



# Effects of coculturing of anaerobic gut fungi and lactic acid bacteria on enzyme activities

Tuğçe Turgut<sup>1\*</sup>, Aziz Bolat<sup>2</sup>, Halit Yücel<sup>3</sup>, Emin Özköse<sup>4</sup>, M. Sait Ekinci<sup>5</sup>

<sup>1\*</sup> Zootečni Bölümü, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Kahramanmaraş TÜRKİYE, (ORCID:0000-0003-2147-5526), [tugceturgut@ksu.edu.tr](mailto:tugceturgut@ksu.edu.tr)

<sup>2</sup> Zootečni Bölümü, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Kahramanmaraş TÜRKİYE, (ORCID: 0000-0002-4630-2368), [bolat10@gmail.com.tr](mailto:bolat10@gmail.com.tr)

<sup>3</sup> Zootečni Bölümü, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Kahramanmaraş TÜRKİYE, (ORCID:0000-0002-6196-5303), [halityucel@ksu.edu.tr](mailto:halityucel@ksu.edu.tr)

<sup>4</sup> Zootečni Bölümü, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Kahramanmaraş TÜRKİYE (ORCID: 0000-0001-5710-4175), [cozkose@ksu.edu.tr](mailto:cozkose@ksu.edu.tr)

<sup>5</sup> Zootečni Bölümü, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Kahramanmaraş TÜRKİYE (ORCID: 0000-0001-7994-0203), [sekinci@ksu.edu.tr](mailto:sekinci@ksu.edu.tr)

(3rd International Conference on Applied Engineering and Natural Sciences ICAENS 2022, July 20-23, 2022)

(DOI: 10.31590/ejosat.1144941)

**ATIF/REFERENCE:** Turgut T., Bolat, A., Yücel H., Özköse E. & Ekinci M.S. (2022). Effects of coculturing of anaerobic gut fungi and lactic acid bacteria on enzyme activities. *European Journal of Science and Technology*, (39), 113-117

## Abstract

Rumen, main compartment of the stomach of ruminant herbivores, have a low redox potential and anaerobic ecosystem in where various microbial populations inhabit, such as bacteria, anaerobic gut fungi (AGF), protozoa and archaea. These microbial groups have a symbiotic life whilst both synergetic relationship and inhibition of some activities could be observed when they are cultured as mixture. Relatively higher enzyme activities of the AGF is well documented although our knowledge about the possible effects of coculturing with lactic acid bacteria on their enzyme activity is still limited. In current work, AGF *Neocallimastix* GMLF11 was cocultured with *Enterococcus sp* and *Bifidobacterium sp* separately and its enzyme activities (inulinase and sucrase) were determined at 45 °C after 24, 36 and 48 hours incubation periods. The highest supernatant specific sucrase (EC 3.2.1.48) activity of *Neocallimastix* GMLF11 and *Enterococcus sp* coculture was determined as 21,4 µmol/min/mg/ml protein for 36h incubation while cell associated specific sucrase activity of same mixture was observed as 22,4 µmol/min/mg/ml protein for 48 h incubation. *Neocallimastix* GMLF11 and *Bifidobacterium sp* coculture showed the highest cell associated specific sucrase activity at 48h incubation as 22,4 µmol/min/mg/ml protein, whilst that activity was determined as 24,6 µmol/min/mg/ml protein for supernatant samples at the end of 24h incubation period. The highest cell associated and supernatant specific activities of pure culture of *Neocallimastix sp* was 8 and 12,3 µmol/min/mg/ml respectively. Axenic cultures of *Enterococcus sp* and *Bifidobacterium sp* showed 20,7 and 21 µmol/min/mg/ml protein supernatant enzyme activity respectively, while cell associated specific activities of that cultures were calculated as 15,9 and 17,6 µmol/min/mg/ml protein respectively. These results suggest that enzyme activities of these microbial groups are remarkably induced when they were grown in coculture.

**Keywords:** Anaerobic gut fungi, Bifidobacterium, Enterococcus, Neocallimastix, rumen

## Anaerobik Gut Fungusları İle Laktik Asit Bakterilerinin Kokültür Olarak Yetiştirildiklerinde Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri

### Öz

Rumen, ruminant hayvanların sindirim sistemi içerisinde yer alan, dört bölmeden oluşan midenin en önemli kısmını oluşturan, redoks potansiyeli düşük, anaerobik ve mikroflora bakımından geniş populasyona sahip bir ekosistemdir. Bu mikroflora içerisinde bakteriler, protozoanlar, anaerobik gut fungusları (AGF), arkealar yer almaktadır. Çoğunlukla simbiyotik yaşam sürmekte olan bu mikroorganizmaların birbirleri üzerine sinerjetik ve baskılayıcı etkileri de bulunmaktadır. AGF yüksek fibrolitik enzim aktivitelerine sahip mikroorganizmalardır, ancak laktik asit bakterileri ile birlikte yetiştirildiklerinde enzim aktivitelerinin hangi yönde etkileneceğine dair bilgilerimiz oldukça kısıtlıdır. Bu çalışmada AGF cinslerinden *Neocallimastix sp* GMLF11 ile *Enterococcus sp* ve *Bifidobacterium sp* ayrı ayrı anaerobik besi yerinde 24, 36 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmış ve 45 °C 'deki (inülinaz, sükröz) enzim aktiviteleri incelenmiştir. Hücre dışındaki sukrozun parçalanması ile oluşan spesifik enzim aktivitesi GMLF11 *Enterococcus sp* için

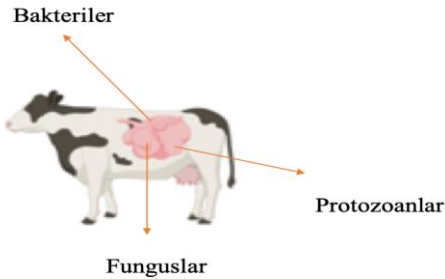
\* Corresponding Author: [tugceturgut@kdu.edu.tr](mailto:tugceturgut@kdu.edu.tr)

21,4 µmol/min/mg/ml protein olarak 36. saatte gerçekleşirken, hücre içi spesifik aktivite 22,4 µmol/min/mg/ml protein olarak 48. saatte en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Diğer kombinasyon olan GMLF11 - *Bifidobacterium sp* hücre içi spesifik enzim aktivitesi 48 saat sonunda 22,4 µmol/min/mg/ml protein olarak ölçülmüş, hücre dışı en yüksek seviyeye (24,6 µmol/min/mg/ml protein) ise 24 saat sonunda ulaşmıştır. *Neocallimastix sp*'nin hücre içi spesifik enzim aktivitesi ise 36. saatte 8 µmol/min/mg/ml hücre dışı aktivite ise 12,3 µmol/min/mg/ml olarak hesaplanmıştır. *Enterococcus sp* ve *Bifidobacterium sp* saf kültür olarak 36 saatlik inkübasyonları sonunda süpernatant enzim aktivitesi sırası ile 20,7 ve 21 µmol/min/mg/ml protein olarak belirlenirken hücre içi aktivite ise 48 saatte 15,9 ve 17,6 µmol/min/mg/ml protein olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar funguslar ile laktik asit bakterilerinin kokültür olarak yetiştirildiklerinde enzim aktivitelerinde önemli derecede artış olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Anaerobik gut fungusları, Bifidobacterium, Enterococcus, Neocallimastix, rumen

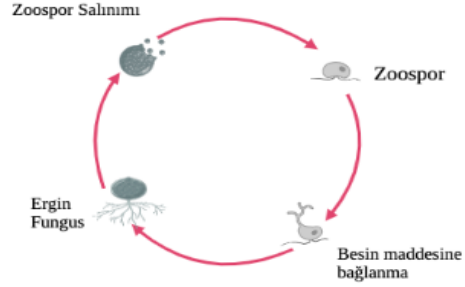
## 1. Giriş

Hayvancılığın en önemli bireyleri olan sığır, keçi ve koyunlar gibi ruminant hayvanlar için yemden yararlanma oldukça önemli bir konumdur. Rumen, ruminant ve bazı ruminant olmayan tek mideli hayvanların (at, eşek deve vb.) sindirim sistemlerinin tümünü kapsamaktadır. Odacıklar halinde 4 bölümden oluşan bu karmaşık yapı içerisindeki mikroorganizmalar aracılığı ile de sindirimi gerçekleştirmektedir. Rumen içerisinde bulunan bu mikroorganizmaların yemin hayvan tarafından daha etkin kullanılmasına yardımcı olduğu bilinmektedir. Rumenin geniş mikroflorası içerisinde bilinen en büyük gruplar bakteriler, funguslar, protozoanlar olarak sınıflandırılabilirler (Şekil 1). Her bir gruba ait bireylerin kendilerine özgü yaşam şekilleri mevcuttur. Rumen koşulları anaerob olduğundan dolayı burada yaşayan mikroorganizmalarda zorunlu anaerob (oksijensiz solunum) mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Bu özelliklerinin yanı sıra rumen içerisinde belirli bir hiyerarşik düzen söz konusudur.



Şekil 1. Sığır midesi ve rumendeki mikroorganizmalar

Anaerobik gut fungusları (AGF) bu mikroorganizmalar içerisinde önemli bir konumda bulunmaktadır. Ruminant hayvanlardan AGF'lerin ilk izolasyonu 1970'lerde gerçekleştirilmiş ve 50 farklı herbivor sindirim sisteminde buldukları da gözlemlenmiştir (Kittelman ve ark., 2012). Günümüze kadar 20'den fazla tür AGF belirlenmiştir (Paul ve ark., 2018). Yaşam döngüsü hareketli bir zoospor safhası ve yaşam döngüsü üzerinde hareketsiz vejetatif Tallus safhası olmak üzere 2 aşamadan oluşmaktadır (Orpin, 1975, Theodorou ve ark., 1990) (Şekil 2).



Şekil 2. Anaerobik fungusların yaşam döngüsü

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Kullanılan mikroorganizmalar

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesini Zootehni Bölümüne ait koleksiyonundan *Neocallimastix sp* (GMLF 11), *Bifidobacterium sp* ve *Enterococcus sp* 'ye ait bireyler kullanılmıştır.

### 2.2. Besiyerlerinin hazırlanması

GMLF 11 suşu için anaerobik besi yeri Orpin (1976)'e hazırlanmıştır. *Bifidobacterium sp* için MRS ticari besi yeri ve *Enterococcus sp* için ise LB besi yeri kullanılmıştır.

### 2.3. Mikroorganizmaların aktifleştirilmesi

Her üç suş için optimum koşullar düşünülerek hazırlanmış besi yerlerinde 24, 36 ve 48 saat süren inkübasyon süreleri belirlenmiş saf kültür ve GMLF 11 ile *Bifidobacterium sp* kokültür ve de GMLF 11 *Enterococcus sp* kokültürleri oluşturulacak şekilde geliştirilmiştir. Süre sonunda suşlara ait hücre peletleri ve süpernatantlar enzim analizleri için +4 °C 'de muhafaza edilmiştir.

### 2.3. Enzim Ekstratlarının Hazırlanması

Enzimlerinin aktivesi Miller (1959) 'e ait yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre reaksiyon karışımı 25µl enzim ekstraktı ve 225µl substrat (%0.5 substrat, 25mM potasyum fosfat tamponu, pH 6.5 sükröz ve inülin) oluşmaktadır. Karışım 45 °C' de 45dk inkübasyona bırakılmıştır. Karışım üzerine 250µl 3-5 dinitrosalisilik asit (DNS) solüsyonu (%30 sodyum potasyum tartarat, 2N NaOH, %1 DNS) katılmış ve 5dk kaynar su banyosunda bekletilerek enzim reaksiyonu durdurulmuştur. Kontrol grubu sırasıyla 225µl substrat üzerine 250µl DNS ilave edilmiş 25µl enzim ekstratından eklenerek 5dk kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Kontrol ve deney grubu karışımları saf su ile 1ml' ye tamamlanarak spektrometrede

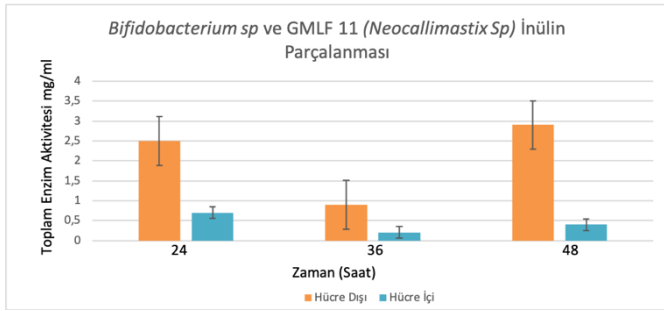
540nm'de okutulmuştur. Standart çözeltisinde glikoz kullanılmıştır bütün enzim çalışmaları 2 tekerrür 3 paralel olarak yürütülmüştür. Bir ünite enzim aktivitesi 1dk içinde alınan 1µ mol indirgenen şeker miktarı olarak tanımlanmıştır.

### 3. Bulgular ve Tartışma

Saf kültür ve kokültür gelişimleri sonucu oluşan hücre içi ve hücre dışı inülinaz ve sükröz enzim aktiviteleri spesifik ve toplam enzim aktivitesi olacak şekilde hesaplanmıştır.

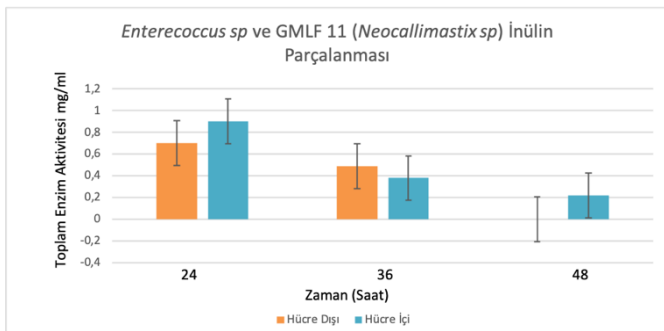
#### 3.1. Toplam inülinaz aktivitesi

*Bifidobacterium sp* ve GMLF 11 şuşlarına ait toplam enzim aktiviteleri hücre içi ve hücre dışında farklılık göstermektedir. Hücre içi enzim aktivitesi 24 saatte 0,7 µmol/min/mg/ml ile maksimum seviyeye ulaşırken en düşük 36 saatte 0,2 µmol/min/mg/ml miktarına düşüş göstermiştir. Hücre dışı toplam aktivite ise en yüksek değere 48. saatte 2,9 µmol/min/mg/ml ölçülmüş en düşük ise yine 36 saatte 0,9 µmol/min/mg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. *Bifidobacterium sp* ve GMLF 11 kokültürlerine ait toplam inülinaz aktivitesi

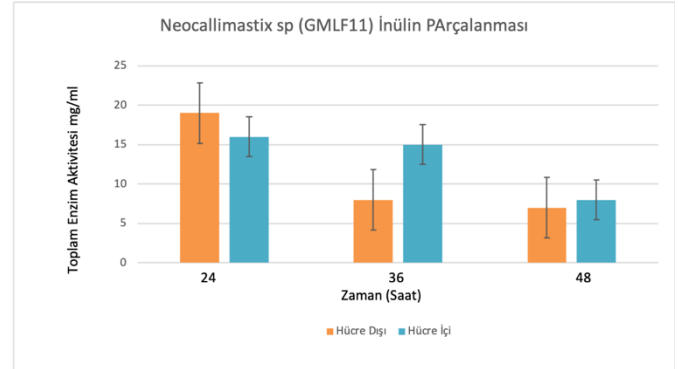
*Enterococcus sp* le GMLF 11 şuşlarının kokültür gelişimleri sonucunda elde edilen inülinaz toplam enzim aktivitesi hücre dışında ve hücre içinde değişiklik göstermektedir. hücre içi toplam inülinaz aktivitesinin en yüksek olduğu zaman dilimi 24. saatte 0,9 µmol/min/mg/ml iken en düşük olduğu zaman dilimi 48. saatte 0,22 µmol/min/mg/ml olarak belirlenmiştir. hücre dışı toplam inülinaz aktivitesi ise yine 24. saatte en yüksek seviyeye 2,5µmol/min/mg/ml ile ulaşmış olup en düşük değerde 48. saatte hesaplanamayacak kadar az bulunmuştur (Şekil 4).



Şekil 4. *Enterococcus sp* ve GMLF 11 kokültürlerine ait toplam inülinaz aktivitesi

*Neocallimastix sp*' ye ait bireylerin inülinaz toplam enzim aktivitesinde 24 saatte en yüksek hücre içi enzim miktarına 16 e-ISSN: 2148-2683

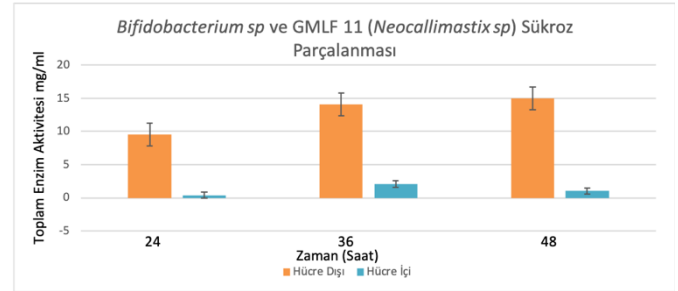
µmol/min/mg/ml protein olarak ulaşmış olup en düşük aktiviteye 48 saatte 8 µmol/min/mg/ml protein olarak belirlenmiştir. Hücre dışı toplam enzim aktivitesi 24 saatte 19 µmol/min/mg/ml protein ile maksimum seviyeye ulaşmış minimum ise yine 48 saatte 7 µmol/min/mg/ml protein değeri ile belirtilmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. *Neocallimastix sp* saf kültürüne ait toplam inülinaz aktivitesi

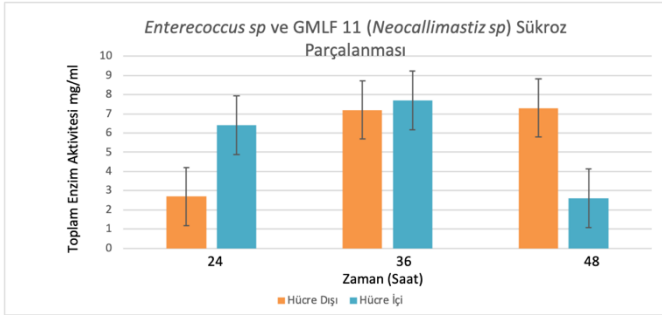
#### 3.2. Toplam inülinaz aktivitesi

*Bifidobacterium sp* ve GMLF 11 (*Neocallimastix sp*) 'nin kokültür gelişimleri sonucunda ortaya çıkan toplam sükröz aktivitesi hücre içi 36 saatte maksimum seviyeye ulaşmıştır. Toplam hücre içi sükröz aktivitesi 24 saatte 0,4 µmol/min/mg/ml protein miktarı ile önemsiz sayılabilecek düzeydedir. Hücre içi 48 saatte 1 µmol/min/mg/ml protein miktarı ile yeniden azalmıştır. Hücre dışı enzim miktarı 15 µmol/min/mg/ml protein 48 saatte gözlemlenirken 24 saatte 9,5 µmol/min/mg/ml protein olarak belirlenmiştir (Şekil 6).



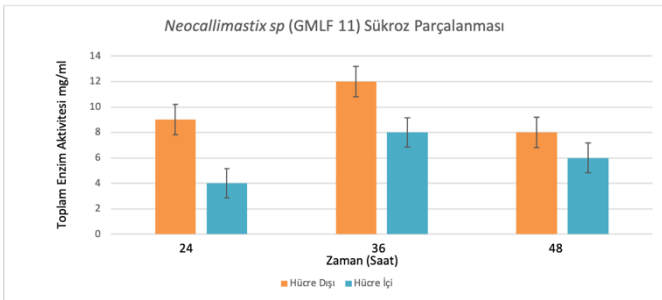
Şekil 6. *Bifidobacterium sp* ve GMLF 11 (*Neocallimastix sp*) kokültür gelişimlerine ait toplam sükröz aktivitesi

Sükröz toplam enzim aktivitesi *Enterococcus sp* ve GMLF 11 şuşu için hücre içi ve hücre dışı en yüksek 36 saatte gözlemlenmiştir. Hücre içi 24 saatte 6,4 µmol/min/mg/ml protein ve 48 saatte 2,6 µmol/min/mg/ml protein olduğu görülmüştür (Şekil 7).



Şekil 7. *Enterococcus sp* ile GMLF 11 sükraz toplam aktivitesi

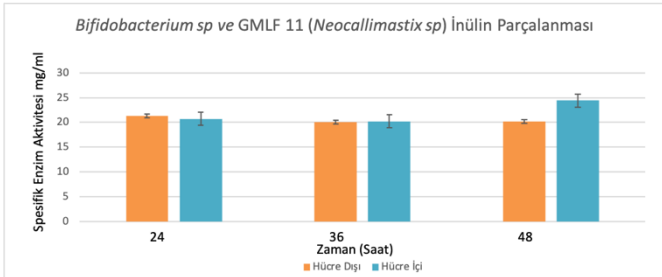
*Neocallimastix sp*'nin saf kültür geliştirmesi sonucu elde edilen toplam sükraz miktarı hücre içi ve hücre dışında farklı olarak bulunmuştur. En iyi enzim aktivitesi sonucu 36 saatte hem hücre içi hem de hücre dışında aynı zamanda gözlemlenmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. *Neocallimastix sp*. saatlik sükraz aktivitesi

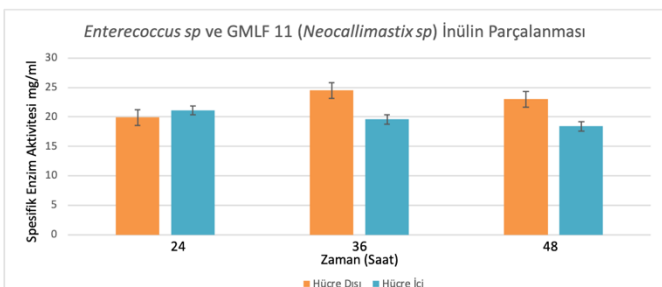
### 3.3. Spesifik inülaaz aktivitesi

*Bifidobacterium sp* ve GMLF 11 suşları için spesifik inülaaz aktivitesi incelenmiş ve inülaaz aktivitesinin 48 saatte hücre içi aktivitesinin en yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 9).



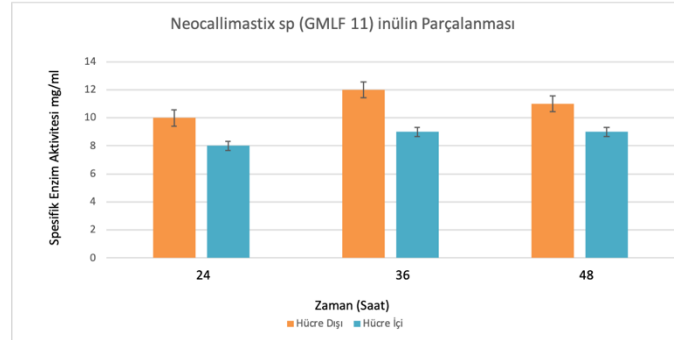
Şekil 9. *Bifidobacterium sp* kokültür çalışması saatlik enzim aktivitesi

*Enterococcus sp* kokültür çalışması sonucu hücre dışı inülin parçalanması en yüksek 36 saatte en düşük 24 saatte gözlemlenmiştir. Bunun tersi olarak hücre içi aktivite 24 saatte maksimum seviyeye ulaşmış 48 saatte doğru enzim miktarında azalma gözlemlenmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. *Enterococcus sp* kolültür çalışması enzim aktivitesi

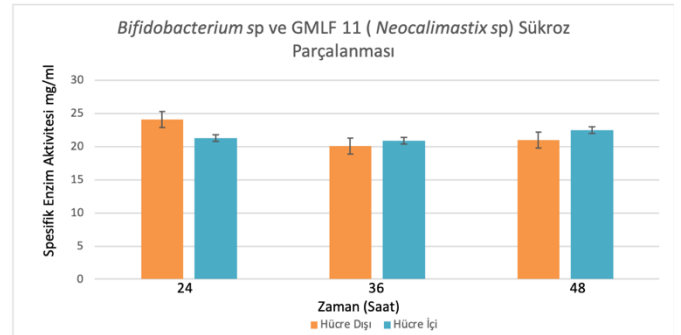
*Neocallimastix sp* 'ye ait bireyin saf kültür çalışması sonucu inülinaz spesifik aktivitesi hücre içi ve hücre dışı farklılık göstermektedir. Hücre içi aktif enzim miktarı hücre dışı enzim miktarına oranla düşük olurken en yüksek enzim aktivitesi her iki koşulda da 36n saat sonunda gözlemlenmektedir (Şekil 11).



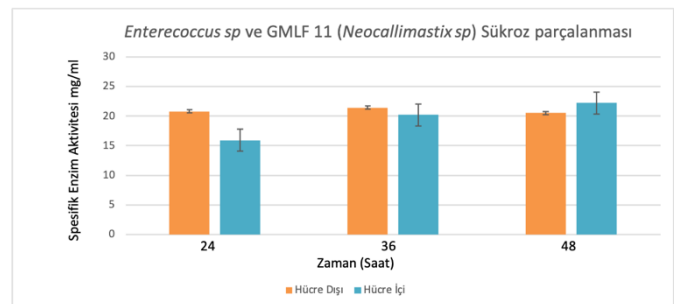
Şekil 11. *Neocallimastix sp* (GMLF 11) zamana göre inülinaz spesifik aktivitesi

### 3.3. Spesifik sükraz aktivitesi

Spesifik enzim aktivitesi kokültür gelişimlerinde saf kültür gelişimlerine göre farklılık göstermiştir. Buna göre hücre içi ve hücre dışı aktiviteler analiz edilmiş olup hücre dışı enzim miktarlarının hücre içine göre yüksek olduğu belirlenmiştir ( Şekil 12 ).

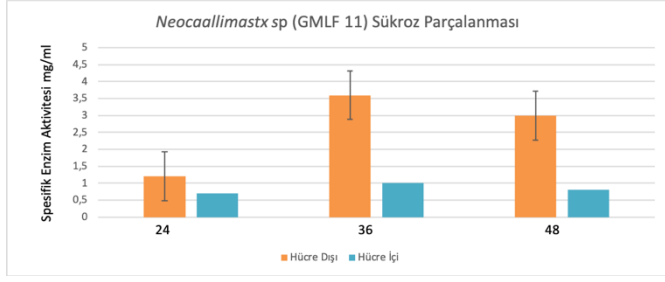


Şekil 12. Spesifik sükraz aktivitesinin *Bifidobacterium sp* kokültür gelişiminde zamana göre değişimi. Kombinasyonlu gelişim sonucu sükraz aktivitesinin zamana göre değişimleri incelenmiş enzim aktivite değerlerinin hücre dışı ve hücre içi miktarlarında benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. *Enterococcus sp* kokültür çalışmaları spesifik sükraz aktivitesinin zamana göre değişim grafiği.

Saf kültür geliştirme sonucu spesifik enzim aktiviteleri supernatant ve hücre içi aktivitelerde önemli derecelerde farklılık tespit edilmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. *Neocallimastix sp* saf kültür çalışmaları sükröz aktivitesinin zamana göre değişim grafiği

*Neocallimastix sp* saf gelişimlerinde hücre dışı sükröz aktivitesi 36 saatte maksimum seviyeye ulaşmış olup, hücre içi aktivite ise tüm zaman dilimlerinde birbirine yakın bulunmuştur.

## 4.Sonuç ve Tartışma

Enzim aktivitelerine genel olarak bakıldığında hücre dışı enzim aktivitelerinin hücre içi aktivitelerine önemli derecede yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda saf kültür ve kokültür gelişmelerinde de enzim aktivite miktarlarındaki farklılıklar önemli düzeydedir. Kokültür geliştirme sonucu mikroorganizmaların enzim aktivitesi bakımından birbirlerini pozitif yönde etkiledikleri gözlemlenmiştir.

## Kaynaklar

- Kittlmann, S.; Naylor, G.E.; Koolaard, J.P.; Janssen, P.H. (2012),A proposed taxonomy of anaerobic fungi (class neocallimastigomycetes) suitable for large-scale sequence-based community structure analysis., 7, 1–13
- Paul, S.S.; Bu, D.; Xu, J.; Hyde, K.D.; Yu, Z.(2018).,A phylogenetic census of global diversity of gut anaerobic fungi and a new taxonomic framework. Fungal Divers., 89, 253–266.
- Orpin, C.G., 1975. Studies on the Rumen Flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Journal of general microbiology*, 91(2),.249–262.