm$ 3,66	118,49 $\pm$ 4,30 ★

CuCl₂	105,82±0,76 ★	55,90±1,10	51,35±3,55
PbCl₂	68,45±0,38	61,81±0,72	44,10±3,47
NaCl	112,63±1,85 ★	98,31±6,08 ★	71,35±7,22
EDTA	143,75±1,30 ★	192,06±2,28 ★	96,83±0,61 ★
SDS	28,13±2,88	25,26±4,71	21,88±7,66
β-met	109,11±0,96 ★	96,74±3,32 ★	48,31±3,32
CaCl₂	96,18±0,09 ★	111,81±3,37 ★	55,08±5,50
SnCl₂	92,71±2,00 ★	45,92±0,09	36,15±0,77
MgCl₂	107,94±2,64 ★	92,01±2,13 ★	89,67±3,25

Saflaştırılan selülaz enziminin aktivitesi üzerinde metal iyonları etkisini incelemek üzere 50°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda enzimin 2mm edta, mgci2 ve sds ile inhibe olduğunu, 2mm caci2, mnci2 (%150’nin üzerinde), znci2 ve 2-merkaptetanol’un aktiflikleri test edildi.

Tablo 1.7. Metal iyonlarının ve kimyasal reaktiflerin konsantrasyonlarının DAF2 ksilanaz enzimleri üzerindeki etkileri (% ± St.Hata)

	DAF2					
	1 mM		5 mM		10 mM	
Kontrol	100		100		100	
KCl	76,03±	1,45	92,08± ★	1,00	93,70± ★	2,08
MnCl₂	142,81± ★	4,78	56,41±	3,48	39,69±	3,48
BaCl₂	99,72± ★	5,86	98,16± ★	1,19	55,35±	3,71
FeCl₃	77,37±	4,80	33,05±	2,40	27,48±	2,61
CoCl₂	133,67± ★	5,72	111,82± ★	7,46	72,52±	0,77
CuCl₂	86,96±	3,44	73,13±	3,87	66,28±	2,92
PbCl₂	92,87± ★	3,55	85,40± ★	2,50	68,78±	1,80
NaCl	129,15± ★	2,17	108,92±	2,91	77,03±	2,01
EDTA	89,80± ★	0,26	77,26±	4,18	74,80±	3,37
SDS	35,40±	0,24	26,14±	4,09	5,52±	2,21
β-met	98,16± ★	1,19	48,33±	3,54	22,63±	6,13
CaCl₂	114,21± ★	0,93	108,36± ★	7,01	79,65±	1,02

SnCl₂	90,47±★	1,11	58,97±	0,11	29,71±	0,99
MgCl₂	81,83±	0,31	57,75±	0,95	38,07±	1,35

Tablo 1. 8. Metal iyonlarının ve kimyasal reaktiflerin konsantrasyonlarının DAF3 ksilanaz enzimleri üzerindeki etkileri (% ± St.Hata)

	DAF3					
	1 mM	St.Hata	5 mM	St.Hata	10 mM	St.Hata
Kontrol	100		100		100	
KCl	96,48★	0,38	93,96★	1,08	56,01	4,50
MnCl₂	147,24★	1,51	100,05★	3,39	85,35	4,26
BaCl₂	98,27★	4,14	59,06	6,85	34,07	8,24
FeCl₃	71,65	0,64	30,92	1,81	10,97	1,88
CoCl₂	119,95★	2,99	88,50	2,66	76,17	1,98
CuCl₂	89,50	2,40	72,86	0,96	55,75	3,54
PbCl₂	91,23★	2,90	65,20	2,14	53,39	5,13
NaCl	105,93★	0,53	78,85	1,49	76,33	0,97
EDTA	84,72	4,46	72,39	2,07	49,55	7,12
SDS	37,64	1,73	33,33	0,23	24,62	4,13
β-met	103,31★	2,73	89,34	1,32	50,76	8,26
CaCl₂	117,27★	4,54	106,56★	3,09	70,66	4,55
SnCl₂	83,31	1,79	55,54	0,10	27,98	0,93
MgCl₂	116,17★	2,90	103,73★	3,87	85,77	2,02

★ işaretiyle %90'dan fazla aktivite gösteren örnekler gösterilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doğanın karmaşık mikrobiyal ekosistemlerinden birini içeren rumenin, endüstriyel öneme sahip birçok enzimin kaynağı olduğuna inanılmaktadır. Bu bağlamda rumen mikroorganizmaları üzerinde çalışılmayı hak eden önemli canlı organizmalardır.

Rumenlerin vazgeçilmez gruplarından olan anaerobik funguslar ve ürettikleri enzimler günümüzde ilgi duyulan konular arasındadır. Bunun en önemli kanıtı , son yıllarda hidrolazlara olan talebin artmasıdır. Kaynakları arasında farklılık gösterse de genel anlamda bakıldığında endüstriyel enzimlerin ticari pazar payının 1,6 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir.

Bu enzimlerin kullanım alanlarına göre %14'i hayvan yemi sektöründe, %31'u gıda endüstrisinde ve %55'si genel amaçlı kullanılmaktadır.

Çok farklı sayı ve özellikte olduğu düşünülen rumen anaerobik funguslarından edilmiş. Bunların yalıtımına devam edilmesi, farklı cinslerin bulunmasına yol açacaktır. Moleküler çalışmalar rumen popülasyonunun bilenenden çok daha da geniş olduğunu göstermiştir. Dolayısıyla yeni cins ve türlerin keşfedilmesi söz konusu olabilir. Bu sebeple rumenden ya da rumeni temsil ettiği bilinen taze dışkıdan izolasyon ve saflaştırma işlemlerine devam edilmelidir. Diğer taraftan yalıtımı gerçekleştirilmiş olan ve laboratuvarımız kültür koleksiyonuna dahil edilmiş fungus izolelerin morfolojik verilere dayalı tanımlanmaları yapılmalıdır.

Fungusları enzimleri daha çok hücre içerisine salınmaktadır. Fakat ticari enzim üretiminde enzimlerin hücre dışına salınması istenir. Bunun için enzimleri kodlayan genlerin klonlanması gerekiyor.

6. KAYNAKLAR

- Akin, D.E., Gordon, G.L.R., Hogan, J.P.,** 1983. Rumen bacterial and fungal degradation of *Digiteria pentzii* grown with or without sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 738-748.
- Akin, D.E.,** 1994. Ultrastructure of plant cell-walls degraded by anaerobic fungi. In: Mountfort D.O., Orpin C.G., Eds, *Anaerobic Fungi*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 169-190
- Akyol, I., Comlekcioglu, U., Kar, B., Ekinci, M.S., Ozkose, E.,** 2009. Cloning of a xylanase gene xyn2A from rumen fungus *Neocallimastix* sp. GMLF2 in *Escherichia coli* and its partial characterization. *Biologia* 64(3).
- Asao, N., Ushida, K., Kojima, Y.,** 1993. Proteolytic activity of rumen fungi belonging to genera *Neocallimastix* and *Piromyces*. *Lett. Appl. Microbiol.* 16: 247-250.
- 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. *Enz. Microbial Technol.* 24: 609-614.
- Barr, D.J.S., Kudo, H., Jakober, K.D. and Cheng, K.-J.,** 1989. Morphology and development of rumen fungi: *Neocallimastix* sp. *Piromyces communis* and *Orpinomyces bovis* gen. nov., sp. nov. *Can. J. Bot.* 67: 2815-2824.
- Bata, J., Gerbi, C.,** 1997. Glycoside hydrolase production by an anaerobic fungus *Caecomycetes communis*. *Res. Microbiol.* 148:263-369.
- Bauchop, T.,** 1986. Rumen anaerobic fungi and the utilization of fibrous feeds. *Rev. Rural Sci.* 6: 118- 124.
- Borneman, W. S., Akin, D. E., Ljungdahl, L. G.,** 1989. Fermentation products and plant cell wall degrading enzymes produced by monocentric and polycentric ruminal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 9: 285- 296.
- Borneman, W.S., Hartley, R.D., Morrison, W.H., Akin, D.E., Ljungdahl, L.G.,** 1990. Feruloyl and p-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 345-351.

- Borneman, W.S., Ljungdahl, L.G., Hartley, R.D., Akin, D.E.,** 1991. Isolation and characterization of pcoumaryl esterase from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2377-2344.
- Breton, A., Gaillard-Martinie, B., Gerbi, C., De Segura, B. G., Durand, R., Kherratia, B.,** 1995. Location by fluorescence microscopy of glycosidases and a xylanase in the anaerobic gut fungi *Caecomyces communis*, *Neocallimastix frontalis*, and *Piromyces rhizinifita*. *Curr. Microbiol.* 31: 224-227
- Chen, H., Xinliang, L., Ljungdahl, L.G.,** 1994. Isolation and Properties of an Extracellular β -glucosidase from the polycentric rumen fungus *Orpinomyces* sp. Strain PC-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(1): 64-70.
- 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. *J. Bacteriol.* 179: 6028–6034.
- Çömlekcioglu, U., Akyol, I., Ozkose, E., Kar, B., Ekinci, M.S.,** 2008. Carboxymethylcellulase production by the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix* sp. GMLF7. *Annals of Microbiology* 58 (1): 115-119.
- Çömlekcioglu, U.** 2009. Rumen funguslarının izolasyonu ve bu funguslara ait enzim genleri üzerine moleküler çalışmalar. *Doktora Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Kahramanmaraş*, 251s.
- Davies, D.R., Theodorou, M.K., Brooks, A.E., Trinci, A.P.J.,** 1993a. Influence of drying on the survival of anaerobic fungi in rumen digesta and faeces of cattle. *FEMS Microbiol. Lett.* 106: 59-64.
- Davies, D.R., Theodorou, M.K., Lawrence, M.I. and Trinci, A.P.J.,** 1993b, Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces, *Journal of General Microbiology*, 139: 1395-1400.
- Dehority, B.A. and Orpin, C.G.,** 1997, Development of and natural fluctuations in rumen microbial populations. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*, (edt. P.N. Hobson and C.S. Stewart), Blackie Academic & Professionel, London, p. 196-245.

- Denman S., Xue G.P., Patel B.,** 1996. Characterization of a *Neocallimastix patriciarum* cellulase cDNA (celA) homologous to *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1889-1896.
- Eberhardt, R.Y., Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P.,** 2000. Primary sequence and enzymic properties of two modular endoglucanases, Cel5A and Cel45A, from the anaerobic fungus *Piromyces equi*. *Microbiology* 146: 1999–2008.
- Ekinci, M.S., Ozkose, E., Akyol, I.,** 2006. Effects of sequential sub-culturing on the survival and enzyme activity of *Neocallimastix hurleyensis*. *Turk J Biol* . 30: 157-162.
- Freelove, A.C.J., Bolam, D.N., White, P., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J.,** 2001. A Novel Carbohydratebinding Protein Is a Component of the Plant Cell Wall-degrading Complex of *Piromyces equi*. *J.n Biological Chem.* 276(46): 43010-43017.
- Fliegerova, K., Hodrova, B., Voigt, K.,** 2004. Classical and molecular approaches as a powerfull tool for the characterization of rumen polycentric fungi. *Folia Microbiol.* 49(2): 157-164.
- Flint, H.J.,** 1994. Molecular genetics of obligate anaerobes from the rumen. *FEMS Microbiol. Lett.* 121: 259-268.
- Gerbi, C., Bata, J., Breton, A., Prensier, G.,** 1996. Glycoside and polysaccharide hydrolase activity of the rumen anaerobic fungus *Caecomyces communis* at early and final stages of the developmental cycle. *Curr. Microbiol.* 32: 256-259.
- Grenet, E., Barry, P.,** 1988. Colonization of thick-walled plant tissues by anaerobic fungi. *Anim. Fd. Sci. Technol.* 19: 25-31
- Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., Laurie, J.I., Orpin, C.G., Xue, G.P.,** 1992. Homologous catalytic domains in a rumen fungal xylanase: evidence for gene duplication and prokaryotic origin. *Mol. Microbiol.* 6: 2065-2072
- Gordon, G.L.R., Phillips, M.W.,** 1989. Degradation and utilization of cellulose and straw by three different anaerobic fungi from the ovine nunen. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1703-1710.

- Gordon, G.L.R., Phillips, M.W., 1992.** Extracellular pectin lyase produced by *Neocallimastix* sp. LM1, a rumen anaerobic fungus. *Lett. Appl. Microbiol.* 15: 113-115.
- Gomez De Segura, B., Fevre, M., 1993.** Purification and Characterization of Two 1,4- β -Xylan Endohydrolases from the Rumen Fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(11): 3654-3660.
- Gomez De Segura, B., Durand, R., Fevre, M., 1998.** Multiplicity and expression of xylanases in the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 164: 47-53.
- Heath, I.B., Bauchop, T. and Skipp, R.A., 1983.** Assignment of the rumen anaerobe *Neocallimastix frontalis* to the Spizellomycetales (Chytridiomycetes) on the basis of its polyflagellate zoospore ultrastructure. *Can. J. Bot.* 61: 295-307.
- Heath, I.B., Kaminsky, S.g.w., Bauchop, T., 1986.** Basal body loss during fungal zoospore encystment: Evidence against centriole autonomy. *Journal of Cell Science*, 83: 135-140.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Lumbsch, H.T., Lutzoni, F., Matheny, P.B., Mclaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.-C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Kõljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.-H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.-M., Mozley- Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.-J. and Zhang, N., 2007.** A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111: 509-547.
- Ho, Y.W., Abdullah, N. and Jalaludin, S., 1994.** *Orpinomyces intercalaris*, a new species of polycentric anaerobic rumen fungus from cattle. *Mycotaxon.* 50: 139-150.

- Ho, Y.W., Wong, M.V.L., Abdullah, N., Kudo, H., Jalaludin, S.,** 1996. Fermentation activities of some new species of anaerobic rumen fungi from Malaysia. *J. Gen. Microbiol.* 42: 51-59
- Ho, Y. W., Abdullah, N.,** 1999. The Role of Rumen Fungi in Fibre Digestion. *AJAS* 1999 Vol.12 104-112
- Hobson, P.N. and Wallace, R.J.,** 1982, Microbial ecology and activities in the rumen: Part II, *Critical Reviews in Microbiology*, 9: 253-320.
- Hobson, P.N.,** 1971, Rumen microorganisms, *Progress in Industrial Microbiology*, 9: 42-77.
- Ho, Y.W. and Barr, D.J.S.,** 1995. Classification of anaerobic fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia. *Mycol.* 87: 655-677.
- Ho, Y.W., Bauchop, T.,** 1991. Morphology of three polycentric rumen fungi and a description of the procedure for the induction of zoosporogenesis and release of zoospores in culture. *Journal of General Microbiology*, 137:213-217
- Huang, Y.H, Huang, C.T., Hseu, R.S.,** 2005. Effects of dockerin domains on *Neocallimastix frontalis* xylanases, *FEMS Microbiology Letters* 243: 455– 460.
- 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*. Ed. J.V. Nolan, R.A. Leng, D.I. Demeyer. *Penambul Books, Armidale, Australia*: 259-260.
- Joblin, K.N. and Naylor, G.E.,** 1993, Inhibition of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* by fermentation products, *Letters in Applied Microbiology*, 16: 254-256.
- Lowe, S.E., Theodorou, M.K. and Trinci, A.P.J.,** 1985, The utilisation of straw cellulose and related soluble carbon sources by a rumen anaerobic fungus, *Journal of Applied Bacteriology*, 59: XV.
- Lowe, S.E., Theodorou, M.K. and Trinci, A.P.J.,** 1987, Growth and fermentation of an anaerobic rumen fungus on various carbon sources and effect of temperature on development, *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 1210-1215.

- Lowe, S.E., Theodorou, M.K., Trinci, A.P.J.,** 1987. Cellulases and xylanases of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose and xylan. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1216-1223.
- Liu, J.R., Yu, B., Liu, S.H., Cheng, K.J., Chen, Y.C.,** 2005. Direct cloning of a xylanase gene from the mixed genomic DNA of rumen fungi and its expression in intestinal *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Microbiol. Lett.* 251: 233–241.
- Michel, V., Fonty, G., Millet, L., Bonnemoy, F., Gouet, Ph.,** 1993. In vitro study of the proteolytic activity of rumen anaerobic fungi. *FEMS Microbiol Lett.* 110: 5-10.
- Milne, A., Theodorou, M.K., Jordan, M.G.J., King-Spooner, C. and Trinci, A.P.J.,** 1989, Survival of anaerobic fungi in faeces, in saliva and in pure culture, *Experimental Mycology*, 13: 27-37.
- Munn, E.A.,** 1994. The ultrastructure of anaerobic fungi. In: *The Anaerobic Fungi.* (ORPIN, C.G., MOUNTFORT, D.O. editör). *Marcel Dekker, New York*, pp. 47- 105.
- Mountfort, D.O., Asher, R.A.,** 1985. Production and regulation of cellulose by two strains of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1314-1322
- Mountfort, D.O., Asher, R.A.,** 1988. Production of α - amylase by the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2293-2299.
- Mountfort, D.O., Asher, R.A.,** 1989. Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1016-1022.
- McAllister, T. A., Dong, Y., Yanke, L. J., Bae, H. D., Cheng, K.J., Costerton, J. W.,** 1993. Cereal grain digestion by selected strains of ruminal fungi. *Can. J. Microbiol.* 39: 367 376.
- Nagy, T., Tunnicliffe, R.B., Higgins, L.D., Walters, C., Gilbert, H.J., Williamson, M.P.,** 2007. Characterization of a Double Dockerin from the Cellulosome of the Anaerobic Fungus *Piromyces equi*. *J. Mol. Biol.* 373: 612–622.
- Orpin, C.G.,** 1976, Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*, *Journal of General Microbiology*, 94: 270-280.

- Orpin, C.G.**, 1977. The rumen flagellate *Piromonas communis*: its life history and invasion of plant material in the rumen. *Journal of General Microbiology*, 99: 107-117.
- Orpin, C.G. and Joblin, K.N.**, 1988, The rumen anaerobic fungi. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*, (edt. P.N. Hobson), Elsevier, London, p. 129-150.
- Orpin, C.G.**, 1975. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiology*, 91: 249-262. , 1976. Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. *Journal of General Microbiology*, 94: 270-280. , 1977. The rumen flagellate *Piromonas communis*: its life history and invasion of plant material in the rumen. *Journal of General Microbiology*, 99: 107-117.
- Orpin, C.G. and Bountiff, L.**, 1978, Zoospore chemotaxis in the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*, *Journal of General Microbiology*, 104: 113-122.
- Özköse, E., Ekinci, M.S. ve Akyol, Đ.**, 2003, Biyoteknolojik potansiyel olarak anaerobik funguslar: Kültüre alınmaları ve morfolojileri, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 6:129-139.
- 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: 666 673
- Pearce, P.D., Bauchop, T.**, 1985. Glycosidases of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* grown on cellulosic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1265-1269.
- Phillips, M.W., Gordon, G.L.R.**, 1988. Sugar and polysaccharide fermentation by anaerobic fungi from Australia, *Britain and New Zealand. BioSystems* 21: 377-383.
- Phillips, M.w., Gordin, G.L.R.**, 1989. Growth characteristics on cellobiose of three different anaerobic fungi isolated from the ovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1695-1702.
- Raghothama, S, Eberhardt, R.Y., Simpson, P., Wigelsworth, D., White, P., Hazlewood, G.P.**, Characterization of a cellulosome dockerin domain from the anaerobic fungus *Piromyces equi*. *Nat. Structural Biol.* 8(9): 775-778

- Savage, D.C.**, 1977, Microbial ecology of the gastrointestinal tract, *Animal Review Microbiology*, 31: 107-133.
- Theodorou, M. K., Gill, M. K., King-Spooner, C., Beever, D.E.**, 1990. Enumeration of anaerobic chytridiomycetes as thallus forming units: a novel method for the quantification of fibrolytic fungal populations from the digestive tract ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1073-1078.
- Theodorou, M.K., Zhu, W.Y., Rickers, A., Nielsen, B.B. Gull, K., Trinci, A.P.J.**, 1996. Biochemistry and ecology of anaerobic fungi. The Mycota: VI Human and Animal Relationship. Ed. D.H. Howard, J.D. Miller. *Springer-Verlag, New York*, 265-295.
- Tripathi, V.M., Sehgal, J.P., Puniya, A.K., Singh, K.**, 2007. Hydrolytic activities of anaerobic fungi from wild blue bull (*Boselaphus tragocamelus*). *Anaerobe* 13(1): 36-39.
- Trinci, A.P.J., Davies, D.R., Gull, K., Lawrence, M.I., Nielsen, B.B., Rickers, A. And Theodorou, M.K.**, 1994, Anaerobic fungi in herbivorous animals, *Mycological Research*, 98: 129-152.
- Wallace, R.J., Joblin, K.N.**, 1985. Proteolytic activity of a rumen anaerobic fungus. *FEMS Microbiol Lett.* 29: 19-25
- Webb, J., Theodorou, M.K.**, 1988. A rumen anaerobic fungus of the genus *Neocallimastix*: ultrastructure of the polyflagellate zoospore and young thallus. *BioSystems* 21: 393-401.
- Williams, A.G., Orpin, C.G. 1987a.**, Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative growth stages of the rumen fungi *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and an unidentified isolate grown on a range of carbohydrate substrates, *Can. J. Microbiol.* 33 (5): 427-434
- Williams, A.G., Orpin, C.G.**, 1987b. Polysaccharidedegrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi on a range of carbonhydrate substrates. *Can. J. Microbiol.* 33: 418-426.

- Wood, T.M., Wilson, C.A., McCrea, S.I., Joblin, K.N.,** 1986. A highly active extracellular cellulase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 34: 37-40.
- Wubah, D.A., Fuller, M.S. and Akin, D.E.,** 1991, Resistant body formation in *Neocallimastix* sp., an anaerobic fungus from the rumen of the cow, *Mycologia*, 83: 40-47.
- Wubah, D.A., Kim, D. S.H.,** 1996. Chemoattraction of anaerobic ruminal fungi zoospores to selected phenolic acids. *Microbiological Res.* 151: 257-262
- Xue, G.P., Gobius, K.S., Orpin, C.G.,** 1992. A novel polysaccharide hydrolase cDNA (celD) from *Neocallimastix patriciarum* encoding three multifunctional catalytic domains with high endoglucanase, cellobiohydrolase and xylanase activities. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2397-2403.
- Yanke, L.J., Dong, Y., McAllister, T.A., Bae, H., Cheng, K.J.,** 1993. Comparison of amylolytic and proteolytic activities of ruminal fungi grown on cereal grains. *Can. J. Microbiol.* 39: 817-820
- Yanke, L.J., Selinger, L.B., Lynn, J.R., Cheng, K.J.,** 1996. Comparison of the influence of carbon substrates on the fibrolytic activities of anaerobic rumen fungi. *Anaerobe* 2: 373-378.
- Ye, X.Y., Ng, T.B., Cheng, K.J.,** 2001. Purification and characterization of a cellulase from the ruminal fungus *Orpinomyces joyonii* cloned in *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33: 87-94.
- Zhu, W.Y., Theodorou, M.K., Longland, A.C., Nielsen, B.B., Dijkstra, J. and Trinci, A.P.J.,** 1996, Growth and survival of anaerobic fungi in batch and continuousflow cultures, *Anaerobe*, 2: 29-37.
- Zhu, W.Y., Theodorou, M.K., Nielsen, B.B. and Trinci, A.P.J.,** 1997, Dilution rate increases production of plant cell wall degrading enzymes by anaerobic fungi in continuous-flow culture, *Anaerobe*, 3: 49-59.