



Geliş(Received) :01.02.2021
Kabul(Accepted) :15.05.2021

Derleme
Doi: 10.30708.mantar872258

Anaerobik Funguslarda Hidrojenozomlar: Hidrojen Üreten Organeller

Ferit Can YAZDIÇ^{1*}, Fadime YAZDIÇ², Bülent KAR³, Emin ÖZKÖSE⁴, Mehmet Sait EKİNCİ⁵

*Sorumlu yazar: fcanyazdic@munzur.edu.tr

¹ Munzur Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoteknoloji ABD, Tunceli
Orcid No/Orcid ID: 0000-0002-2762-3027/ fcanyazdic@munzur.edu.tr

² Bingöl Üniversitesi, Merkezi Laboratuvar Uygulama ve Araştırma Merkezi, Bingöl
Orcid No/ Orcid ID: 0000-0002-2515-9400/ fyazdic@bingol.edu.tr

³ Munzur Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoteknoloji ABD, Tunceli
Orcid No/ Orcid ID: 0000-0002-8839-2605/ bkar@munzur.edu.tr

⁴ Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, K.maraş
Orcid No/ Orcid ID: 0000-0001-5710-4175/eozkose@ksu.edu.tr

⁵ Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, K.maraş
Orcid No/ Orcid ID: 0000-0001-7994-0203/ sekinci@ksu.edu.tr

Öz: Funguslar ökaryotlar içerisinde birçok farklı grubu oluştururlar. Çoğu fungus mitokondri içerir ve oksidatif fosforilasyon yapabilir. Diğer taraftan herbivor memelilerin sindirim sistemindeki *Neocallimastigomycota* fungusları mitokondri yerine hidrojenozom olarak bilinen bir organel bulundurulur. Anaerobik çevreye uyumun anahtarı olma özelliğine sahip bu organel eşsizdir. Bu derlemede, bu önemli organellerin işlevi, yapısı, biyokimyası, genetik özellikleri ve kalıtımı hakkında bilinenleri kısaca özetlemek istiyoruz.

Anahtar kelimeler: Hidrojenozom, anaerobik funguslar, rumen

Hydrogenosomes in the Anaerobic Fungi: Hydrogen-Producing Organelles

Abstract: Fungi form a very diverse group in eukaryotes. Most of the fungi contain mitochondria and capable of oxidative phosphorylation. On the other hand, anaerobic *Neocallimastigomycota* fungi are in the gastrointestinal tract of many herbivorous mammals, they contain an organelle known as hydrogenosome instead of mitochondria. These organelles capable of being the key to adaptation to an anaerobic environment that is is unique. In this review, we wish to briefly summarize what is known about function, structure, biochemistry, genetics properties and inheritance of these important organelles.

Key words: Hydrogenosome, anaerobic fungi, rumen

Giriş

Doğadaki birçok anaerobik habitatta mitokondriden yoksun çok sayıda ökaryotik canlı bulunur (van der Giezen ve ark., 2003). Bu habitatların en önemlilerinden birisi de ruminant hayvanlardaki rumendir. Rumen, ruminant sindirim sisteminin hacim olarak en büyük kısmını oluşturur. Ayrıca redoks potansiyeli oldukça düşük olan anaerobik bir ortama sahiptir. Bu durum konak hayvan tarafından kullanılan enerjinin korunmasına yardımcı olmaktadır. Rumende fermentasyonun

gerçekleştirilebilmesi için oksijensiz ortam gereklidir. Çünkü düşük seviyelerdeki O₂ dahi rumende bulunan birçok mikroorganizma için öldürücü olabilmektedir.

Anaerobik funguslar (AF) herbivor memelilerin bir çoğunun sindirim sisteminde görülen önemli simbiyontlardır (Trinci ve ark., 1994). Anaerobik fungusların, rumen içerisindeki en büyük katkıları bitkisel materyalin sindirilmesini sağlayan enzimlere sahip olmalarıdır. Bu ökaryotik mikroorganizmalar mitokondriden yoksundur. Bu organizmalarda mitokondri



yerine ATP üreten organel olarak “hidrojenozomlar” bulunur (Yarlett ve ark., 1986; Müller, 1993). Bu fungal hidrojenozomlar ATP'ye ilaveten hidrojen, CO₂, asetat ve format üretirler (Marvin-Sikkema ve ark., 1990; Akhmanova ve ark., 1999).

Hidrojenozomlar, filogenetik olarak üç gruba ayrılabilir. Bunlar parabasalian flagellatlar, anaerobik

siliatlar ve anaerobik funguslardaki hidrojenozomlardır (Roger, 1999). Ayrıca bu hidrojenozomların ultrastrüktürel yapıları ve fizyolojileri de birbirinden farklılık gösterir (Boxma ve ark., 2004). Karbon ve enerji metabolizmalarına göre ise hidrojenozomlar, Tip I ve Tip II şeklinde ayrılabilir (Tablo 1).

Tablo 1. Mitokondri içermeyen protozoonlar ve funguslardaki hidrojenozomlar ile ökaryot mitokondrilerdeki karbon ve enerji metabolizması (Hackstein ve ark., 1999).

	Mitokondri içermeyen Anaerob (Entamoeba) Tip I, Sitoplazma	Mitokondri içermeyen Anaerob (Protozoonlar) Tip II		Mitokondri içermeyen Anaerob (Funguslar) Tip II		Aerobik Mitokondri	
		Sitoplazma	Hidrojenozom	Sitoplazma	Hidrojenozom	Sitoplazma	Mitokondri
Pirüvattan Sorumlu Enzim	Piruvat-fosfat dikinaz	PK	Malat DH	PK	Malik Enzim	PK	Malik Enzim
Asetil-CoA Sorumlu Enzim	PFO	Bulunmaz	PFO	PFL	PFL	İzositrat liyaz	PDH
Son Elektron Alıcısı	Asetil CoA asetaldehit	Pirüvat	Ferredoksin	Pirüvat, Asetil CoA, Fumarat	H ⁺	Pirüvat	O ₂
Fermentasyon Ürünleri	Asetat, Etanol, Alanin	Ethanol, Malat, Süksinat, Laktat, Alanin, Gliserol	Asetat, H ₂ , Malat	Asetat, Format, Süksinat, Laktat, Etanol	Asetat, Format	Etanol, Laktat	CO ₂ , H ₂ O
Etanol Oluşumu	Asetil-CoA redüktaz/ ACDH yardımıyla Asetil CoA'dan	Asetaldehitten	Bulunmaz	Asetil CoA/ACDH yardımıyla Asetil CoA'dan	Bulunmaz	Asetaldehitten	Bulunmaz
ATP Oluşumunda Görevli Enzim	PGK, Asetat thiokinaz, Piruvat-fosfat dikinaz	PGK, PK, PEPCK	ASCT, STK	PGK, PK, PEPCK	ASCT, SK	PGK, PK	ASCT, STK
[Fe]-Hidrojenaz	Yok	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Yok
Elektron Taşıma Zinciri	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Var
PMF(Proton Hareket Gücü)/delta pH	Yok	Yok	Var	Yok	Var	Yok	Var

Kısaltmalar: ACDH: Asetaldehit dehidrojenaz, ASCT: Asetat-Süksinat-CoA transferaz, DH: Dehidrojenaz, PDH: Piruvat dehidrojenaz, PEPCK: Fosfoenol piruvat karboksikinaz, PFL: Piruvat-format liyaz, PFO: Piruvat-ferredoksin oksidoredüktaz, PGK: Fosfogliserat kinaz, PK: Pirüvat kinaz, STK: Süksinil-CoA sentetaz.

Organizmaların, özellikle de anaerobik ekosistemde yaşayanların yüksek bir oranı, oksijensiz hayata adapte olabilmişlerdir. Anaerobik solunum sistemlerinin görüldüğü prokaryotlar ve ökaryotların birçoğunda, oksijen yerine elektron alıcısı olarak nitrat, sülfat, karbonat veya demir gibi alternatifleri kullanabilmek için evrimleşmiştir (Martin ve Russell, 2003). Anaerobik şartlar altında mitokondri son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanamazlar ve temel görevleri olan ATP üretimi ile enerjinin korunumunu gerçekleştiremezler. Bu yüzden anaerobik ökaryotların birçoğunda mitokondri yerine farklı bir organelin bulunması şaşırtıcı değildir. Ancak mitokondrinin eksikliği fonksiyonlarının yerine getirilmeyeceği anlamına

gelmemektedir. İlk zamanlar mitokondrisiz anaerobik ökaryotlar ilkel organizmalar olarak görülmüşlerdir. Bu yüzden “archaezoa” olarak tanımlanmışlardır (Cavalier-Smith, 1983). *Giardia* veya *Entamoeba* gibi organizmalar bu hipoteze örnek olarak gösterilebilir. Birçok çalışma bu organizmaların genomunda mitokondrial genlerin yanında mitokondrial metabolik yolların da bulunduğunu göstermektedir (Hashimoto ve ark; 1998; Vanacova ve ark., 2003 ve Timmis ve ark., 2004). Diğer taraftan tek hücreli olan bu organizmalar Tip I anaerobların en iyi örneğini oluştururlar (Müller, 1998; Tovar ve ark., 2003). Bu organizmaların enerji metabolizması, sitozolde bulunan fermentasyon enzimlerine bağlıdır (Rosenthal ve ark., 1997; Müller, 1998). Belirlenen birçok genin



anaerobik ökaryot ve arkealara yatay gen transferiyle geçtiği düşünülmektedir (Koonin, 2015). *Giardia lamblia* ve *Entamoeba histolytica*'nın fermentasyon enzimlerinin bazısının filogenetik analizleri, yatay gen transferinin olabileceğini göstermiştir (Rosenthal ve ark., 1997; Field ve ark., 2000). Fakat prokaryotik bir organizmadan ökaryotik bir organizmaya yatay gen transferi konusu hala tartışmalıdır (Koonin, 2015).

Bazı protistler ve anaerobik funguslar anoksik nişlere adaptasyonlarını, hidrojenozomlarına borçludurlar (Martin ve Müller, 1998). Tip II olarak sınıflandırılan bu grubun en önemli karakteristik özelliği, hidrojenozomlara alınan pirüvat (veya malat) oksidatif olarak pirüvat:ferredoksin oksidoredüktazın (PFO) hareketiyle asetil CoA için dekarboksile edilmesidir. Trikomonadlar ve anaerobik fungusların hidrojenozomları karşılaştırıldığında, bunlar arasındaki en önemli farkın, trichomonadlarda pirüvatın asetil Co-A'ya dekarboksilasyonunda, pirüvat-ferredoksin oksidoredüktaz (PFO) kullanılırken (Lindmark ve Müller, 1973; Müller, 1998), anaerobik funguslar olan *Neocallimastix* sp. L2 ve *Piromyces* sp. E2'nin pirüvat metabolizmasında en önemli enzimatik aktivitenin pirüvat-format liyaz (PFL) enzimi ile sağlanmasıdır (Marvin-Sikkema ve ark., 1993; Akhmanova ve ark., 1999). Anaerobik funguslarda hala PFO tam anlamıyla aydınlatılmamıştır. *Neocallimastix* sp. L2 ve *N. patriciarum*'da düşük miktarda PFO aktivitesi ölçülmüştür (Yarlett ve ark., 1986; Marvin-Sikkema ve ark., 1993), fakat ne *N. frontalis* ne de diğer anaerobik funguslarda PFO aktivitesi henüz tam olarak aydınlatılabilmmiştir (O'Fallon ve ark., 1991). Özellikle kitridlerde varsayılan PFO aktivitesi için, ne bu enzimin saflaştırılması ne de PFO geninin tanımlanması mümkün olmamıştır. Diğer taraftan *Neocallimastix* sp. L2 ve *Piromyces* sp. E2'deki sitoplazmik ve hidrojenozomal pirüvat-format liyaz (PFL)'in bir multigen ailesi tarafından kodlandığı bilinmektedir (Akhmanova ve ark., 1999). Bu durum ökaryotlar için sıradışıdır. PFL aktivitesi özellikle fakültatif anaerobik *Enterobacteria* ve *Firmicutes*'in karakteristik bir özelliğidir. Bu bakteriler tıpkı anaerobik *Chytridiomycete* fungusları gibi anaerobik şartlar altında karışık asit fermentasyonu gerçekleştirirler (Marvin-Sikkema ve ark., 1990; Jullian ve ark., 1998). Nükleotit dizileme çalışmaları ile henüz bir PFO DNA dizisi elde edilmemişken, farklı çalışmalarda PFL nükleotit dizileri elde edilmiştir (Durand ve ark., 1995; Gelius-Dietrich ve Henze, 2004).

Hidrojenozomların, mitokondrilerle beraber gözlemlenmesine dair henüz hiçbir bilgi yoktur. Ayrıca bitkilerde, çok hücreli hayvanlarda ve

mikroorganizmalarda gözlenmemişlerdir. Bununla birlikte hidrojenozomların filogenetik olarak bağlantısız organizmalarda bulunması, benzer olup olmadıkları, aynı atadan evrilip evrilmedikleri veya evrimlerinin nasıl olduğu ile ilgili soruları artırmaktadır. Bu çalışmada anaerobik funguslardaki enerji merkezi olarak bilinen hidrojenozomlar hakkında mevcut bilgilerden faydalanılarak, henüz tam olarak anlaşılammış bu organelin yapısı, biyokimyası ve genetik özellikleri hakkında bilgiler derlenmeye çalışılmıştır.

Morfolojisi

Hidrojenozomların morfolojileri gruplar arasında farklılık gösterir. Morfolojik olarak bu gruplar parabasalid flagetlar (*Trichomonas vaginalis*) (Benchimol ve ark., 1996), rumen siliatları (*Isotricha ruminantum*) (Yarlett ve ark., 1984), rumen fungusları (*Neocallimastix* sp.) (van der Giesen, 1997) ve tatlısu siliatları (*Trimyema* sp.) (Finlay ve Fenchel, 1989) şeklinde ayırılabilir. Fakat morfolojik olarak yapılan bu ayırım hidrojenozomlar için yeterli değildir. İlk olarak Trikomonad ve diğer parabasalidlerde görülen hidrojenozomlar tek membranlı görünüşleri, nispeten uniform matriksli oluşları ve geniş intraorganel membran sisteminin eksikliği nedeniyle mikrosimcik olarak tanımlanmışlardır (Müller, 1973). İlk yıllarda anaerobik funguslarının 5 cinsinin hidrojenozomu ultrastrüktürel olarak incelenmiş ve tek üniteli bir membrana sahip oldukları belirtilmiştir (Heath ve ark., 1983; Li ve ark., 1990; Li ve ark., 1991). Bu öneri, Benchimol (1997) ve van der Giesen (1997b)'nin *Neocallimastix* sp.'de hidrojenozomun iki membrandan oluştuğunu gösterene kadar kabul edilmiştir (Şekil 1). Bu zarlar birbirlerine çok yakın ve çok ince oluşlarından ayırımını yapmak çok zordur. Genellikle iki zar arasındaki boşluk fark edilememektedir. Her bir membran 6 nm arasında bir kalınlığa sahiptir ve belirli dalgalanmalar göstermektedir (Benchimol ve De Souza, 1983; Benchimol ve ark., 1996).

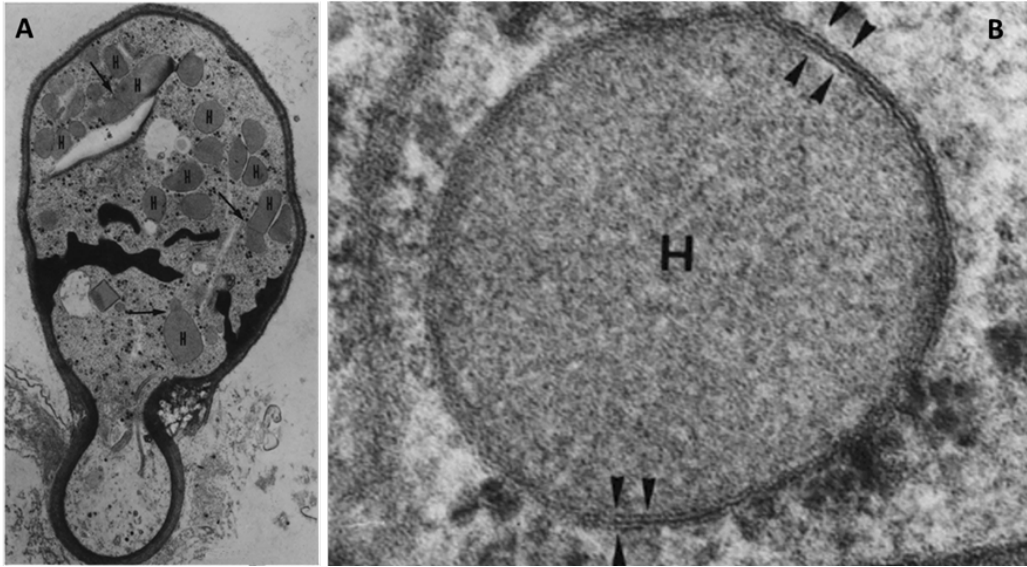
Çoğunlukla hidrojenozomlarda bir veya birden fazla kalsiyum içeren periferel vezikül bulunmaktadır. Bu periferel veziküller hidrojenozomun matriksinden izole edilmiş bölümler olarak kabul edilirler. Fonksiyonsuz hidrojenozomlar otofajik süreçle çıkartılır ve lizozomlarda parçalanırlar (Benchimol, 2007). Morfolojik olarak rumen siliatlarındaki organeller trikomonadlardaki organellerle benzerlik gösterirler (Yarlett ve ark., 1984; Paul ve ark., 1990).

Rumen funguslarındaki hidrojenozomlar, organizmaların hayat döngüsü safhalarına bağlı olarak farklı morfolojilerde görülebilirler (Marvin-Sikkema ve ark., 1992). Bununla beraber anaerobik funguslardaki



hidrojenozomlar trikomonad protozoaninkine çok benzerdir. Zoosporların çimlenmesiyle oluşan hiflerde mikrocisimcik gibi görünmektedirler (Marvin-Sikkema ve ark., 1992). Işık mikroskopunda bazen gerek siliat gerekse fungus örneklerinde hidrojenozomlar genellikle tek membranla çevrelenmiş şekilde görülebilirler. Bu yüzden mikrocisimcik olarak tanımlanırlar (Marvin-

Sikkema ve ark., 1992). Ancak *Polyplastron multivesiculatum* siliatındaki hidrojenozomun, belirgin bir şekilde çift membranlı olduğu görülür (Paul ve ark., 1990). Hidrojenozomlar yaklaşık 1-2 µm büyüklüğünde küresel veya hafif uzatılmış granüller şeklindedirler (Benchimol, 2000).



Şekil 1. *Neocallimastix frontalis*'in rizoidlerindeki hidrojenozomların genel dağılımını (A) ve zoosporlarındaki hidrojenozomların genel görüntüsünü göstermektedir (B). Oklar, bölünme sürecinde olan hidrojenozomları (A) ve birbirine yakın iç ve dış zarları göstermektedir (B) (Benchimol ve ark., 1997).

Metabolik Süreç ve Biyokimyası

Hidrojenozomlar, kimyasal enerji üretmek için oksijene gerek duymayan ve karmaşık bir yapıya sahip olduğu bilinen bir organeldir. Hidrojenozomlar hidrojen üretebilme yetenekleriyle bilinirler ve bunu yapabilecek biyokimyaya sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı mitokondrilere benzedikleri söylenmektedir (van der Giezen ve ark., 1997b; Martin, 2005). Tam bir ATP üretim merkezi gibi işlev gösterirler. Hidrojenozom ismi, protozoada bu organelin metabolizma sırasında gaz haldeki serbest H₂ moleküllerinin oluşmasının gözlenmesi sonucunda verilmiştir.

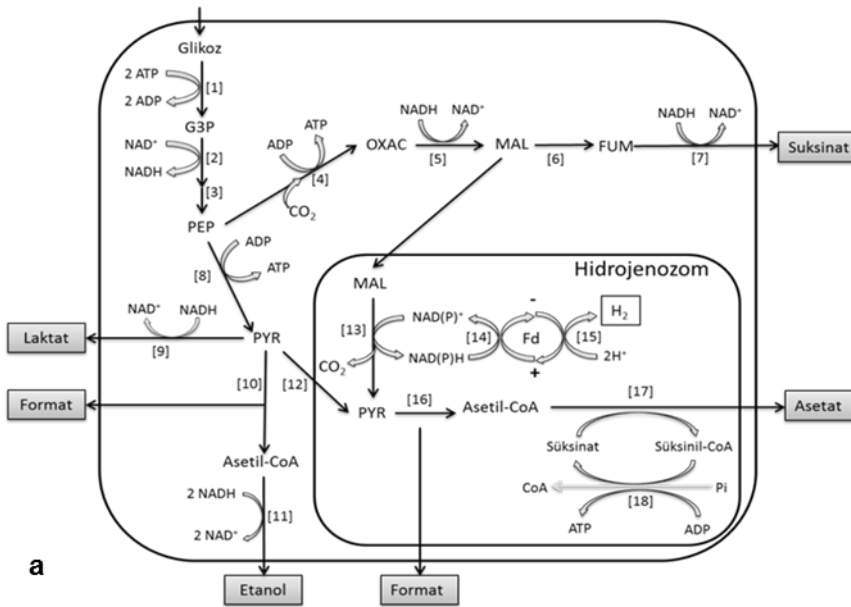
Neocallimastix cinsinden izole edilen birçok hidrojenozom çalışmasında çok küçük farklılıklar dışında hidrojenozomların temel yapısı ve biyokimyasal özelliklerinin aynı olduğu görülmüştür. Zorunlu anaerobik funguslar ve zorunlu anaerobik protozoa ATP sentezleyebilmek için glukoz fermentasyonunu kullanırlar. Sitozolde bulunan enzimlerin kimyasal katalizasyonu ile glukozu laktik asit veya etanole dönüştürürler. Hidrojenozom enzimleri hidrojen gazı üretimi ile glukoz fermentasyonu için alternatif yollar sağlamaktadır (Gleason ve Gordon, 2004).

Anaerobik *Neocallimastigomycota* fungusları hidrojenozomlarında prokaryotik tipte karışık asit fermantasyon yolunu kullanırlar (Boxma ve ark., 2004). Bununla birlikte anaerobik funguslar mitokondri, sitokromlar ve oksidatif fosforilasyon yolunun diğer biyokimyasal özelliklerinden yoksundurlar. Sitozolde glikoliz için birçok enzime ihtiyaç vardır (Şekil 2). Glikoz EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) yolu ya da "fruktoz-1,6-bisfosfat yolu" ile pürüvat üzerinden laktata kadar parçalanır. Bu işlemler birden fazla basamakta gerçekleşir. Her basamak birbirinden bağımsız olup ayrı enzimler tarafından katalize edilir (Yarlett ve ark., 1986; O'Fallon ve ark., 1991) (Şekil 2). *Piromyces* ve *Neocallimastix* funguslarındaki format üretimi aktif bir şekilde bulunan pirüvat:format liyaz (PFL; format C-Asetil transferaz, EC 2.3.1.54) (Boxma ve ark., 2004) sayesinde gerçekleşmektedir. PFL sitozol ve hidrojenozomlarda bulunduğu için asetil-CoA her iki bölümde de oluşur. PFL format üretimini sağlayan oksijene duyarlı bir enzimdir. Reaksiyon mekanizması bir glisil radikaline bağlıdır. PFL'yi aktif hale getiren PFL protein zinciri içerisindeki glisil radikalidir. Birçok ökaryotta heterotrofik ATP sentezinin son ürünü olarak format üretildiği bilinmektedir.



Fermentatif format üretiminin bilinen sadece bir yolu vardır. Bu da pirüvat format liyaz aktivitesiyle gerçekleşmektedir (PFL: syn, Format C-asetiltransferaz; EC 2.3.1.54), bu enzim 85 kDa alt ünitesi olan homodimer bir yapıya sahiptir. Pirüvatı homolitik yolla parçalayarak pirüvat ve koenzim A'yı, format ve asetil-CoA'ya dönüştürür. Enzim mekanizması iki korunmuş sistein kalıntısı ve bir glisil radikalini kapsar. PFL aktivitesi aktif bölgedeki serbest radikaller yüzünden oksijene karşı son derece duyarlıdır. Sitozolde bi-fonksiyonel aldehit/alkol dehidrojenaz (ADHE) ile asetil-CoA etanol ve CoASH

(Koenzim A)'ya dönüşür. Hidrojenozomda asetil-CoA'nın CoA kısmı ASTC (asetat: süksinat CoA-transferaz) vasıtasıyla süksinatta transfer edilir. Genellikle son ürün asetat (Boxma ve ark., 2004) ve süksinil-CoA'dır. Bunlar CoASH'ın rejenarasyonunda ve substrat düzeyinde fosforilasyonda süksinil-CoA sentetaz (SCS) için substrat olarak görev yaparlar (Dacks ve ark., 2006). Bilinen tüm hidrojenozomlar ATP üretimini substrat düzeyinde fosforilasyon yoluyla asetat:süksinat CoA transferaz (ASCT) ve süksinil-CoA sentetaz ile gerçekleştirirler (Müller ve ark., 2012).



Kısaltmalar: Fd: Ferrodoksin, G3P: Gliseraldehid-3-fosfat, PEP: Fosfoenolpirüvat, PYR: Pirüvat, OXAC: oksaloasetat, MAL: Malat, FUM: Fumarat, [1]: Hekzokinaz, glüköz-6-fosfat izomeraz, fosfofruktokinaz, aldolaz ve trioz fosfat izomeraz, [2]: Gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz, [3]: Fosfogliserat kinaz, fosfogliserat mutaz ve enolaz, [4]: Fosfoenol pirüvat karboksikinaz, [5]: Malat dehidrojenaz, [6]: Fumaraz, [7]: Fumarat redüktaz, [8]: Pirüvat kinaz, [9]: Laktat dehidrojenaz, [10]: Sitozolik pirüvat:format liyaz, [11]: Alkol dehidrojenaz E, [12]: Pirüvatın hidrojenozomun içerisine taşınması, [13]: Malik enzim, [14]: NAD(P)H:Ferrodoksin oksidoredüktaz, [15]: Hidrojenaz, [16]: Hidrojenozomal pirüvat:format liyaz, [17]: Asetat:süksinat CoA transferaz, [18]: Süksinil CoA-sentetaz.

Şekil 2. Rumende bulunan *Neocallimastigomycota*'ya ait anaerobik fungus olan *Piromyces* sp. E2'nin hidrojenozomundaki karışık-asit fermentasyon metabolizması (a) (Boxma ve ark., 2004) ve kültür koleksiyonumuzdaki *Piromyces* sp. (GMLF-17) anaerobik fungus örneği (b).

Hidrojenozomal DNA

Şimdiye kadar ki yapılan çalışmalarda herhangi bir hidrojenozomal genoma rastlanmazken çekirdekte kodlanan organel genlerinin filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir (Embley ve ark., 2003; Dyall ve ark., 2004). Ancak mitokondri içermeyen anaeroblar içerisinde sadece *Nyctotherus ovalis* siliyatının bir hidrojenozomal genoma sahip olduğu bulunmuştur (Boxma ve ark., 2005). Bu hidrojenozomun genom verileri, atasının bir mitokondri olduğunu gösterse de, metabolik aktivite yönünden mitokondriye benzememektedir (Shiflett ve Johnson, 2010). Bununla birlikte DNA nükleotit dizileme çalışmaları birçok hidrojenozomal proteinin dizisini

belirlememize yardımcı olmuştur (Shiflett ve Johnson, 2010). Hidrojenozomla ilgili NCBI'da yapılan arama sonucunda şimdiye kadar toplam 173 nükleotit dizisi ve 266 protein dizisi bulunduğu bunlardan anaerobik funguslar için 13 adet protein (Ac. No: P78715.1, AAC49572.1, AAP70004.1, AAK61605.1, AAP33147.1, AAL80023.1, AAL80022.1, AAL80021.1, ABG47413.1, AAN04660.1, CAA12057.1, CAA12056.1, CAA12055.1) ve 12 adet nükleotit (Ac.No: U62041.1, AF419853.1, AY033884.1, AF426026.1, AY078244.1, AY078243.1, AY078242.1, DQ662599.1, AF340168.1, AJ224660.1, AJ224659.1, AJ224658.1) dizisinin belirlendiği bildirilmiştir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Bu dizilerden



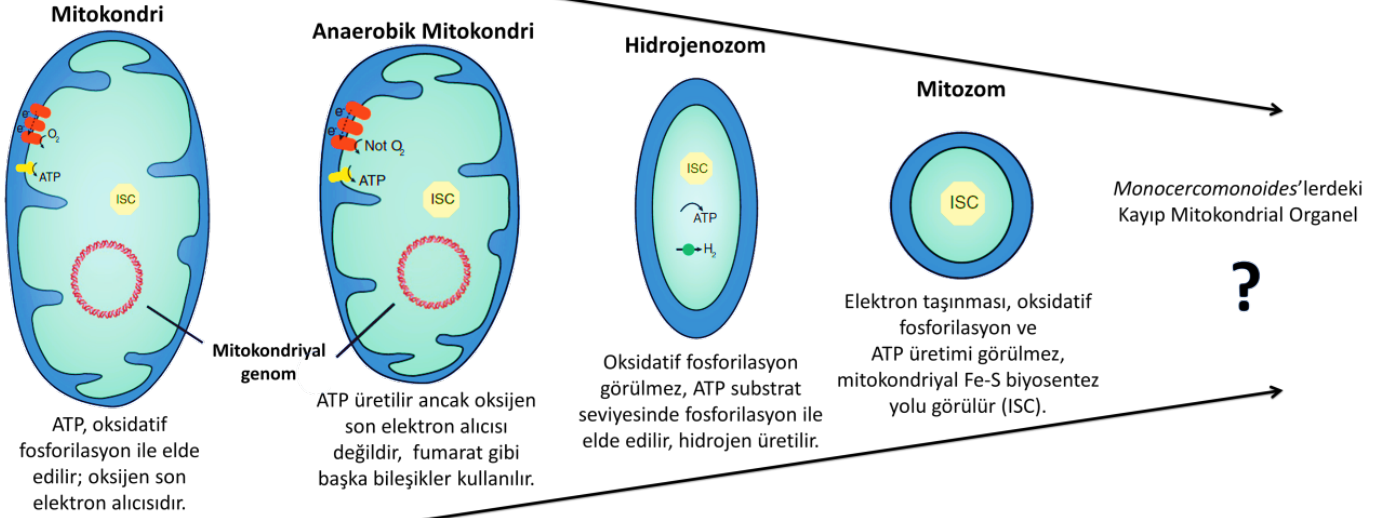
bazıları; *Neocallimastix frontalis*'de hidrojenozomal malik enzim (van der Giezen ve ark., 1997a), ATP/ADP taşıyıcısı (van der Giezen ve ark., 2002), adenilat kinaz, ornitin karbamoiltransferaz (Gelius-Dietrich ve ark., 2007) ve ısı şok proteini 60 (Hsp60) dizileridir. *Neocallimastix patriciarum*'da görülen ısı şok proteini 70 (Hsp70) ve 60 (Hsp60) şeklindeyken, *Piromyces* sp. E2 için ısı şok proteini 60 (Hsp60) ve adenilat kinaz şeklinde görülmektedir (van der Giezen ve ark., 2003). Isı şok proteinleri sitozolde ve hidrojenozomlarda bulunur (van der Giezen ve ark., 2003). Temel görevleri protein agregasyonunu engellemektir. Hidrojenozomlar tarafından üretilen ATP hücre tarafından kullanılabilmesi için sitozole taşınmalıdır. Bu nedenle hidrojenozom bulunduran organizmalarda tıpkı mitokondrilerdeki gibi ADP/ATP taşıyıcılarının görülmesi şaşırtıcı değildir. Bunlara en iyi örnek *T. vaginalis*'de belirlenen Hmp31 proteindir. Biyokimyasal analizler iç membranda bulunan bu proteinin homooligomer bir formda olduğunu ve mitokondrilerdeki taşıma proteinlerine benzediğini göstermiştir (Dyall ve ark., 2000). Benzer özelliklere sahip ADP/ATP taşıyıcıları *Neocallimastix frontalis*'de gözlemlenmiştir (van der Giezen ve ark., 2002).

Hidrojenozomun Evrimsel Kökeni

Mitokondri, farklı yaşam koşulları altında ökaryotların evrimleri sırasında şekil ve işlev bakımından çeşitlenen, ökaryotik hücrelerin atalarından kalma, farklı proteom ve fenotiplere sahip homolog organellerden oluşan geniş bir tanımla ifade eder (Embley ve Martin 2006; Müller ve ark., 2012). Bu mitokondriyal homologların en ilginçleri arasında anaerobik serbest yaşayan ve parazitik mikrobiyal ökaryotlarda bulunan hidrojenozomlar yer alır (Müller, 1993; Lewis ve ark., 2020). Hidrojenozomlar, tipik olarak ökaryotlardan ziyade bakterilerle ilişkilendirilen bir tür metabolizma olan Fe-Fe-hidrojenaz enzimini kullanarak H₂ üretirler (Müller, 1993; Embley ve ark., 1997; Horner ve ark., 2000; Müller ve ark., 2012; Stairs ve ark., 2015). Hidrojenozomların evrimi ve anaerobik metabolizmalarının kökenleri hakkındaki tartışmalar hala devam etmektedir (Martin ve Müller, 1998; Martin ve ark., 2015; Stairs ve ark., 2015; Spang ve ark., 2019).

Hidrojenozomların evrimsel olarak kökeni pek açık değildir. Bu konuda 3 farklı görüş vardır. İlk görüş hidrojenozomların mitokondriden köken aldıkları, ikinci

görüş bu iki organelin ortak bir atasal organelden evrimleştikleri yönündedir. Son görüş ise bu organellerin birbirinden bağımsız olarak evrimleştiğini önermektedir. Anaerobik çevrede yaşamın adaptasyonu ve aynı atadan evrimleşmiş endosimbiont olarak görülen hidrojenozomlar, mitokondrinin alternatifi olarak kabul edilirler (Martin ve Müller, 1998; Tielens ve ark., 2002). Müller (1988) hidrojenozomların tıpkı mitokondri ve kloroplastlar gibi endosimbiont olarak orjinlendiklerini kabul eder. Mitokondrial bir kökenin olabilmesi için piruvat oksidasyon yolunun olması gereklidir. Henüz böyle bir kanıt bulunmamıştır. Bu fikrin aksine Finlay ve Fenchel (1989) ise hidrojenozomların sekonder bir adaptasyonun sonucu olduğunu dile getirmişlerdir. Buna göre hidrojenozomlar, oksijensiz bir yaşam stili kabul eden aerobik protozoonların ihtiyaçlarını karşılamak için modifiye edilmiş bir organeldir. Aslında mitokondrinin kökeni, ökaryot evriminde belirleyici olaylardan birisidir (Burki ve ark., 2016; Poole ve Gribaldo, 2014; Pittis ve Gabaldón, 2016). Moleküler evrim ve hücre biyolojisi araştırması, mitokondrinin kökeninin bilinen tüm ökaryotların ayrışmasından önce olduğunu göstermiştir (Burki ve ark., 2016). Bu durum tüm mevcut ökaryotların veya en azından atalarından kalma soylarının, bir şekilde mitokondri barındırdığı anlamına gelir. Bu güne kadar incelenen tüm türler aerobik mitokondri, anaerobik mitokondri, hidrojenozom ve mitozom veya başka bir ifadeyle evrimsel olarak mitokondri ile ilişkili bir organel bulunmuştur (Burki ve ark., 2016) (Şekil 3). Ancak yapılan bir çalışmada *Monocercomonoides*'in, mitokondri ile ilişkili organelin en indirgenmiş formundan bile yoksun bir ökaryotun ilk örneği olduğunun gösterilmesi, mevcut görüşlerin tekrar elden geçirilmesi gerektiğini göstermiştir (Burki ve ark., 2016). Mitokondri içermeyen ökaryotların birbirinden farklı büyük sistematik gruplarda bulunması, bunlardaki evrimsel ilerlemenin tek bir yolla gerçekleşmediğini göstermektedir (Göçmen, 2003). Müller'e göre (1988) mitokondrial fonksiyonların eksikliği ya primer bir özellik ya da sekonder bir adaptasyondur. Hidrojenozomsuz organizmalar evrimsel sürecin ilkel basamağını temsil ederler (Göçmen, 2003). Bu yüzden, *Entamoeba histolytica* ve *Monocercomonoides* gibi canlılar yaşayan fosiller olarak kabul edilirler (Göçmen, 2003; Burki ve ark., 2016).



Şekil 3. Mitokondri ve ilgili organellerin çok basitleştirilmiş görünümü. Başlıca ayırt edici özellikler gösterilmiştir (Burki ve ark., 2016).

Siliatlar, mitokondriden hidrojenozomlara evrimsel geçişi incelemek için mükemmel bir örnektir. Bunun en önemli nedeni hidrojenozom içeren anaerobik siliatların evrimsel ağaçtaki aerobik mitokondri taşıyan formlar arasına girmiş olmaları gösterilebilir (Embley ve ark., 1995; Fenchel ve Finlay 1995) (Şekil 4). Daha da dikkat çekiçi olan ise, yapılan bir çalışmada, anaerobik siliat *Nyctotherus ovalis*'in hidrojenozomlarının, mitokondriyal atalarının doğrudan moleküler kanıtını sağlayan mitokondriyal bir genoma sahip olduğunun belirlenmiş olmasıdır (Akhmanova ve ark., 1998; Boxma ve ark., 2005; de Graaf ve ark., 2011). Elde edilen veriler, *N. ovalis*'in hidrojenozomlarının, aerobik siliatların gerçek mitokondrileriyle ortak bir atayı paylaşan bir tür anaerobik mitokondriyi temsil ettiğini göstermektedir (van Hoek ve ark., 2000). Buna karşılık, *Trichomonas* spp. mitokondriye sadece zayıf bir morfolojik benzerlik gösterir ve daha da önemlisi, evrimsel bir kanıt sağlayabilecek herhangi bir genom şimdiye kadar belirlenmemiştir (Benchimol ve ark., 1996; Clemens ve Johnson, 2000). Ayrıca, *Psalteriomonas*'in hidrojenozomları üst üste yığılmış kümeler halinde görülürken (Broers ve ark., 1990), *Neocallimastix*'in mikroskop altında tespit edilmesi zor hidrojenozomları (Marvin-Sikkema ve ark., 1992; 1993) mitokondriye benzemezler. Bu hidrojenozomlarda da henüz bir genom belirlenmemiştir (Palmer, 1997; van der Giezen ve ark., 1997b). Bu açıdan bu organellerde

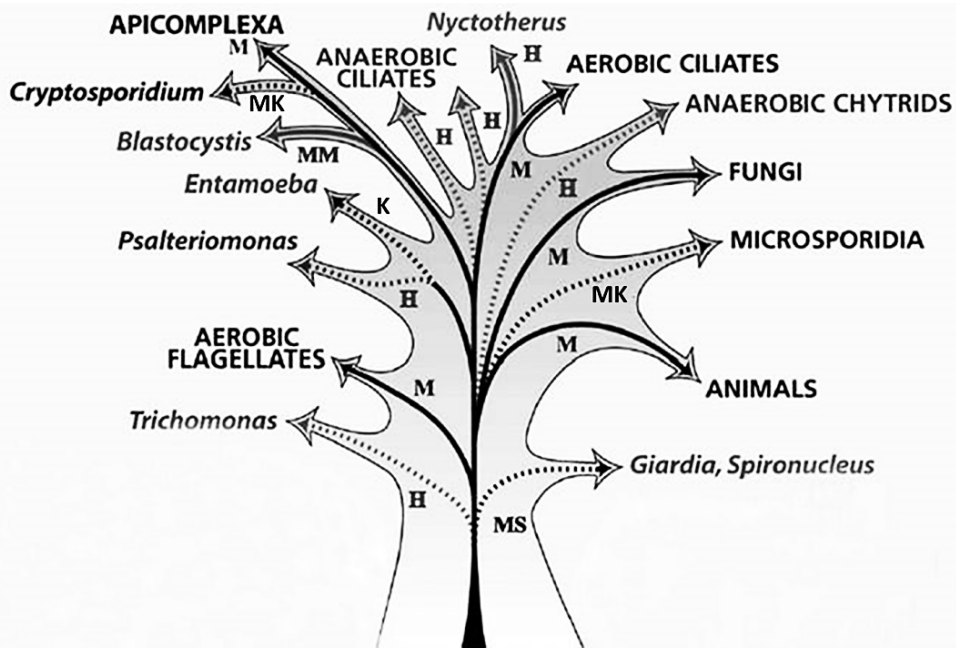
mitokondriyal soyunu doğrudan doğrulamak imkânsızdır. Dahası, çekirdekte kodlanan birkaç hidrojenozomal proteinin filogenetik analizi, mitokondriyal ata için doğrudan kanıt sağlamada yetersiz kalmaktadır. Daha ziyade, mitokondriyal ve mitokondriyal olmayan soyların bir mozaikini ortaya çıkarmıştır (Bui ve ark., 1996; Germot ve ark., 1996; Akhmanova ve ark., 1998; Hackstein ve ark., 1999; Horner ve ark., 1999; 2000; Voncken ve ark., 2002).

Şimdiye kadar elde edilen veriler, tanımlanmış tüm hidrojenozomların mitokondri ile ilgili olduğu hipotezini desteklemektedir (Embley ve ark., 2003). Fungal hidrojenozomlarının başka bir ökaryotik organel olan peroksizomla ilişkili olduğuna dair daha önce de önerilmiş olan hipotez son çalışmalarla pek mümkün görünmemektedir (Embley ve ark., 2003). Hidrojenozomların mitokondri ile ilişkili olduğuna dair en ikna edici kanıtlar, her iki organelde de aynı karmaşık yolların kullanılarak proteinlerin konakçı tarafından ifade edildiğini gösteren deneyler ile olmuştur (Embley ve ark., 2003). Hidrojenozomlarda görevli herhangi bir protein öncelikle sitozolde sentezlenmeli ve daha sonrasında doğru bir şekilde hedef organel içerisine aktarılmalıdır (Embley ve ark., 2003). Mitokondri bir genom içerseler de, proteinlerinin birçoğu konakçı çekirdek genomu tarafından kodlanır. Şimdiye kadar mitokondrielerde, iki ana protein taşıma yolu belirlenmiştir (Pfanter ve



Geissler, 2001). Mitokondrilerin zarında görevli proteinler, dahili hedefleme sinyalleri tarafından varış yerlerine yönlendirilir. Diğer bir taşıma yolunu kullanan mitokondriyal matraste görevli proteinler ise, organel içerisine taşıma sırasında parçalanan amino terminallerinde bir hedefleme dizisi taşıyan ön proteinler olarak sentezlenerek taşınırlar (Embley ve ark., 2003). Mitokondrilerde protein taşıma sistemlerinin geliştirilmesi, organelin evrimindeki ilk ve önemli bir adım olarak görülür ve endosimbiyotik bir bakteri olarak alfa-proteobakteriyel soydan geldiği kabul edilir (Gray ve ark., 1999; Embley

ve ark., 2003). Mitokondriyal protein taşıma mekanizması karmaşıktır ve taşımanın doğruluğu son derece önemlidir. Bu metabolik yolların farklı organellerden evrimleşmiş olma olasılığı çok düşüktür. Aslında, yanlış proteinin yanlış organelde gönderilmesi, hücre için korkunç sonuçlar doğurabilir. Örneğin, öldürücü insan hastalığı olan primer hiperoksalüri tip I, alanin:glioksalat aminotransferaz enziminin, normalde işlev gördüğü peroksizomlardan ziyade mitokondriye yanlış yönlendirilmesinden kaynaklanır (Embley ve ark., 2003).



Şekil 4. Çeşitli moleküler verilere dayanarak oluşturulmuş aerobik ve anaerobik protistler arasındaki filogenetik ilişkiyi göstermek için mitokondri, modifiye edilmiş mitokondri, mitokondriyal kalıntılar ve hidrojenozomlardan oluşan evrim ağacıdır. Düz çizgiler, mitokondriyal genomların analizine dayanan filogenetik ilişkileri gösterir. Kesikli çizgiler, organel genom kaybını gösterir. Kısaltmalar: K, kripton; H, hidrojenozomlar; M, mitokondri; MM, modifiye edilmiş mitokondri; MK, mitokondriyal kalıntı; MS, mitozom (Hackstein'dan (2005) uyarlanmıştır).

Anaerobik fungusların hidrojenozomlardan ADP/ATP taşıyıcılarının fonksiyonel ve filogenetik analizi, bu organeller için bir fungal mitokondriyal kökeninin olduğunu açıkça gösterir (Voncken ve ark., 2002; Tjaden ve ark., 2004). AF hidrojenozomlarının bir genomdan yoksun olduğu göz önüne alındığında, ADP/ATP taşıyıcıları ve HSP60, bu organellerin evrimsel tarihinin izini sürmek için en iyi belirteçler olarak görülmektedir. Her iki genin filogenetik analizi fungal mitokondriyal soyunu ortaya çıkarabilir (Voncken ve ark. 2002).

AF hidrojenozomları, ökaryotik hücrenin evrimi için Martin-Müller hidrojen hipotezinin temelini oluşturan *Trichomonas*'ın hidrojenozomlarından açıkça farklıdır (Tablo 1). Hem organelin kökeni hem de anoksik

ortamlara uyum sağlamak için evrimsel stratejileri birbirlerinden farklı gibi gözükmemektedir. *Trichomonas*'ın hidrojenozomlarında bir genomdan yoksun oluşu, hidrojenozomal ADP/ATP taşıyıcılarının analizi, hidrojen hipotezi lehine veya aleyhine ipuçları sağlayabilir. Bununla birlikte, trikomonad hidrojenozomları, mitokondriyal tip ADP/ATP taşıyıcılarını barındırmaz (Tjaden ve ark., 2004). Bunun yerine, mitokondriyal taşıyıcı ailesinin farklı bir üyesi olan HMP31'i kullanır. Bu protein mitokondriyal tip ADP/ATP taşıyıcılarından filogenetik ve biyokimyasal olarak farklıdır (Dyall ve ark., 2000; Tjaden ve ark., 2004).

Hidrojenozomların, yalnızca yukarıda tartışılan trichomonadlarda, siliatlarda ve AF'larda değil, aynı



zamanda diğer geniş ölçüde ayrılmış ökaryot soylarında da tekrar tekrar evrimleşmiş olabileceğine dair bazı kanıtlar vardır. Hidrojenozomlar, amiplerde (*Monopylocystis*, *Sawyeria*) ve *Trimastix*, oksimonadlar ve trikomonadlar gibi çeşitli kamçılı ökaryotlarda tanımlanmıştır (Embley ve Martin 1998; Roger, 1999; Hackstein ve ark., 2001; Martin ve ark., 2001; Embley ve ark., 2003). Hayat Ağacı'na baktığımızda hidrojenozom taşıyan organizmaların düzensiz dağıldığını görürüz (Şekil 4). Hayat Ağacı, bir 18S rRNA filogenisine dayanmaktadır ve bu ağaç belirli evrimsel ilişkileri çözmek için pek uygun görünmemektedir (Embley ve ark., 2003). Belirli özelliklerin ortaya çıkartılmasında daha ayrıntılı ağaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle mitokondrinin monofiletiği, yalnızca tam mitokondriyal genomlar temelinde kurulabilir (Gray ve ark., 1999). Ancak *N. ovalis* dışında hidrojenozomlarda bir genomun tespit edilememiş olması filogenetik ilişkilerin ortaya çıkartılmasını zorlaştırmaktadır. Bununla birlikte konakçı filogenileri, hidrojenozomların tekrar tekrar mı evrimleştiği, aynı veya farklı endosimbiyotik atalardan mı evrimleştiği gibi soruları ele alırken yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, tüm hidrojenozomların mitokondriden veya hem mitokondri hem de hidrojenozomlarda ortak olan bir atadan evrimleştiğine dair açık bir kanıt henüz belirlenmemiştir (Gabaldon ve Huynen 2003; Dyall ve ark., 2004).

Hidrojenozomal genomların eksikliğinden dolayı, potansiyel bir mitokondriyal soy, yalnızca çekirdekte kodlanan "organel" genlerin filogenetik analizinden çıkarılabilir (van der Giezen ve ark., 1997b; Clemens ve Johnson 2000; Hackstein ve ark., 2001; Embley ve ark., 2003; Dyall ve ark., 2004). Bu tür proteinler ise sitoplazmada sentezlenir ve ardından hidrojenozoma aktarılır. Bu bilginin tam olarak aydınlatılması için, hidrojenozom içeren konakçıların tüm genom ve proteomları ortaya çıkartılmalıdır. Aksi takdirde sadece teoride kalacaktır. Dahası, bu proteinleri kodlayan genlerin filogenetik analizi hatalı bilgi verebilir. Çünkü mitokondriyal proteinlerin çoğu farklı atalara sahiptir (Yarlett ve Hackstein, 2005).

Sonuç olarak AF hidrojenozomlarının evrimsel geçmişi hakkında çözülmesi gereken pek çok soru güncelliğini korumaktadır. Elde edilen bilgi ve bulgular ışığında AF hidrojenozomlarının mitokondrilerle yakından ilişkili oldukları hatta mitokondrilerin anaerobik çevreye adaptasyonunun bir yansıması olduğu söylenebilir. Ancak hidrojenozomların mitokondriler gibi münferit bir genomdan yoksun oluşu bu sonuç için gerekli kanıtların başka kaynaklardan elde edilmesini gerekli kılmaktadır. Hidrojenozomları barındıran konakçıların tüm genom ve

proteom bilgilerinin ortaya çıkarılması konunun daha fazla aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

Omik'ten Gelen Veriler

AF'ların lignoselülolitik yetenekleri biyoteknolojik açıdan ilgi uyandırıcıdır. Ancak sıcaklığa duyarlılıkları, sitrik anaerobik oluşları, nispeten yavaş büyümeleri ve özel besiyeri gereksinimleri, bunlara olan ilgiyi azaltan zorluklardır (Wilken ve ark., 2021). Dahası, genomları yüksek oranda AT içerir ve tekrar zenginidir, bu da DNA nükleotit dizi analizini ve genetik mühendisliğinin işini zorlaştıran noktalardır (Youssef ve ark., 2013; Haitjema ve ark., 2014). Anaerobik funguslar için henüz iyi bir genetik mühendislik aracı geliştirilmemiştir. Buna ek olarak metabolizmalarını araştırmak, anlamak ve düzenlemek için kullanılacak klasik moleküler biyoloji teknikleri de yetersizdir. Ancak günümüzde yaygın olarak kullanılmaya başlayan –omik yaklaşımlar, fizyolojilerini incelemede kantitatif araçların yetersiz olduğu, büyük ölçüde karakterize edilememiş olan AF hidrojenozomunun fizyolojik ve metabolik özelliklerini anlamamıza yardımcı olabilir. Genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomiklerin saf/karışık kültürler ve çevresel örneklerdeki çalışmalara uygulanması bu süreçte paha biçilmez olacaktır.

Aerobik funguslara nazaran çalışılması daha zor olan AF'ların genomik analizler kullanılarak tüm nükleotit dizisi açığa çıkarılmıştır. AF'ların funguslar arasında hem en fazla sayıda hem de en yüksek çeşitlilikte lignoselülolitik enzimlere sahip olduğunu, bunların lignoselüolitik substratları, örneğin tarımsal atıkları fermente edilebilir şekere ayırma yeteneklerinin diğer enzimlere oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Edwards ve ark., 2017; Wilken ve ark., 2021).

Ortolog protein gruplarının kümelenmesi şeklinde yapılan transkriptomik analizlerle birlikte bazı hidrojenozomal metabolik yollarda yer alan proteinler tanımlanmıştır (Edwards ve ark., 2017). Yakın zamanda yapılan transkriptomik ve genomik analizler, bu mantarların, lignoselüolitik bitki biyokütlesini ayrıştırmada mükemmel şekilde tasarlanmış inanılmaz bir karbonhidrat-aktif enzim (CAZymes) çeşitliliği barındırdığını ortaya çıkarmıştır (Wilken ve ark., 2021).

Proteomikler, transkriptomikler ve metabolomikler arasındaki boşluğu doldurur ve proteinlerin büyük ölçekli analizine izin verir. Proteomikler, doğal veya çevrilmiş proteom analizi olarak sınıflandırılabilir (Chang ve Park, 2020). Protein tanımlaması, her proteinin elde edilen peptit kütlesi sonuçlarının bir veri tabanına göre araştırılmasıyla gerçekleştirilir; protein veri tabanı, bir proteinin tanımlanmasında başarı için anahtar faktördür.



NCBI veri tabanında halihazırda mevcut olan 452 protein dizileri içinde (rumen bakteriyel protein dizilerinin % 0.3'ünden daha azını oluşturur) şu anda sadece dört AF cinsi temsil edilmektedir (*Anaeromyces robustus*, *Neocallimastix californiae*, *Pecoromyces ruminatum* ve *Piromyces finnis*). 452 protein dizisinden 109 heksoz parçalayıcı enzim ve 46 pentoz parçalayıcı enzim varken, diğer dizilerin sadece 102'si glikoliz, hidrojenozom metabolizması ve pseudo-TCA döngüsü dahil hücre içi karbonhidrat metabolizması ile ilgilidir (Kwon ve ark., 2009). Özellikle, enerji ve hidrojen metabolizmasında rol oynayan mitokondri benzeri bir organel olan hidrojenozomların metabolik yolları hakkında net bir fikir birliği yoktur (Wilken ve ark., 2021). Mevcut hipotezler ise H₂ üretmek için piruvat format liyazı içeren, enerjik olarak elverişsiz bir yolun kullanıldığını veya piruvat ferredoksin oksidoredüktazı içeren hücre dışı metabolit ölçümleri tarafından desteklenmeyen bir yol kullanıldığını göstermektedir (Marvin-Sikkema ve ark., 1994; Boxma ve ark., 2004).

Potansiyellerine rağmen, karmaşık yaşam döngüleri, yeterince çalışılmamış metabolizmaları ve zorlu anaerobik kültür gereksinimleri nedeniyle bu organizmalar için mühendislik yöntemlerinin geliştirilmesi yavaş olmuştur. Ancak son yıllardaki omik temelli çalışmalar bu süreci hızlandıracak gibi görünmektedir. Bu açıdan Wilken ve ark., (2021) yaptıkları bir çalışmada AF *Neocallimastix lanati* genomunu ortaya çıkararak, lignoselülolitik enzim özelliklerini tanımlamanın ötesinde, bu genomu AF'ların ilk genom ölçekli metabolik modelini oluşturmak için kullanmışlardır. Bu çalışmada yapılan karşılaştırmalı genomik analizler *N. lanati*'nin metabolik olarak diğer nükleotit dizilemesi gerçekleştirilmiş *Neocallimastigomycota*'ya benzediğini ortaya çıkarmıştır. Ek olarak birçok CAZymes (~1,788 CAZymes) de dâhil, genomunun anlaşılmasından elde edilen ön görü, diğer AF türlerine genellenebilir olduğunu göstermiştir. Elde ettikleri model deneysel olarak doğrulanmıştır ve AF'ların çözülmemiş metabolik özelliklerine ışık tutmaktadır. Bu model, gelecekte yapılacak çalışmalarda analizlerin derinleştirmesine ve bu organizmaların biyoteknolojik kullanımını için suş mühendisliği çabalarına rehberlik edecek sistematik bir çerçeve sağlayacaktır (Wilken ve ark., 2021). Dahası elde edilen model, AF'ların hidrojenozom metabolizmasına ilişkin önceki hipotezleri doğrular ve genişletir niteliktedir. Hem model hem de deneysel veriler, piruvat format liyazın (PFL), hidrojenozomdaki piruvat ferredoksin oksidoredüktazdan (PFO) önemli ölçüde daha aktif olduğunu, ancak hidrojen oluşumunun yalnızca ikinci yolla gerçekleşebildiğini göstermiştir. İleriye dönük olarak, ilgili modelin AF

metabolizmasının belirsiz kalan ve metabolik mühendisliğinde kullanılabilmesinin yolunu açacak çalışmalara rehberlik etmesi için kullanılabilir. Aslında, model tabanlı analiz, AF'lar ile endüstriyel olarak kullanılan diğer organizmalar arasında yapılacak çalışmalarda paha biçilmez olabilir (Ranganathan ve ark., 2017; Gilmore ve ark., 2019). Bununla birlikte, endüstriyel uygulamalar için AF metabolizmasını anlamak ve düzenlemek için bu verileri sistematik bir şekilde birleştirecek bir model mevcut değildir. Genom ölçekli metabolik modeller (GEM'ler), çoklu omik veri setlerini entegre etmek için bilgi tabanı platformlar olarak hareket etmeye çok uygundur (Blazeck ve Alper, 2010; Wilken ve ark., 2021). Ayrıca hem prokaryotlardaki hem de ökaryotlardaki mühendislik yaklaşımlarında başarıyla kullanılabilme potansiyeli bu eksikliği giderebilmek için kullanılabilir (Blazeck ve Alper, 2010; Wilken ve ark., 2021). Dahası, bir GEM'in tahminlerini deneysel olarak test ederek, bir organizmanın metabolizmasının anlaşılmasını sistematik olarak geliştirmek mümkündür. İn-siliko analizlerin metabolizmayı inceleme yeteneği, doğrudan metabolik manipülasyonun zor olduğu AF'lar gibi model olmayan organizmalar açısından dikkat çekicidir (Wilken ve ark., 2021).

Hidrojenozom İçeren Organizmaların Tarım ve Biyoteknoloji Açısından Önemi

Çiftçilik faaliyetlerinin ekonomik yönden iyileştirilmesinde biyoteknolojik yöntemler son zamanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu yönden anaerobik fungusların (AF) çeşitli metabolik aktivitelerinin doğrudan kullanılabilir olduğu söylenebilir (Flad ve ark., 2020). AF'lar sığır, keçi ve koyun gibi önemli herbivor çiflik hayvanlarının lif bakımından zengin yemleri sindirebilmesinin ve verimsel üretiminin ayrılmaz bir parçasıdır (Gruninger ve ark., 2014). Bu nedenle biyoteknolojik yöntemler kullanılarak yemlerden yararlanılma oranlarının artırılabilmesi için hayvan sindirim sistemi değiştirilebilir veya geliştirilebilir (Gordon ve Phillips 1998; Flad ve ark., 2020). Benzer bir durum tarımsal atıklardan etanol üretimi ve metanojenlerle birlikte kullanılarak metan (biyogaz) oluşum süreçleri için de geçerlidir. Buna göre AF'ların tarım ve biyoteknolojik açıdan önemini üç başlık altında elde alabiliriz.

1. Herbivor Hayvan Sindirim Sistemi Üzerine Etkisi: AF'lardaki güçlü Karbonhidrat-Aktif enzimleri, herbivorlarda lignoselülozik biyokütlenin kullanımını artırma potansiyeline sahiptir (Flad ve ark., 2020). Bunun için iki farklı strateji önerilmiştir; bunlardan ilki hayvan yemlerinin AF'lar kullanılarak ön işlemden geçirilmesi şeklinde iken diğeri ise AF'ların tıpkı bir probiyotik takviye



gibi hayvan yemlerine dahil edilmesidir (Flad ve ark., 2020). AF'ların Bufalo ve Holstein-Friesian buzağlarında probiyotik olarak doğrudan yemlerde kullanılması, rumen fermantasyon özelliklerini (pH, uçucu yağ asitleri ve nitrojen içeriği), ruminal mikrobiyal popülasyonunu ve CAZyme aktivitelerini geliştirmiştir (Dey ve ark., 2004; Tripathi ve ark., 2007; Paul ve ark., 2011). Bunun sonucunda hayvanlarda büyüme hızı, besinlerin sindirilebilirliği ve nitrojen oranında artış görülmüştür (Flad ve ark., 2020). Emziren bufalolarda, anaerobik mantarların uygulanması da süt yağını % 6'ya kadar artırmıştır (Saxena ve ark., 2010). Benzer bir durum koyunlarda kullanılan *Orpinomyces* sp. kültürleri için de geçerlidir. *Orpinomyces* sp. tarafından üretilen hidrolazlar fermantasyon parametrelerine pozitif yönde etki etmiştir (Lee ve ark., 2000). Bu çalışmalar, AF'ların hayvansal üretim açısından önemli olan yemlerden yararlanma oranını artırmak için bir probiyotik olarak kullanılabilirliğini göstermektedir. Ancak ekonomik kazanımları ve istenilen etkiyi sürdürebilmek için AF'ların oral dozlarda hayvanlara tekrar tekrar uygulanmasını göz ardı etmemek gereklidir (Ribeiro ve ark., 2016; Flad ve ark., 2020).

2. Biyoetanol Üretiminde Kullanımı: Biyoetanol üretimi son yıllarda önemli ölçüde artmıştır (Balat ve Balat 2009). Biyoetanol üretiminde ticari olarak, lignoselülozu sindiremeyen ancak genetik olarak değiştirilmiş *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* ve *Escherichia coli* suşları kullanılmaktadır (Yang ve ark., 2007). Biyoetanol üretimindeki sınırlayıcı faktör, fermente olabilen şekerlerin dayanıklı lignoselülozik biyokütleden uzaklaştırılmasıdır (Dashtban ve ark., 2009; Flad ve ark., 2020). Bu süreç genellikle öğütme, alkali veya asit hidrolizi, iyonik sıvılar ile yapılan ön işlem veya buhar basıncı gibi maliyetli mekanik ve/veya kimyasal işlemler uygulanarak aşılmaya çalışılmaktadır (Sharma ve ark., 2019; Flad ve ark., 2020). AF'ların ön işlem görmemiş lignoselülozik biyokütleyi fiziksel ve enzimatik olarak parçalama yetenekleri, biyoetanol üretiminde bitki biyokütlesinin alternatif bir mikrobiyal dönüşümü için önemli bir aday haline getirmektedir (Flad ve ark., 2020). AF'ların bu süreçlerde kullanılmasının önündeki en büyük engel zorunlu anaerob olmalarıdır (Bauchop ve Mountfort, 1981). Biyoteknolojideki gelişmeler ile bu süreç aşılmaya çalışılmaktadır. Başlangıçta lignoselüloolitik enzimlerin üretiminin artırılması için fiziksel ve kimyasal mutasyonlardan yararlanılırken, günümüzde rekombinant DNA teknolojisi, CRISPR (düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri) ve protein mühendisliği kullanılarak oldukça güçlü etkin fibrolitik enzimleri üretmemizi sağlayan modern

yaklaşımlar bulunmaktadır (Akyol ve ark., 2009; Hooker ve ark., 2019). Bu açıdan AF'lardaki fibrolitik enzim genlerinin DNA ve amino asit dizilerine ait verilerinin hızlı bir şekilde ortaya çıkartılması, enzimleri kodlayan genlerin klonlanması ve heterolog olarak *E. coli* gibi bir konakta ifade edilmesi, etanol üretiminde artışa neden olacaktır (Warren, 1996; Akyol ve ark., 2009). Seçilmiş ve değiştirilmiş suşların kullanılmasıyla biyoetanol üretiminde maliyeti düşürmesinin yanında üretime katkı sağlama potansiyeline sahip olduğu açıktır (Ranganathan ve ark., 2017; Flad ve ark., 2020). Lignoselülozik biyokütleden biyoetanol üretimindeki bir başka sınırlama, birçok etanol üreten mayanın, hemiselülozda bol miktarda bulunan ksiloz ve arabinoz gibi 5-karbonlu şekerleri fermente edememesidir (Flad ve ark., 2020). Mayalar tarafından pentoz şekerlerini fermente etme yeteneğinin kazanılması, ikinci nesil enerji üretim şekillerinden olan biyoetanol üretimi için önemli bir önceliktir (Yang ve ark., 2007). AF'ların hemiselülozu parçaladığı ve hem pentoz hem de heksoz şekerleri fermente ettiği uzun zamandır bilinmektedir (Theodorou ve ark., 1996). Yapılan bir çalışmada *Piromyces* sp. E2'deki ksiloz izomeraz genin *Saccharomyces cerevisiae*'de başarıyla ifade edilebilir olduğunu göstermiştir (Yang ve ark., 2007). Bunun sonucu olarak gerek *E. coli* gerekse *Saccharomyces cerevisiae* gibi biyoetanol üretiminde kullanılan mikroorganizmaların manipülasyonunda AF genlerin kullanılabilir olduğu söylenebilir.

3. Biyogaz Oluşumu Üzerine Etkisi:

Günümüzde, bitkisel biyokütlenin anaerobik olarak sindirilmesiyle birlikte ortaya çıkan biyogaz ve sindirim ürünleri, yenilenebilir enerjinin yanında gübre ve toprak besleyici olarak kullanılmaktadır (Strzalka ve ark., 2017; Flad ve ark., 2020). Ancak ticari açıdan önemli olan bu süreçlerde AF'lar göz ardı edilmektedir (Flad ve ark., 2020). Anaerobik sindirim sistemlerinde bakteriler ve metanojenik arkelerden oluşan karma bir mikrobiyal karışım, lignoselülozik atıklar, hayvan gübresi ve gıda işleme atıkları gibi substratları biyogaza dönüştürür (Schnürer, 2018; Flad ve ark., 2020). Biyogaz, metan (% 50-75) ve karbondioksit (% 25-50) ile eser miktardaki hidrojen, hidrojen sülfid ve amonyak gibi gazların bir karışımıdır (Flad ve ark., 2020). Biyogaz, elektrik üretiminden evsel, ticari ve endüstriyel ısıtmada yakıt olarak kullanılmak üzere çeşitli şekillerde biyo-metana dönüştürülebilir (Schnürer, 2016).

Biyogaz tesislerinde üretilen gazın yeterli miktarda ve kalitede olabilmesi için uygulanan koşulların mümkün olduğu kadar rumene benzemesi gerekmektedir (Flad ve ark., 2020). Çünkü yüksek bir metan verimliliği için bu şarttır. Rumen sabit bir sıcaklıkta (~39 °C), düşük redoks



potansiyeli (-0.4 V), neredeyse nötr pH değeri, oksijensiz ve sürekli bir yem akışının olduğu dinamik bir ortamdır (Weimer ve ark. 2009; Flad ve ark., 2020). Ancak rumen ortamını biyogaz reaktörleri ile kıyasladığımızda hammaddelerin veya yemlerin yeterli bir şekilde parçalanması için daha kısa bir süre gereklidir (Stern ve ark., 1983; Mohamed ve Chaudhry, 2008). Bir diğer fark ise AF'lar genellikle biyogaz üreten mikrobiyal popülasyonda bulunmazlar (Flad ve ark., 2020). Bunun en önemli nedenlerinden birisi AF'ların fermentasyon sonucu biyo-metan üretmemeleridir. Ancak AF'lar metanojenik arkeler tarafından kullanılabilen biyokimyasal substratlar üretirler (Cheng ve ark., 2009). Bu nedenle, biyogaz reaktörlerine AF'ların eklenmesi lignoselülozun biyogaza dönüşümünü artırmaya ve hızlandırmaya yardımcı olabilir (Nagler ve ark., 2019; Flad ve ark., 2020). Bugüne kadar yapılan çoğu araştırma, laboratuvar ölçekli biyoreaktörlere AF'ların eklenmesi ile yapılmıştır. Ferraro ve ark., (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, *Neocallimastix* sp. ve *Orpinomyces* sp. karışık fungus kültürü ile yine karşılık rumen bakteri kültürünün kullandıkları biyoreaktörde buğday samanından yüksek oranda metan üretilebilir olduğunu göstermişlerdir.

Tabi bu özelliklerin yanında bazı dezavantajları da söz konusudur. Örneğin ısı, oksijen ve pH gibi ortam değişikliklerinden çabuk etkilendikleri gibi hızla büyüyen prokaryotik rakiplere göre daha kısa hayatta kalma süreleri önemli sorunları ortaya çıkarmaktadır. Çeşitli çalışmalarda AF'ların reaktörlerdeki hayatta kalma süreleri moleküler yollarla izlenmiştir (Procházka ve ark., 2012; Dollhofer ve ark., 2018). AF'ların reaktör çamurunda zamanla azaldığı ve 7-10 gün sonra tesbit edilemediği bulunmuştur (Procházka ve ark., 2012; Dollhofer ve ark., 2018; Flad ve ark., 2020). Bir diğer çalışmada %30 sığır gübresi ile çalışan tam ölçekli tarımsal biyogaz tesislerinde AF'ların varlığı transkripsiyonel aktivite yoluyla belirlenmeye çalışılmıştır (Dollhofer ve ark., 2017; Young ve ark., 2018). Bu ticari biyogaz tesislerinde, *Anaeromyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces*, *Caecomyces*, *Cyllamyces* ve *Piromyces* cinslerine ait AF DNA'sının yanında henüz tanımlanmamış dört adet AF sınıfı birlikte tespit edilmiştir. Ayrıca, mRNA seviyesinde AF GH5 endoglukanazlarının sınırlı transkripsiyonu da belirlenmiştir. Bu sonuçlar, potansiyel olarak aktif AF'ların reaktöre dışkı yoluyla geçtiğinin, ancak biyogaz tesislerindeki koşullar göz önüne alındığında fungusların muhtemelen hayatta kalamadığını göstermektedir (Flad ve ark., 2020).

AF'ların biyogaz üretiminde kullanılması için alternatif yolların bulunması gereklidir. Alternatif bir yol olarak

görülen AF'lar ve metanojenlerin ortak kültürlerinin kullanıldığı çalışmalarda, fungal rizoidlerinin ve sporangianın yüzeyine yapışmış halde metanojenlerin olduğu görülmüştür (Bauchop ve Mountfort 1981; Leis ve ark., 2014). Bu AF hidrojenozomlarından metanojenlere türler arası hidrojen vb. ürünlerin transferini ve fungal canlılığının korunmasında metanojenlerin destek sağladığını göstermektedir. Şimdiye kadar *Piromyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces*, *Caecomyces* ve *Anaeromyces* cins örnekleri ile birlikte *Methanobrevibacter* ve *Methanobacterium*'un ortak kültürlerde yaşayabildiği bildirilmiştir (Jin ve ark., 2011; Swift ve ark., 2019). Ortak kültürler, fungal monokültürü ile karşılaştırıldığında daha fazla hidrojen, format, asetat, metan üretir ve genellikle enzim aktivitesini artırır (Bauchop ve Mountfort 1981; Jin ve ark., 2011; Li ve ark., 2016). Bu nedenle, birlikte kültürlen metanojenler, AF'ların metabolizmasını ve lignoselüloz parçalayıcı aktivitesini değiştirebilir. Ortak kültürlerin parçalama ve metan üretme yeteneği stabildir (Bauchop ve Mountfort 1981; Li ve ark., 2016). Anaerobik mantarların ve metanojenlerin kararlı ortak kültürleri ve daha hızlı biyogaz üretim oranları ticari biyogaz üretimi için önemli bir avantajdır (Flad ve ark., 2020). Bununla birlikte, anaerobik mantarların doğal biyogaz süreçlerindeki rolleri ve hayatta kalmasına ilişkin bilgilerimiz henüz tam olarak yeterli düzeye ulaşamamıştır. Bu nedenle, bu araştırma alanı büyük olasılıkla gelecekte daha fazla ilgi görecektir.

Gelecekte Beklentiler

Hidrojenozomların evrimi ve anaerobik metabolizmalarının kökenleri hala tartışılan konulardır (Martin ve Müller, 1998; Martin ve ark., 2015; Stairs ve ark., 2015; Spang ve ark., 2019). Bunun en önemli nedenlerinden birisi hidrojenozomal bir genomun belirlenememiş olmasıdır (van der Giezen ve ark., 1997b, Clemens ve Johnson 2000, Hackstein ve ark., 2001). Potansiyel bir mitokondriyal ata yalnızca çekirdekteki genomun filogenetik analizinden çıkarılabilir (Embley ve ark., 2003, Dyal ve ark., 2004). Çekirdekte kodlanan organel genlerin ifade edilmesiyle proteinler stoplazmada sentezlenir ve ardından hidrojenozoma aktarılır (Lewis ve ark., 2020). Tabi bu görüş tüm hidrojenozomların proteomları ve konakçılarının tüm genomları çözülene kadar eksik olarak kalacaktır. Dahası, bu proteinleri kodlayan genlerin filogenetik analizleri hatalı bilgiler sağlayabilir, bunun en önemli nedeni mitokondriyal proteinlerin bir çoğunun farklı kökenlere sahip olması gösterilebilir (Lewis ve ark., 2020). Ayrıca hidrojenozomal fonksiyon için çok önemli olan proteinler (hidrojenazlar, piruvat: ferredoksin oksidoredüktazlar veya piruvat format



liyazlar), aerobik bir ökaryotik hücrenin veya organellerinin proteinlerine benzemezler (Lewis ve ark., 2020). Bu açıdan önümüzdeki yıllarda bu konuların aydınlatılması gereklidir.

Hidrojenozomlar, tipik olarak ökaryotlardan ziyade bakterilerle ilişkilendirilen bir metabolizma türü olan Fe-Fe-hidrojenaz enzimini kullanarak H₂ üretirler (Müller, 1993; Embley ve ark., 1997; Horner ve ark., 2000; Müller ve ark., 2012; Stairs ve ark., 2015). AF tarafından üretilen fazla H₂'ye karşılık, metanojenler AF büyümesi ve aktivitesi üzerinde yararlı bir etkiye sahiptir. Tek başına AF kültürlerinden ziyade metanojenler ile yapılan ortak kültürlerin selüloolitik enzim aktivitesi ve kuru maddenin sindirilmesi açısından daha etkili olduğu kanıtlanmıştır (Bauchop and Mountfort, 1981; Jin ve ark., 2011). AF ve metanojen ortak kültürlerinin, bitki materyalini içeren lignoselülozu hızla metana dönüştürme yeteneği, biyoteknolojik uygulamalar için de iyi bir potansiyele sahiptir (Cheng ve ark., 2009; Jin ve ark., 2011; Peng ve ark., 2016). Geviş getiren hayvanlarda metan üretimi, fermantasyonun olumsuz bir sonucu olarak görülmektedir. Geviş getiren hayvanlarda, H₂'nin büyük miktarlarda metan formuna dönüşmesi, önemli bir antropojenik metan kaynağı olmanın yanı sıra hayvan için de bir enerji kaybına neden olur. AF'lar ve arkeler arasındaki etkileşimin tam olarak aydınlatılması veya değiştirilebilir olması birçok teknoloji için kullanılabilir. Örneğin, çiftlik hayvanlarında metanojenez, küresel metan üretimine ve dolayısıyla sera gazı emisyonlarına önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir (Li ve ark., 2006). AF'ların genom mühendisliği araçları kullanılarak yeniden yapılandırılabilir. Bunun sonucunda hayvanlarda metan üretimi engellenebilir veya biyogaz üretimini artırmak için AF metabolomu kullanılabilir. Şöyle ki biyogaz üretimi substrat kompozisyonu ve AF suşuna bağlı olarak %4–22 oranında arttığı belirlenmiştir (Callaghan ve ark., 2015, Henske ve ark., 2018). Bu süreç hayvancılık faaliyetlerinde uygulanabilir olmasıyla birlikte ekonomik etkiyi artırırken sera gazı emisyonlarını azaltabilir (Callaghan ve ark., 2015, Henske ve ark., 2018). Biyogaz üretimi hammadde bileşiminden önemli ölçüde etkilenebileceğinden, bileşim değişikliklerine dayanıklı mikrobiyal konsorsiyum geliştirmek, üretim istikrarını ve

verimliliğini korumak için kritik öneme sahip olacaktır (Gold ve ark., 1988). Alternatif olarak, metabolik mühendisliği, AF'lar tarafından biyolojik hidrojen üretimini arttırmak için kullanılabilir. Bununla birlikte, biyolojik hidrojen üretimi veya biyogaz platformları için anaerobik mantarların geliştirilmesi, genom, metabolik ve organel mühendisliğinde önemli ilerlemeler gerektirecektir (Chang ve Park, 2020).

Sonuç

Şimdiye kadar hidrojenozomlar hakkında elde edilen bilgilerin büyük çoğunluğu protozoa ile ilgili yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Rumen funguslarında *Neocallimastix* ve *Piromyces* dışındakilerde herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Diğer 18 cins'te (*Orpinomyces*, *Anaeromyces*, *Caecomyces*, *Cyllamyces*, *Buwchfawromyces*, *Oontomyces*, *Liebetanzomyces*, *Pecoromyces*, *Feromyces*, *Ghazallomyces*, *Aklioshbomyces*, *Agriosomyces*, *Capellomyces*, *Joblinomyces*, *Khoyollomyces*, *Tahromyces*, ve *Aestipascuomyces*, *Paucimyces*) (Fliegerova ve ark., 2021; Hanafy ve ark., 2021) yapılacak çalışmalar ile birlikte hidrojenozomlardaki kayıp halkalarının tamamlanması öngörülmektedir. Bununla birlikte rumen funguslarının PFO yerine neden PFL'yi tercih ettiği, ayrıca PFL'nin hem sitoplazmada hem de hidrojenozomda aktivite göstermesinin nedenleri hala belirsizliğini korumaktadır. Hidrojenozomların hücre bölünmesinden hemen önce ikiye bölünme şeklinde çoğaldıkları düşünülmektedir. Bölünmeleri hakkındaki bilgiler çok azdır ve hala çözülmeyi bekleyen önemli sorulardan birisidir. *T. vaginalis* hidrojenozomları üzerinde yapılan proteom çalışmaları 200 farklı proteinin belirlenmesini sağlarken, benzer proteinlerin sayısının mayalara ait mitokondrilerde 700 olduğu gösterilmiştir (Henze, 2007). Burdan yola çıkılarak, *Neocallimastigomycota* içerisindeki rumen funguslarının metabolik yeteneklerini, hücresel süreçlerini, evrimsel geçmişlerini ve adaptasyonlarını anlamamız için -omics (genomik, transkriptomik ve proteomik) yöntemlerinin değerli bilgiler vereceği söylenebilir.

Kaynaklar

- Akhmanova, A., Voncken, F., van Aalen, T., van Hoek, A., Boxma, B., Vogels, G. ... and Hackstein, J. H. (1998). A hydrogenosome with a genome. *Nature*, 396(6711), 527-528.
- Akhmanova, A., Voncken, F. G., Hosea, K. M., Harhangi, H., Keltjens, J. T., Op Den Camp, H. J. ... and Hackstein, J. H. (1999). A hydrogenosome with pyruvate formate-lyase: Anaerobic chytrid fungi use an alternative route for pyruvate catabolism. *Mol. Microbiol.*, 32(5), 1103-1114.
- Akyol, I., Comlekcioglu, U., Kar, B., Ekinci, M. and Ozkose, E. (2009). Cloning of a xylanase gene xyn2A from rumen fungus *Neocallimastix* sp. GMLF2 in *Escherichia coli* and its partial characterization. *Biologia*, 64(4), 664-670.



- Balat, M. and Balat, H. (2009). Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied energy*, 86(11), 2273-2282.
- Bauchop, T. and Mountfort, D. O. (1981). Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens. *Appl Environ Microbiol*, 42(6), 1103-1110.
- Benchimol, M., Leal, D., Mattos, A. and Diniz, J.A.P. (1997). Fine structure of *Trichomonas gallinae*. *Biocell*, 21, 47-58.
- Benchimol, M., Almeida, J.C.A. and de Souza, W. (1996). Further studies on the organization of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*. *Tissue Cell*, 28, 287-299.
- Benchimol, M. and De Souza, W. (1983). Fine Structure and Cytochemistry of the Hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus* 1. *J. Protozool*, 30(2), 422-425.
- Benchimol, M. (2000). Ultrastructural characterization of the isolated hydrogenosome in *Tritrichomonas foetus*. *Tissue Cell*, 32, 1-9.
- Benchimol M. (2007). *Structure of the Hydrogenosomes* (in this volume). Springer, Heidelberg.
- Blazeck, J. and Alper, H. (2010). Systems metabolic engineering: Genome-scale models and beyond. *Biotechnology journal*, 5(7), 647-659.
- Boxma, B., Voncken, F., Jannink, S., Van Alen, T., Akhmanova, A., Van Weelden, S. W. ... and Hackstein, J. H. (2004). The anaerobic chytridiomycete fungus *Piromyces* sp. E2 produces ethanol via pyruvate: formate lyase and an alcohol dehydrogenase E. *Mol. Microbiol.*, 51(5), 1389-1399.
- Boxma, B., de Graaf, R. M., van der Staay, G. W., van Alen, T. A., Ricard, G., Gabaldón, T. ... and Hackstein, J. H. (2005). An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature*, 434(7029), 74-79.
- Broers, C. A., Stumm, C. K., Vogels, G. D. and Brugerolle, G. (1990). *Psalteriomonas lanterna* gen. nov., sp. nov., a free-living amoeboflagellate isolated from freshwater anaerobic sediments. *Eur J Protistol*, 25(4), 369-380.
- Bui, E. T., Bradley, P. J. and Johnson, P. J. (1996). A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc Natl Acad Sci*, 93(18), 9651-9656.
- Burki, F. (2016). Mitochondrial evolution: going, going, gone. *Current Biology*, 26(10), 410-412.
- Callaghan, T. M., Podmirseg, S. M., Hohlweck, D., Edwards, J. E., Puniya, A. K., Dagar, S. S. and Griffith, G. W. (2015). *Buwchfawromyces eastonii* gen. nov., sp. nov.: a new anaerobic fungus (*Neocallimastigomycota*) isolated from buffalo faeces. *MycKeys*, 9, 11-28.
- Cavalier-Smith, T. (1983). A 6-kingdom classification and a unified phylogeny. *Intracellular space as oligogenetic ecosystem*, 1027-1034.
- Chang, J. and Park, H. (2020). Nucleotide and protein researches on anaerobic fungi during four decades. *J Anim Sci Technol*, 62(2), 121.
- Cheng, Y. F., Edwards, J. E., Allison, G. G., Zhu, W. Y. and Theodorou, M. K. (2009). Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in consecutive batch culture. *Bioresour Technol*, 100(20), 4821-4828.
- Clemens, D. L. and Johnson, P. J. (2000). Failure to detect DNA in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* by nick translation and immunomicroscopy. *Mol Biochem Parasitol*, 106(2), 307-313.
- Dacks, J. B., Dyal, P. L., Embley, T. M. and van der Giezen, M. (2006). Hydrogenosomal succinyl-CoA synthetase from the rumen-dwelling fungus *Neocallimastix patriciarum*; an energy-producing enzyme of mitochondrial origin. *Gene*, 373, 75-82.
- Dashtban, M., Schraft, H. and Qin, W. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *Int J Biol Sci*, 5(6), 578.
- De Graaf, R. M., Ricard, G., Van Alen, T. A., Duarte, I., Dutilh, B. E., Burgdorf, C. ... and Hackstein, J. H. (2011). The organellar genome and metabolic potential of the hydrogen-producing mitochondrion of *Nyctotherus ovalis*. *Mol Biol Evol*, 28(8), 2379-2391.
- Dey, A., Sehgal, J. P., Puniya, A. K. and Singh, K. (2004). Influence of an anaerobic fungal culture (*Orpinomyces* sp.) administration on growth rate, ruminal fermentation and nutrient digestion in calves. *Asian Australas J Anim Sci*, 17(6), 820-824.
- Dollhofer, V., Callaghan, T. M., Griffith, G. W., Lebuhn, M. and Bauer, J. (2017). Presence and transcriptional activity of anaerobic fungi in agricultural biogas plants. *Bioresour Technol*, 235, 131-139.
- Dollhofer V., Dandikas V., Dorn-In S., Bauer C., Lebuhn M. and Bauer J. (2018). Accelerated biogas production from lignocellulosic biomass after pre-treatment with *Neocallimastix frontalis*. *Bioresour Technol*, 264, 219-227.
- Durand, R., Fischer, M., Rasclé, C. and Fevre, M. (1995). *Neocallimastix frontalis* enolase gene, enol: first report of an intron in an anaerobic fungus. *Microbiology*, 141(6), 1301-1308.
- Dyall, S. D., Koehler, C. M., Delgado-Correa, M. G., Bradley, P. J., Plümper, E., Leuenberger, D. ... and Johnson, P. J. (2000). Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. *Mol Cell Biol*, 20(7), 2488-2497.



- Dyall, S. D., Yan, W., Delgadillo-Correa, M. G., Lunceford, A., Loo, J. A., Clarke, C. F. and Johnson, P. J. (2004). Non-mitochondrial complex I proteins in a hydrogenosomal oxidoreductase complex. *Nature*, 431(7012), 1103-1107.
- Edwards, J. E., Forster, R. J., Callaghan, T. M., Dollhofer, V., Dagar, S. S., Cheng, Y. ... and Smidt, H. (2017). PCR and omics based techniques to study the diversity, ecology and biology of anaerobic fungi: insights, challenges and opportunities. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1657.
- Embley, T. M., Finlay, B. J., Dyal, P. L., Hirt, R. P., Wilkinson, M. and Williams, A. (1995). Multiple origins of anaerobic ciliates with hydrogenosomes within the radiation of aerobic ciliates. *Proc Roy Soc B*, 262(1363), 87-93.
- Embley, T. M., Horner, D. A. and Hirt, R. P. (1997). Anaerobic eukaryote evolution: hydrogenosomes as biochemically modified mitochondria?. *Trends Ecol Evol*, 12(11), 437-441.
- Embley, T. M. and Hirt, R. P. (1998). Early branching eukaryotes?. *Curr Op Genet Dev*, 8(6), 624-629.
- Embley, M., der Giezen, M. V., Horner, D. S., Dyal, P. L. and Foster, P. (2003). Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358(1429), 191-203.
- Embley, T. M. and Martin, W. (2006). Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature*, 440(7084), 623-630.
- Fenchel, T. and Finlay, B. J. (1995). Ecology and evolution in anoxic worlds. *Oxford; New York: Oxford University Press*.
- Ferraro, A., Dottorini, G., Massini, G., Miritana, V. M., Signorini, A., Lembo, G. and Fabbri, M. (2018). Combined bioaugmentation with anaerobic ruminal fungi and fermentative bacteria to enhance biogas production from wheat straw and mushroom spent straw. *Bioresour Technol*, 260, 364-373.
- Field, J., Rosenthal, B. and Samuelson, J. (2000). Early lateral transfer of genes encoding malic enzyme, acetyl-CoA synthetase and alcohol dehydrogenases from anaerobic prokaryotes to *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol*, 38(3), 446-455.
- Finlay, B.J. and Fenchel, T. (1989). Hydrogenosomes in some anaerobic protozoa resemble mitochondria. *FEMS Microbiol Lett*, 65, 311-314.
- Flad, V., Young, D., Seppälä, S., Hooker, C., Youssef, N., Podmirseg, S. M. ... and Theodorou, M. K. (2020). 17 The Biotechnological Potential of Anaerobic Gut Fungi. *In Genetics and Biotechnology*, 413-437.
- Fliegerova, K. O., Podmirseg, S. M., Vinzelj, J., Grilli, D. J., Kvasnová, S., Schierová, D. ... and Moniello, G. (2021). The Effect of a High-Grain Diet on the Rumen Microbiome of Goats with a Special Focus on Anaerobic Fungi. *Microorganisms*, 9(1), 157.
- Gabalón, T. and Huynen, M. A. (2003). Reconstruction of the proto-mitochondrial metabolism. *Science*, 301(5633), 609-609.
- Gelius-Dietrich, G. and Henze, K. (2004). Pyruvate Formate Lyase (PFL) and PFL Activating Enzyme in the Chytrid Fungus *Neocallimastix frontalis*: A Free-Radical Enzyme System Conserved Across Divergent Eukaryotic Lineages 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51(4), 456-463.
- Gelius-Dietrich, G., Ter Braak, M. and Henze, K. (2007). Mitochondrial steps of arginine biosynthesis are conserved in the hydrogenosomes of the Chytridiomycete *Neocallimastix frontalis*. *J Eukaryot Microbiol*, 54, 42-4.
- Germot, A., Philippe, H. and Le Guyader, H. (1996). Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci*, 93(25), 14614-14617.
- Gilmore, S. P., Lankiewicz, T. S., Wilken, S. E., Brown, J. L., Sexton, J. A., Henske, J. K. ... and O'Malley, M. A. (2019). Top-down enrichment guides in formation of synthetic microbial consortia for biomass degradation. *ACS Synth Biol*, 8(9), 2174-2185.
- Gleason, F.H. and Gordon, G.L.R. (2004). The ultrastructure of hydrogenosomes in thin sections and in freeze fracture replicas from the anaerobic chytrid fungus *Caecomyces* sp. *Australasian Mycologist*, 22 (3), 92-98.
- Gold, J. J., Heath, I. B. and Bauchop, T. (1988). Ultrastructural description of a new chytrid genus of caecum anaerobe, *Caecomyces equi* gen. nov., sp. nov., assigned to the *Neocallimasticaceae*. *Biosystems*, 21(3-4), 403-415.
- Gordon, G. L. and Phillips, M. W. (1998). The role of anaerobic gut fungi in ruminants. *Nutr Res Rev*, 11(1), 133-168.
- Göçmen, B. (2003). Anaerobik Protozoonlarda (Protista) Solunum ve Detoksifikasyon Organeli: Hidrogenozom. *Turkish Journal of Parasitology*, 27, 71-74.
- Gray, M. W., Burger, G. and Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science*, 283(5407), 1476-1481.
- Gruninger, R. J., Puniya, A. K., Callaghan, T. M., Edwards, J. E., Youssef, N., Dagar, S. S. ... and Elshahed, M. S. (2014). Anaerobic fungi (phylum *Neocallimastigomycota*): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. *FEMS Microbiol Ecol*, 90(1), 1-17.
- Hackstein, J. H., Akhmanova, A., Boxma, B., Harhangi, H. R. and Voncken, F. G. (1999). Hydrogenosomes: eukaryotic adaptations to anaerobic environments. *Trends in microbiology*, 7(11), 441-447.
- Hackstein, J. H., Akhmanova, A., Voncken, F., van Hoek, A., van Alen, T., Boxma, B. ... and Veenhuis, M. (2001). Hydrogenosomes: convergent adaptations of mitochondria to anaerobic environments. *Zoology*, 104(3-4), 290-302.



- Hackstein J.H. (2005). Eukaryotic Fe-hydrogenases—old eukaryotic heritage or adaptive acquisitions? *Biochemical Society Transactions*, 33, 47–50.
- Haitjema, C. H., Solomon, K. V., Henske, J. K., Theodorou, M. K. and O'Malley, M. A. (2014). Anaerobic gut fungi: advances in isolation, culture, and cellulolytic enzyme discovery for biofuel production. *Biotechnol Bioeng*, 111(8), 1471-1482.
- Hanafy, R. A., Youssef, N. H. and Elshahed, M. (2021). *Paucimyces polynucleatus* gen. nov., sp. nov., a novel polycentric genus of anaerobic gut fungi from the feces of a wild blackbuck antelope. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.03.04.433954>
- Hashimoto, T., Sánchez, L. B., Shirakura, T., Müller, M. and Hasegawa, M. (1998). Secondary absence of mitochondria in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* revealed by valyl-tRNA synthetase phylogeny. *Proc Natl Acad Sci*, 95(12), 6860-6865.
- Heath, I. B., Bauchop, T. and Skipp, R. A. (1983). Assignment of the rumen anaerobe *Neocallimastix frontalis* to the *Spizellomyces* (*Chytridiomycetes*) on the basis of its polyflagellate zoospore ultrastructure. *Can J Bot*, 61(1), 295-307.
- Henske, J. K., Gilmore, S. P., Haitjema, C. H., Solomon, K. V. and O'Malley, M. A. (2018). Biomass-degrading enzymes are catabolite repressed in anaerobic gut fungi. *AIChE Journal*, 64(12), 4263-4270.
- Henze, K. (2007). The proteome of *T. vaginalis* hydrogenosomes. In *Hydrogenosomes and mitosomes: mitochondria of anaerobic eukaryotes* (pp. 163-178). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Hooker, C. A., Lee, K. Z. and Solomon, K. V. (2019). Leveraging anaerobic fungi for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 59, 103-110.
- Horner, D. S., Hirt, R. P. and Embley, T. M. (1999). A single eubacterial origin of eukaryotic pyruvate: ferredoxin oxidoreductase genes: implications for the evolution of anaerobic eukaryotes. *Mol Biol Evol*, 16(9), 1280-1291.
- Horner, D. S., Foster, P. G. and Embley, T. M. (2000). Iron hydrogenases and the evolution of anaerobic eukaryotes. *Mol Biol Evol*, 17(11), 1695-1709.
- Jin, W., Cheng, Y. F., Mao, S. Y. and Zhu, W. Y. (2011). Isolation of natural cultures of anaerobic fungi and indigenously associated methanogens from herbivores and their bioconversion of lignocellulosic materials to methane. *Bioresour Technol*, 102(17), 7925-7931.
- Julliard, V., Riondet, C., de Vaux, A., Alcaraz, G. and Fonty, G. (1998). Comparison of metabolic activities between *Piromyces citronii*, an equine fungal species, and *Piromyces communis*, a ruminal species. *Anim Feed Sci Technol*, 70(1-2), 161-168.
- Koonin, E. V. (2015). Origin of eukaryotes from within archaea, archaeal eukaryome and bursts of gene gain: eukaryogenesis just made easier?. *Philos Trans R Soc B: Biological Sciences*, 370(1678), 20140333.
- Kwon, M., Song, J., Ha, J. K., Park, H. S. and Chang, J. (2009). Analysis of functional genes in carbohydrate metabolic pathway of anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis* PMA02. *Asian-Aust J Anim Sci*, 22(11), 1555-1565.
- Lee, S. S., Ha, J. K. and Cheng, K. J. (2000). Influence of an anaerobic fungal culture administration on in vivo ruminal fermentation and nutrient digestion. *Anim Feed Sci Technol*, 88(3-4), 201-217.
- Leis, S., Dresch, P., Peintner, U., Fliegerová, K., Sandbichler, A. M., Insam, H. and Podmirseg, S. M. (2014). Finding a robust strain for biomethanation: anaerobic fungi (*Neocallimastigomycota*) from the *Alpine ibex* (*Capra ibex*) and their associated methanogens. *Anaerobe*, 29, 34-43.
- Lewis, W. H., Lind, A. E., Sendra, K. M., Onsbring, H., Williams, T. A., Esteban, G. F. ... and Embley, T. M. (2020). Convergent evolution of hydrogenosomes from mitochondria by gene transfer and loss. *Mol Biol Evol*, 37(2), 524-539.
- Li, J., Heath, I. B. and Bauchop, T. (1990). *Piromyces mae* and *Piromyces dumbonica*, two new species of uniflagellate anaerobic chytridiomycete fungi from the hindgut of the horse and elephant. *Can J Bot*, 68(5), 1021-1033.
- Li, J., Heath, I. B. and Cheng, K. J. (1991). The development and zoospore ultrastructure of a polycentric chytridiomycete gut fungus, *Orpinomyces joyonii* comb. nov. *Can J Bot*, 69(3), 580-589.
- Li, Q., Li, L., Rejtar, T., Lessner, D. J., Karger, B. L. and Ferry, J. G. (2006). Electron transport in the pathway of acetate conversion to methane in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *Journal of Bacteriology*, 188(2), 702-710.
- Li, Y., Jin, W., Cheng, Y. and Zhu, W. (2016). Effect of the associated methanogen *Methanobrevibacter thaueri* on the dynamic profile of end and intermediate metabolites of anaerobic fungus *Piromyces* sp. F1. *Curr Microbiol*, 73(3), 434-441.
- Lindmark, D. G. and Müller, M. (1973). Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J Biol Chem*, 248(22), 7724-7728.
- Martin, W. (2005). The missing link between hydrogenosomes and mitochondria. *Trends in microbiology*, 13(10), 457-459.



- Martin, W. and Russell, M.J. (2003). On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358, 59-83.
- Martin, W. and Müller, M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*, 392(6671), 37-41.
- Martin W., Hoffmeister M., Rotte C. and Henze K. (2001). An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle. *Biological Chemistry*, 382, 1521–1539.
- Martin, W. F., Garg, S. and Zimorski, V. (2015). Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos Trans R Soc B*, 370(1678), 20140330.
- Marvin-Sikkema, F.D., Richardson, A.J., Stewart, C.S., Gottschal, J.C. and Prins, R.A. (1990). Influence of hydrogenconsuming bacteria on cellulose degradation by anaerobic fungi. *Appl Environ Microbiol*, 56, 3793-3797.
- Marvin-Sikkema, F.D., Lahpor, G.A., Kraak, M.N., Gottschal, J.C. and Prins, R.A. (1992). Characterization of an anaerobic fungus from llama faeces. *J General Microbiol*, 138, 2235-2241.
- Marvin-Sikkema, F.D., Pedro Gomes, T.M., Grivet, J.P., Gottschal, J.C. and Prins, R.A. (1993). Characterization of hydrogenosomes and their role in glucose metabolism of *Neocallimastix* sp. L2. *Arch Microbiol*, 160, 388-396.
- Marvin-Sikkema F.D., Driessen A.J.M., Gottschal J.C. and Prins R.A. (1994). Metabolic energy generation in hydrogenosomes of the anaerobic fungus *Neocallimastix*: evidence for a functional relationship with mitochondria. *Mycol Res*, 98, 205–212.
- Mohamed, R. and Chaudhry, A. S. (2008). Methods to study degradation of ruminant feeds. *Nutrition Research Reviews*, 21(1), 68-81.
- Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J. J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S. B. ... and Martin, W. F. (2012). Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76(2), 444-495.
- Müller, M. (1973). Biochemical cytology of trichomonad flagellates: I. Subcellular localization of hydrolases, dehydrogenases, and catalase in *Tritrichomonas foetus*. *The Journal of cell biology*, 57(2), 453-474.
- Müller, M. (1993). The hydrogenosome. *J Gen Microbiol*, 139(12), 2879-2889.
- Müller, M. (1998). Enzymes and compartmentation of core energy metabolism of anaerobic protists—a special case in eukaryotic evolution?. *Evolutionary relationships among protozoa*, 109-132.
- Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J. J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S. B. ... and Martin, W. F. (2012). Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol R*, 76(2), 444-495.
- Müller, M. (1988). Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annual Reviews in Microbiology*, 42(1), 465-488.
- Nagler, M., Kozjek, K., Etemadi, M., Insam, H. and Podmirseg, S. M. (2019). Simple yet effective: microbial and biotechnological benefits of rumen liquid addition to lignocellulose-degrading biogas plants. *J Biotechnol*, 300, 1-10.
- O'Fallon, J. V., Wright Jr, R. W. and Calza, R. E. (1991). Glucose metabolic pathways in the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. *Biochem J*, 274(2), 595-599.
- Palmer, J. D. (1997). Organelle Genomes--Going, Going, Gone. *Science*, 275(5301), 790-790.
- Paul, R.G., Williams, A.G. and Butler, R.D. (1990). Hydrogenosomes in the rumen entodiniomorphid ciliate *Polyplastron multivesiculatum*. *J Gen Microbiol*, 136, 1981-1989.
- Paul, S. S., Deb, S. M., Punia, B. S., Das, K. S., Singh, G., Ashar, M. N. and Kumar, R. (2011). Effect of feeding isolates of anaerobic fungus *Neocallimastix* sp. CF 17 on growth rate and fibre digestion in buffalo calves. *Arch Anim Nutr*, 65(3), 215-228.
- Peng, X. N., Gilmore, S. P. and O'Malley, M. A. (2016). Microbial communities for bioprocessing: lessons learned from nature. *Curr Opin Chem Eng*, 14, 103–109.
- Pfanner, N. and Geissler, A. (2001) Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 339 – 349.
- Pittis, A. A. and Gabaldón, T. (2016). Late acquisition of mitochondria by a host with chimaeric prokaryotic ancestry. *Nature*, 531(7592), 101-104.
- Poole, A. M. and Gribaldo, S. (2014). Eukaryotic origins: how and when was the mitochondrion acquired?. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(12), a015990.
- Procházká, J., Mrázek, J., Štrosová, L., Fliegerová, K., Záborská, J. and Dohányos, M. (2012). Enhanced biogas yield from energy crops with rumen anaerobic fungi. *Eng Life Sci*, 12(3), 343-351.
- Ranganathan, A., Smith, O. P., Youssef, N. H., Struchtemeyer, C. G., Atiyeh, H. K. and Elshahed, M. S. (2017). Utilizing anaerobic fungi for two-stage sugar extraction and biofuel production from lignocellulosic biomass. *Frontiers in microbiology*, 8, 635.
- Ribeiro, G. O., Gruninger, R. J., Badhan, A. and McAllister, T. A. (2016). Mining the rumen for fibrolytic feed enzymes. *Anim Front*, 6, 20–26.
- Roger, A.J., (1999). Reconstructing early events in eukaryotic evolution. *Am Nat*, 154, 146–163.



- Rosenthal, B., Mai, Z., Caplivski, D., Ghosh, S., de la Vega, H., Graf, T. and Samuelson, J. (1997). Evidence for the bacterial origin of genes encoding fermentation enzymes of the amitochondriate protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Bacteriol*, 179(11), 3736-3745.
- Saxena, S., Sehgal, J., Puniya, A. and Singh, K. (2010). Effect of administration of rumen fungi on production performance of lactating buffaloes. *Benef Microbes*, 1(2), 183-188.
- Schnürer, A. (2016). Biogas production: microbiology and technology. *Anaerobes in biotechnology*, 195-234.
- Schnürer, A. (2018). Microbiology of the biogas process. *Swedish University of Agricultural Sciences: Uppsala, Sweden*.
- Sharma, H. K., Xu, C. and Qin, W. (2019). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: an overview. *Waste and Biomass Valorization*, 10(2), 235-251.
- Shiflett, A. M. and Johnson, P. J. (2010). Mitochondrion-related organelles in eukaryotic protists. *Annu Rev Microbiol*, 64, 409-429.
- Spang, A., Stairs, C. W., Dombrowski, N., Eme, L., Lombard, J., Caceres, E. F. ... and Ettema, T. J. (2019). Proposal of the reverse flow model for the origin of the eukaryotic cell based on comparative analyses of Asgard archaeal metabolism. *Nat Microbiol*, 4(7), 1138-1148.
- Stairs, C. W., Leger, M. M. and Roger, A. J. (2015). Diversity and origins of anaerobic metabolism in mitochondria and related organelles. *Philos Trans R Soc B: Biol Sci*, 370(1678), 20140326.
- Stern, M. D., Ortega, M. E. and Satter, L. D. (1983). Retention time in rumen and degradation of protein supplements fed to lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Sci*, 66(6), 1264-1271.
- Strzalka, R., Schneider, D. and Eicker, U. (2017). Current status of bioenergy technologies in Germany. *Renew Sustain Energy Rev*, 72, 801-820.
- Swift, C. L., Brown, J. L., Seppälä, S. and O'Malley, M. A. (2019). Co-cultivation of the anaerobic fungus *Anaeromyces robustus* with *Methanobacterium bryantii* enhances transcription of carbohydrate active enzymes. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 46(9-10), 1427-1433.
- Theodorou, M. K., Mennim, G., Davies, D. R., Zhu, W. Y., Trinci, A. P. and Brookman, J. L. (1996). Anaerobic fungi in the digestive tract of mammalian herbivores and their potential for exploitation. *Proc Nutr Soc*, 55(3), 913-926.
- Tielens, A. G., Rotte, C., van Hellemond, J. J. and Martin, W. (2002). Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem Sci*, 27(11), 564-572.
- Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y. and Martin, W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet*, 5, 123-135.
- Tjaden, J., Haferkamp, I., Boxma, B., Tielens, A. G., Huynen, M. and Hackstein, J. H. (2004). A divergent ADP/ATP carrier in the hydrogenosomes of *Trichomonas gallinae* argues for an independent origin of these organelles. *Molecular Microbiology*, 51(5), 1439-1446.
- Tovar, J., Leon-Avila, G., Sanchez, L.B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernandez, M., Müller, M. and Lucocq, J.M. (2003). Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature*, 426, 172-176.
- Trinci, A.P., Davies, D.R., Gull, K., Lawrence, M.I., Bonde Nielsen, B., Rickers, A. and Theodorou, M.K. (1994). Anaerobic fungi in herbivorous animals. *Mycol. Res.*, 98, 129-152.
- Tripathi, V. K., Sehgal, J. P., Puniya, A. K. and Singh, K. (2007). Effect of administration of anaerobic fungi isolated from cattle and wild blue bull (*Boselaphus tragocamelus*) on growth rate and fibre utilization in buffalo calves. *Archives of Anim Nutr*, 61(5), 416-423.
- van der Giezen, M., Rechinger, K. B. R., Svendsen, I., Durand, R., Hirt, R. P., Fevre, M. ... and Prins, R. A. (1997a). A mitochondrial-like targeting signal on the hydrogenosomal malic enzyme from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: support for the hypothesis that hydrogenosomes are modified mitochondria. *Mol Microbiol*, 23(1), 11-21.
- van der Giezen, M., Sjollem, K. A., Artz, R. R., Alkema, W. and Prins, R. A. (1997b). Hydrogenosomes in the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* have a double membrane but lack an associated organelle genome. *FEBS letters*, 408(2), 147-150.
- van der Giezen, M., Slotboom, D. J., Horner, D. S., Dyal, P. L., Harding, M., Xue, G. P. ... and Kunji, E. R. (2002). Conserved properties of hydrogenosomal and mitochondrial ADP/ATP carriers: a common origin for both organelles. *The EMBO journal*, 21(4), 572-579.
- van der Giezen, M., Birdsey, G. M., Horner, D. S., Lucocq, J., Dyal, P. L., Benchimol, M. ... and Embley, T. M. (2003). Fungal hydrogenosomes contain mitochondrial heat-shock proteins. *Mol Biol Evol*, 20(7), 1051-1061.
- van Hoek, A.H.A.M., Akhmanova, A.S., Huynen, M.A. and Hackstein, J.H.P. (2000) A mitochondrial ancestry of the hydrogenosomes of *Nyctotherus ovalis*. *Mol Biol Evol*, 17, 202-206.
- Vanacova, S., Liston, D. R., Tachezy, J. and Johnson, P. J. (2003). Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Int J Parasitol*, 33(3), 235-255.



- Voncken, F., Boxma, B., Tjaden, J., Akhmanova, A., Huynen, M., Verbeek, F. ... and Hackstein, J. H. (2002). Multiple origins of hydrogenosomes: functional and phylogenetic evidence from the ADP/ATP carrier of the anaerobic chytrid *Neocallimastix* sp. *Molecular microbiology*, 44(6), 1441-1454.
- Warren, R. A. J. (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Ann Rev Microbiology*, 50(1), 183-212.
- Weimer, P. J., Russell, J. B. and Muck, R. E. (2009). Lessons from the cow: what the ruminant animal can teach us about consolidated bioprocessing of cellulosic biomass. *Bioresource technology*, 100(21), 5323-5331.
- Wilken, S. E., Monk, J. M., Leggieri, P. A., Lawson, C. E., Lankiewicz, T. S., Seppälä, S. ... and Lindemann, S. R. (2021). Experimentally validated reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic model of an anaerobic *Neocallimastigomycota* fungus. *Msystems*, 6(1).
- Yang, S. T., Liu, X. and Zhang, Y. (2007). Metabolic engineering—applications, methods, and challenges. In *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* (pp. 73-118). Elsevier.
- Yarlett, N., Coleman, G.S., Williams, A.G. and Lloyd, D., (1984). Hydrogenosomes in known species of rumen entodiniomorphid protozoa. *FEMS Microbiol Lett*, 21, 15–19.
- Yarlett, N., Orpin, C. G., Munn, E. A., Yarlett, N. C. and Greenwood, C. A. (1986). Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochem J*, 236(3), 729-739.
- Yarlett, N. and Hackstein, J. H. (2005). Hydrogenosomes: one organelle, multiple origins. *Bioscience*, 55(8), 657-668.
- Young, D., Dollhofer, V., Callaghan, T. M., Reitberger, S., Lebuhn, M. and Benz, J. P. (2018). Isolation, identification and characterization of lignocellulolytic aerobic and anaerobic fungi in one-and two-phase biogas plants. *Bioresource technology*, 268, 470-479.
- Youssef N.H., Couger M.B., Struchtemeyer C.G., Liggenstoffer A.S., Prade R.A., Najjar F.Z., Atiyeh H.K., Wilkins M.R. and Elshahed M.S. (2013). The genome of the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain C1A reveals the unique evolutionary history of a remarkable plant biomass degrader. *Appl Environ Microbiol*, 79, 4620–4634.