

Anaerobik Fungusların Bitki Dokularını Kolonizasyonu ve Enzimatik Yıkımı

Uğur Çömlekçioğlu*, Emin Özköse, İsmail Akyol, Mehmet Sait Ekinci

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Kahramanmaraş

*e-posta: cugur@ksu.edu.tr; Tel: +90 (344) 219 14 33; Faks: +90 (344) 219 10 42

Özet

Anaerobik fungusların keşiflerine kadar gerek ruminantların ve gerekse tek mideli herbivorların sindirim sistemlerinde bitkilerin enzimatik yollarla yıkılmalarında sadece protozoa ve bakterilerin rol aldıklarına inanılmaktaydı. Ancak bugün anaerobik fungusların rumenin vazgeçilmez üyelerinden biri olduğu ve hayvanlar tarafından alınan bitkilerin hücre duvarlarının yıkımında aktif rol aldıkları kesin olarak bilinmektedir. Anaerobik fungusların ferulik ve *p*-kumarik asitlere karşı kemotaksisinin olması lignifiye dokuları öncelikle kolonize etmelerini sağlamaktadır. Bitki hücre duvarının parçalanmasını sağlayacak etkin polisakaridaz enzimlerinin endüstriyel açıdan önem arz etmesi, bu enzim genlerinin klonlanarak biyoteknolojik olarak potansiyellerinin araştırılmasına neden olmuştur. Bu çalışmada, anaerobik rumen funguslarının bitki hücre duvarlarının kolonizasyonu, enzimatik yıkımı ve bu enzimleri kodlayan genleri üzerine genel bir bakış sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Anaerobik fungus, bitki hücre duvarı, enzimatik yıkım, biyoteknoloji

Colonization and Enzymatic Degradation of Plant Tissues by Anaerobic Fungi

Abstract

Until anaerobic fungi were discovered, it was believed that bacteria and protozoa had the major role in the enzymatic digestion of plants in ruminants and monogastric herbivores. But it was emerged that the anaerobic fungi was an indispensable member of ruminant ecosystem and their roles in the fermentation of plant cell walls was clarified in the herbivores. Chemotaxis to ferulic and *p*-coumaric acids of anaerobic fungi could provide the preferentially colonization of lignified tissues of plants. Because of the anaerobic fungal polysaccharidases, which take place in the degradation of plant cell walls, were industrially important, these enzyme genes were cloned and potentials of these enzymes were investigated in the biotechnological manner. In this study, it was focused on the colonization and enzymatic degradation of plant cell walls by anaerobic fungi and overviewed on the cloned fibrolytic enzyme genes.

Key words: Anaerobic fungi, plant cell wall, enzymatic degradation, biotechnology

Giriş

Rumen mikrobiyal ekosistemi içerisinde anaerobik funguslar, en dayanıklı bitkisel dokular da dahil olmak üzere bitki hücre duvarlarını hızlı bir şekilde kolonize edebilen mikroorganizma grubudur (Borneman ve ark., 1991). Anaerobik funguslar öncelikle rumende uzun süre kalan baklagil ve ot gibi bitkilere ait kök ve yaprakların vasküler dokuları (Bauchop, 1986) ile otların yapraklarını yoğun bir şekilde kolonize etmektedirler (Akin ve ark., 1983). Ferulik ve *p*-kumarik asitlerin fungusların karboksimetil selüloz (KMSaz), ksilanaz ve β -glükosidaz enzimleri üzerinde inhibitör etkisi olduğu gösterilse de (Saad ve ark., 2008), bu fenolik bileşiklerin anaerobik fungusları kimyasal olarak uyarması lignifiye dokuları öncelikle kolonize etmelerini sağlamaktadır (Wubah ve Kim, 1996).

Polisentrik fungusların rizomiselyumları ile bitki parçalarını sıkı bir şekilde sarması dirençli

lignoselülozik materyalin parçalanmasında avantaj sağlarken, monosentrik funguslar daha kolay yayılarak bitki hücre duvarını kolonize edebilmektedirler (Borneman ve ark., 1989). Monosentrik fungusların rizomiselyumları polisentriklerin aksine substrat yüzeyinde nadiren görülmektedir (Webb ve Theodorou, 1988). Şekil 1'de monosentrik fungus *Neocallimastix* sp. GMLF1 ve polisentrik fungus *Orpinomyces* sp. GMLF 6'nın bitki parçasını kolonizasyonu görülmektedir.

Caecomyces spp.'nin küresel rizoidlere sahip olmaları bitki dokularına derinlemesine girmelerini engellemekte (Joblin, 1989), bu nedenle anaerobik funguslar içerisinde en az düzeyde hücre duvarını parçalayabilen funguslar oldukları düşünülmektedir (Gordon ve Phillips, 1989). Miselyal anaerobik funguslar ise bitki dokuları üzerinde aşırı büyüyerek rizomiselyumları ile sararlar ve koruyucu bir mumsu tabaka olan kütikula bariyerini yararak bitki hücre duvarını parçalarlar (Akin, 1994). Funguslar bitki parçalarına tutundukları bölgeden

selüloz ve hemiselüloz gibi hücre duvarı karbonhidratlarını fermente etseler de lignini parçaladıklarına dair herhangi bir kanıt bulunmamıştır (Grenet ve Barry, 1988). Rumen bakterileri tarafından kısmen parçalanmış fenolik bitki dokuları, rumen fungusları tarafından tamamen, rumen bakterileri tarafından parçalanamayan dokular ise rumen fungusları tarafından kısmen parçalanabilmektedir (Borneman ve ark., 1991).

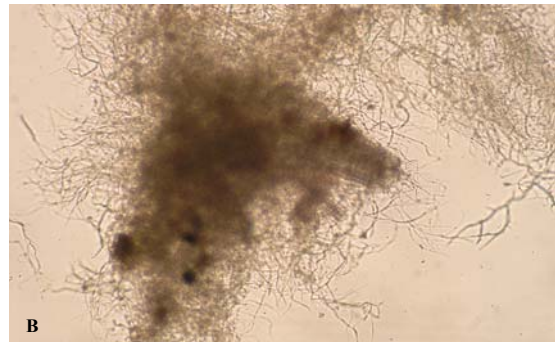
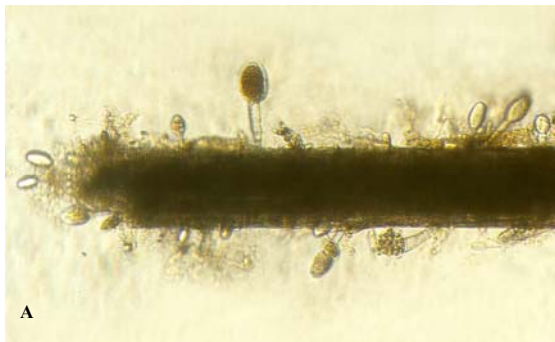
Fibrolitik Enzim Sistemleri

Anaerobik fungusların polisakkaritleri parçalayan enzimlerinin çoğu rizoidlerde, rizomiselyumda lokalize olmakla beraber ekstrasellüler olarak da salgılanmaktadır (Lowe ve ark., 1987). Ayrıca anaerobik fungus zoosporlarının da polisakkarit parçalayan enzimler ürettiği bildirilmiştir (Williams ve Orpin, 1987a). İmmunoflorasans teknikleri ise enzimlerin zoosporların çimlenmesinden başlayarak ribozomca zengin vejetatif hücrelerde vesiküllerde, rizoidlerde ve hücre duvarının yüzeyinde lokalize olduğunu, enzim üretiminin ise sporulasyon zamanında oldukça düştüğünü göstermiştir (Breton ve ark., 1995). Bugüne kadar çalışılan tüm rumen fungus türlerinin selüloz, hemiselüloz ve nişasta kullanabildikleri bildirilmiştir. Rumen funguslarının selülaz (Mountfort ve Asher, 1985), ksilanaz (Mountfort ve Asher, 1989), amilaz (Mountfort ve Asher, 1988), amiloglikosidaz (Pearce ve Bauchop, 1985), feruloil ve *p*-kumaril esteraz (Borneman ve ark., 1990), pektin liyaz (Gordon ve Phillips, 1992), β -ksilosidaz (Gomez de Segura ve ark., 1998), β -glukosidaz (Chen ve ark., 1994), proteaz (Asao ve ark., 1993) ve 1,3-1,4-beta-D-glukanaz (Chen ve ark., 1997) enzimlerini ürettiği bildirilmiştir.

Selülazlar

N. frontalis'in selülaz genleri katabolit baskılama ile düzenlenmekte ve glikoz eklendiği zaman selülaz üretimi neredeyse tamamen durmaktadır (Mountfort ve Asher, 1985). Ancak *Anaeromyces* ve *Orpinomyces* suşlarının glikozlu besi ortamında sırasıyla yüksek düzeyde endoglukanaz ve sellobiyohidrolaz ürettikleri de bildirilmiştir (Fliegerova ve ark., 2004). *Neocallimastix* sp.'nin endoglukanaz üretimi karboksimetil selüloz (KMS), avisel ve fibröz selüloz gibi karbon kaynaklarının varlığında indüklenerek en üst düzeye ulaşmaktadır (Çömlekçiöğlü ve ark., 2008). Bununla beraber *N. frontalis*'in fermentörde gerçekleştirilen devamlı kültüründe selülitik enzimlerin sürekli olarak sentezlendiği (Srinivasan ve ark., 2001), *N. hurleyensis*'in ise 31 alt kültüründen sonra enzim üretiminin arttığı (Ekinci ve ark., 2006) gözlenmiştir. Rumen funguslarının selülitik enzimlerinin çalıştığı optimum sıcaklık ve pH değerlerinin ise sırasıyla 40-50 °C ve 5.9-7.5 arasında değiştiği görülmektedir (Mountfort ve Asher, 1985; Chen ve ark., 1994; Ye ve ark., 2001).

Selülözün parçalanması için gerekli olan en az üç adet enzim olan endo-1,4- β -glukanaz, ekzo-1,4- β -glukanaz (sellobiyohidrolaz) ve β -glukosidaz anaerobik funguslar tarafından da üretilmektedir (Williams ve Orpin, 1987b; Borneman ve ark., 1989). *N. frontalis*'in metanojenler ile kokültüründen elde edilen selülaz aktivitesi en aktif selülaz enzim kaynağı olarak bildirilen *T. reesei* C30'dan çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Wood ve ark., 1986). Rumen bakterilerinin β -glukosidazları temel olarak hüreseldir.



Şekil 1. Rumen funguslarının bitki parçalarını kolonizasyonu. Bitki parçasını kolonize eden *Neocallimastix* sp.'ye ait sporangia (A) ve polisentrik bir fungusun bitki parçasını rizomiselyumları ile yoğun bir şekilde sarması (B) görülmektedir (Çömlekçiöğlü, 2009'dan değiştirilmiştir).

Bu nedenle fungal β -glükosidazlar rumen sıvısından sellobiyozun uzaklaşmasında önemli rol oynamakta ve selüloz hidrolizi sonucunda biriken sellobiyozun meydana getireceği inhibisyonun önüne geçilmektedir (Chen ve ark., 1994). Sellobiyoz, *C. communis*'de tek başına β -glükosidaz enziminin üretimini tetiklediği bildirilmiştir (Bata ve Gerbi, 1997). *O. joyonii*'de β -glükosidaz aktivitesi büyük oranda hücre duvarı fraksiyonunda bulunurken, *C. communis*'de ekstrasellüler olarak sentezlendiği (Hodrova ve ark., 1998), *Piromyces* sp. E2'nin ise selülozom kompleksinde β -glükosidaz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Steenbakkers ve ark., 2003).

Ksilanazlar

Ksilanaz, anaerobik fungusların çalışılan tüm endopolisakkarit hidrolaz enzimleri içerisinde en aktif olan enzimdir. Ksilanaz aktivitesi endoglukanaz aktivitesinden 5-7 kat fazla olduğu bildirilmiştir (Borneman ve ark., 1989). Ancak Tripathi ve ark. (2007)'nin yaptığı çalışmada izole ettikleri 12 fungusun endoglukanaz aktivitesi ksilanaz aktivitesinden yüksek çıkmıştır. *N. frontalis*, ksilanaz enzimini çoğunlukla kültür ortamına salgılamaktadır ve sadece az bir miktarı fungal rizoidler ile ilişkili olduğu bildirilirken (Mountfort ve Asher, 1989; Pearce ve Bauchop, 1985) önemli miktarda hücrel aktiviteye sahip olan türler de bulunmaktadır (Williams ve Orpin, 1987a; Lowe ve ark., 1987). Rumen funguslarının ksilanaz üretimleri için ksilan en etkili uyarıcı (Yanke ve ark., 1996) olmakla beraber buğday samanı, selüloz, sellobiyoz, glikoz veya ksiloz içeren besi ortamlarında da ksilanaz üretildiği, bu sonuca göre ksilanazın rumen fungusları tarafından bazal düzeyde üretildiği ve ksilan varlığı ile arttığı sonucuna varılmıştır (Lowe ve ark., 1987). Filtre kağıdı içeren kültürde gelişen rumen funguslarında ksilanaz aktivitesinin endoglukanazdan düşük olduğu görülmüştür (Ho ve ark., 1996). Rumen fungal ksilanazların optimum pH ve sıcaklıkları sırasıyla 5.5-6.5 ve 50-55 °C arasında bulunmuştur (Mountfort ve Asher, 1989; Gomez de Segura ve Fevre, 1993). *N. frontalis*'in karbon kaynağı olarak avisel içeren kültüründe β -ksilosidaz enzimi üretilirken (Pearce ve Bauchop, 1985), bu fungusun ksilanlı kültüründe ürün olarak ksilobioz ve az miktarda ksilo-oligosakkarit tespit edilmesi β -ksilosidaz üretilmediğini göstermiştir (Mountfort ve Asher, 1989). *N. frontalis*'den iki adet β -endoksilanaz enzimi saflaştırılmış, bu enzimlerden ksilanaz I'in avisele absorbe olduğu, diğerinin de KMSaz aktivitesi içerdiği görülmüştür (Gomez de Segura ve Fevre, 1993). *C. communis*'in ksilanaz ve β -

ksilosidaz enzimlerinin kültür ömrünün son aşamasında daha yüksek olduğu (Gerbi ve ark., 1996) ve β -ksilosidaz sentezinin glikoz ve sellobiyoz ile uyarıldığı gözlenmiştir (Bata ve Gerbi, 1997). *N. frontalis*'in β -ksilosidaz enziminin büyük çoğunluğu hücre içerisinde olmakla beraber önemli miktarda da hücre dışına bırakılmaktadır (Gomez de Segura ve ark., 1998).

Amilaz

Neocallimastix'in avisel kültüründen elde edilen enzim ekstraktının nişasta üzerinde aktif olması ve nişastanın hidrolizi sonucunda tek ürün olarak glikozun elde edilmesi hidrolizin amiloglikosidaz tarafından katalizlendiğini göstermektedir (Pearce ve Bauchop, 1985). *Neocallimastix*, *Piromyces* ve tanımlanmayan bir izolatın nişasta ve maltoz içeren kültürlerinde α -glükosidaz ve β -maltozidaz salgıladığı bildirilmiştir (Williams ve Orpin, 1987b). *N. frontalis*'in nişasta ve maltoz kültüründe α -amilaz üretimi indüklenirken selüloz, ksilan, sellobiyoz, glikoz ve ksiloz varlığında α -amilaz sentezi düşük olmuştur. Ayrıca son ürün olarak maltoz, maltobioz, maltotetroz, uzun zincirli oligosakkaritler meydana gelmiş ancak glikoz görülmemiştir (Mountfort ve Asher, 1988). *Neocallimastix*, *Piromyces* ve *Orpinomyces*'in ekstrasellüler amilolitik aktivitesi daha yüksek bulunmuş (Yanke ve ark., 1993) bu fungusların mısır nişastasını buğday ve arpa nişastasına göre daha hızlı parçaladıkları rapor edilmiştir (McAllister ve ark., 1993).

Proteazlar

N. frontalis'in büyük oranda ekstrasellüler olarak salgılanan yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Wallace ve Joblin, 1985). Proteolitik aktivitenin EDTA gibi şelatörler tarafından inhibe edilmesi enzimin bir metalloproteaz olduğunu göstermektedir (Wallace ve Joblin, 1985). *N. frontalis*'in proteazları proteolitik rumen bakterileri ile karşılaştırılabilir olsa da bazı aerobik funguslar kadar yüksek aktiviteye sahip değildir. Rumen funguslarının proteazları gelişimleri için amino asit sağlayabileceği, diğer ekstrasellüler fungal enzimlerin (selülaz, ksilanaz) aktivitelerini değiştirebileceği veya bitkisel materyale penetrasyonunda yardımcı olabileceği bildirilmiştir. Aktif selüloolitik rumen bakterilerin genellikle proteolitik aktiviteye sahip olmadığı, bu iki özelliğin de rumen funguslarında olmasının özel bir durum olduğu görülmüştür (Wallace ve Joblin, 1985). *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces* ve bir polisentrik fungusu ait yedi suşun proteaz aktiviteleri araştırılmış, bütün suşlarda aminopeptidaz aktivitesi, iki suşda

endopeptidaz aktivitesi görülürken karboksipeptidaz aktivitesi hiçbir suşda gözlenmemiştir (Michel ve ark., 1993). *Neocallimastix* sp.'nin proteolitik aktivitesinin *Piromyces* sp.'den daha yüksek olması rumen içerisindeki mücadelede önemli bir avantaj olarak görülmektedir (Asao ve ark., 1993). Rumen funguslarının hücre ve hücre dışı proteolitik aktivitesi eşit iken spesifik aktivitenin hücre dışında daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Yanke ve ark., 1993).

Pektinazlar

N. frontalis'in poligalakturonik asidin hidrolizini gerçekleştirememesi pektinaz enziminin yokluğunu işaret etmektedir (Pearce ve Bauchop, 1985). Benzer sonuç Williams ve Orpin (1987a) tarafından da bulunmuş ancak *N. patriciarum* ve *P. communis* tarafından pektinden sınırlı miktarda indirgenen şekerin salındığı bildirilmiştir. Tek enerji kaynağı olarak pektin veya onun hidroliz ürünleri olan D-galakturonik asit ve poligalakturonik asidin kullanıldığı kültürlerde rumen fungusları gelişmemiştir (Phillips ve Gordon, 1988). Pektinolitik enzimlerin *Neocallimastix* sp. tarafından ot yaprakları içeren kültürde üretildiği ancak pektin hidroliz ürünlerinin gelişmek için fungus tarafından kullanılmadığı görülmüştür (Gordon ve Phillips, 1992). Bu durum rumen funguslarının rumen içerisindeki uzun hayat döngüsü (yaklaşık 24 saat) ile ilişkili olabileceği görüşünü desteklemiştir, çünkü bitkideki bütün fibril içeriğinin içerisinde pektin rumen mikroorganizmaları tarafından en hızlı fermente edilen polimer olduğu bilinmektedir (Bauchop, 1986). Anaerobik funguslar tarafından gerçekleştirilen pektin hidrolizi lignin ve hemiselüloz arasındaki bağların kopmasını sağlayarak fungusun diğer kullanılmayan karbonhidratlardan faydalanmasını sağladığı görüşü önerilmiştir (Theodorou ve ark., 1996).

Esterazlar ve Ligninin Parçalanması

Lignin ve hemiselüloz kompleksinden *p*-kumaril ve feruloyl yan bağlarının kırılmasında rol oynayan ksilan esteraz, feruloyl esteraz ve *p*-kumaril esteraz enzimleri *Neocallimastix*, *Piromyces* ve *Orpinomyces* kültürlerinde bulunmuştur (Borneman ve ark., 1990). *Neocallimastix* sp.'den saflaştırılan *p*-kumaril esteraz enziminin ksilanaz ve diğer hücre duvarını parçalayan enzimler ile beraber aktivitesinin arttığı görülmüştür (Borneman ve ark., 1991). Aynı fungustan saflaştırılan feruloyl esterazların da ksilanaz ve β -ksilozidaz ile sinerjik olarak çalıştığı görülmüş, böylelikle sahip olduğu *p*-kumaril esteraz ile beraber rumen funguslarının fenolik içerikli lignifiye dokuların

öncelikli olarak kolonizasyonunu sağladığı bildirilmiştir (Borneman ve ark., 1992).

Lignin molekülünün parçalanması için moleküler oksijenin gerekli olması nedeniyle anaerobik fungusların lignini parçalayan enzimleri üretmedikleri öngörülmektedir (Theodorou ve ark., 1996). Rumen fungusları lignoselülozik dokuları öncelikli olarak kolonize etmelerine rağmen (Akin ve ark., 1983) lignin bileşenini fermente etmedikleri ancak ligninin bitki hücre duvarından kaybolduğu rapor edilmiştir (Akin, 1994). Anaerobik funguslar bitki hücre duvarında lignin-ksilan matriksinde bağları parçalayarak lignini serbest bırakmakta ve fibrolitik enzimlerin diğer polisakaritlere daha kolay ulaşabilmesini sağlamaktadır (McSweeney ve ark., 1994).

Anerobik Fungusların Fibrolitik Enzim Genetiği

Anaerobik fungusların enzim sistemlerinin detaylı olarak karakterize edilmesi enzim genlerinin klonlanması ile başarılmıştır. Çalışılmak istenilen genler genel olarak saf kültürlerden (Huang ve ark., 2005) veya doğrudan rumen sıvısı içerisinde bulunan mikroorganizmalardan izole edilen genomik DNA'dan (Liu ve ark., 2005) elde edilmiştir. Bu genlerin yapıları ise DNA dizileme işlemi ile karakterize edilmiş, çeşitli endoglukanazların ve ksilanazların aynı veya farklı katalitik özellikte olduğu ve çoklu katalitik domainlerin (enzimin aktif bölgesi) ise bir polipeptit üzerinde olduğu bulunmuştur (Gilbert ve ark., 1992). *N. patriciarum*'dan klonlanan *celA* diğer ruminal mikrobiyal selülozlar ile homoloji göstermezken aerobik fungus *Trichoderma reesei*'den izole edilen sellobiyohidrolaz II (CBHII) ile homoloji göstermektedir (Denman ve ark., 1996). Bu enzim karbonhidrat bağlama bölgesi (CBD) içermektedir ve *E. coli* tarafından sentezlenen bu enzimden CBD'nin çıkartılması enzimin avisel parçalama kapasitesini oldukça düşürmüştür (Denman ve ark., 1996). *N. patriciarum*'un *celD* geni üç katalitik domain içeren, endoglukanaz, sellobiyohidrolaz ve ksilanaz kodlayan, selüloz bağlama kapasitesine sahip olan (Xue ve ark., 1992) ve 2. katalitik domaini avisele karşı yüksek spesifik aktivite gösteren bir gendir (Aylward ve ark., 1999). *N. frontalis*'e ait *celE* geninin KMS, avisel, metilumbelliferil sellobiyosit, p-nitrofenil sellobiyosit, likenan ve ksilan üzerinde (Xue ve ark., 1993), *O. joyonii*'ye ait *celB2* geninin ise β -glukan, likenan, KMS ve ksilan üzerinde yüksek aktiviteli (Ye ve ark., 2001) olduğu görülmüştür.

Rumen funguslarında bilinen selülozom kompleksinin

oluşmasında önemli rol oynayan dokerin domainlerin varlığı bildirilmiştir (Gilbert ve ark., 1992; Eberhardt ve ark., 2000; Nagy ve ark., 2007). Selülozom kompleksinin önemli bir parçası olan iskelet protein *P. equi*'de ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmiştir (Raghothama ve ark., 2001). Dokerin domainler polisakkaridazların iskelet proteine tutunmalarını sağlayarak selülozom komplekslerinin oluşmasını sağlamakta, eğer polisakkarit hidrolazları dokerin dizisi içermiyorsa kültür ortamına salgılanmakta ve enzim kompleksleri ile bir araya gelmemektedir (Freelove ve ark., 2001). Ayrıca rumen funguslarında bulunan çiftli dokerin domainin tekli dokerin domaine göre selülozom kompleksine daha sıkı bağlandığı bulunmuştur (Nagy ve ark., 2007). Rumen funguslarında farklı domainleri birbirinden ayıran ve domainlerin bağımsız etki göstermesini sağlarken enzimin katalitik aktivitesini oldukça arttıran "linker" bölgeler de mevcuttur (Liu ve ark., 2005). *Piromyces equi*'ye ait *cel5A* dört adet katalitik domain içeren ve selülaz, ksilanaz ve mannanaz kodlayan bir gen, *cel45A* ise tek katalitik domain ve üç adet dokerin içeren bir gen dir. *cel5A* her iki ucunda dokerin içerdiği, *cel45A* ise anaerobik organizmalar içerisinde aile 45'e ait olduğu bildirilen ilk genler olma özelliğindedir (Eberhardt ve ark., 2000). *Piromyces* sp. E2'nin üç adet intron içeren *cel9B* geninin ise glikozil hidrolaz 9 ailesine ait bir gen olduğu bildirilmiştir (Harhangi ve ark., 2003). Aynı fungusun içerdiği selülozom kompleksinde yer alan β -glikosidaz geninin (*cel3A*) ise aerobik funguslara benzerliğinden dolayı ökaryotik orijinli bir gen olduğu öngörülmüştür (Steenbakkers ve ark., 2003).

N. patriciarum'dan *E. coli*'ye klonlanan β -1,4-ksilanaz geninin kendi promotörü ile çalışmış olması *E. coli*'nin *N. patriciarum* promotörünü tanımladığını göstermektedir (Tamblyn Lee ve ark., 1993). *N. patriciarum*'un endoglukanaz aktivitesi içeren *xynC* geninde varlığı bildirilen CBD çıkarıldığında endoglukanaz aktivitesinde herhangi bir değişim olmamıştır (Liu ve ark., 1999). Rumen sıvısı içerisindeki mikroorganizmalardan doğrudan izole edilen genomik DNA'dan spesifik fungal primerler yardımıyla *xynR8* geni elde edilmiş, bu genin sekans analizi sonucunda *Orpinomyces* cinsine ait bir gen olabileceği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2005). *N. patriciarum*'dan klonlanan *xynS20* geni ise en yüksek homolojiyi böcek sindirim sisteminde yer alan mikroorganizmanın ksilanaz geni ile göstermiştir (Liu ve ark., 2008). *N. frontalis*'den izole edilen *xyn11A* ve *xyn11B* genlerinden dokerin domainler çıkarıldığında optimum sıcaklık ve termal stabilitenin arttığı

bildirilmiştir (Huang ve ark., 2005). *Neocallimastix* sp.'den izole edilen ve dokerin domain taşımayan Xyn2A enziminin çalıştığı optimum pH ve sıcaklık değerlerinin ise aynı fungusu ait ksilanaz enzimlerinin optimum pH ve sıcaklık değerleri ile aynı olduğu görülmüştür (Akyol ve ark., 2009). *Orpinomyces* sp. PC-2 en ayrıntılı çalışılan anaerobik funguslardan birisidir ve bu fungusu ait 10 selülaz geninin yanı sıra β -glukosidaz, ksilanaz, likenaz mannanaz, asetilksilan esteraz ve feruloil esteraz genleri de karakterize edilmiştir (Ljungdahl, 2008).

Anaerobik funguslar ökaryotik organizmalar olsa da DNA dizileme analizlerinin karşılaştırılması sonucunda anaerobik fungal ksilanaz ve selülaz genleri ile bakteriyel ksilanaz ve selülaz genleri arasında önemli homolojinin bulunması ayrıca anaerobik fungal ksilanaz ve selülaz genlerinin bazılarında intronlara sahip olmaması, bu funguslar ile rumen bakterileri arasında horizontal gen transferinin olabileceği görüşünü ortaya çıkartmıştır (Chen ve ark., 1997; Akyol ve ark., 2009). Rumendeki koşullar aynı veya farklı mikroorganizma grupları içerisinde gen transferini mümkün kılmaktadır. Rumendeki mikrobiyal popülasyonun çok büyük olması, rumen mikroorganizmalarının genetik çeşitliliğini arttırmaktadır. Bununla beraber rumenden besinlerin sindirimi sırasında çok büyük miktarlarda aerobik ve fakültatif anaerobik mikroorganizmalar rumenden geçmektedir. Rumende bol miktarda bulunan bakteriyofajlar bu mikroorganizmalardan gen transferini mümkün kılmaktadır (Flint, 1994).

Sonuç

Lignoselüloolitik enzimlerin biyoteknolojik uygulamalarına olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Selülazlar ve hemiselülazların gıda, içecek, hayvan yemi, tekstil, deterjan ve kâğıt gibi endüstrilerde kullanım olanakları araştırılmaktadır. Bakteri ve funguslara ait selülaz, hemiselülaz ve hatta selülozomların biyokimyası, genetiği ve protein yapı-fonksiyon ilişkisi üzerine yapılan araştırmalar biyoteknolojik açıdan enzimlerin endüstriyel potansiyelini ortaya koymaktadırlar. Selülaz ve hemiselülazların endüstride kullanımını tam olarak ortaya çıkartmak için temel ve uygulamalı alanlarda yapılacak çalışmalar önem arz etmektedir. Bu çerçevede lignoselüloolitik enzimlerin etkinliğinin artırılması için rekombinant DNA teknolojisi ve protein mühendisliği oldukça güçlü modern yaklaşımlar haline gelmiştir. Rekombinant DNA teknolojisi ile mikroorganizmaların lignoselüloolitik genlerinin özellikleri değiştirilerek yeni gen ürünleri elde edilebilmektedir. Protein mühendisliği

yöntemleri ile de enzimlerin hidroliz etkinlikleri, spesifiteleri veya stabiliteyi artırılarak endüstriyel açıdan daha kolay kullanılmasını ve depolanmasını sağlamaktadır.

Rumen mikrobiyal ekosistemi içerisinde ise endüstriyel uygulamalar için büyük bir potansiyeli olan ancak henüz tam olarak faydalanılmamış pek çok enzimin bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca rumen içerisinde mikroorganizmalar arasında sıklıkla gen transferleri, rekombinasyonlar ve duplikasyonlar meydana gelmektedir. Bu nedenle rumen mikroorganizmaları bitki hücre duvarlarının parçalanmasında farklı stratejiler göstermektedir. Rumen mikrobiyal ekosistemi içerisinde anaerobik funguslar ise anaerobik yaşam tarzlarının yanında etkin fibrolitik enzimlere sahip olmaları nedeniyle araştırmaların ilgi odağı olmuştur. Anaerobik funguslar yüksek spesifik aktiviteye sahip selüloz ve hemiselüloz enzimleri ile rumende bitki hücre duvarı polisakkaritlerinin kimyasal parçalanmasını sağlarken sahip oldukları rizomiselyumları ile bitki dokularının fiziksel olarak kırılmasını da sağlamaktadır. Ayrıca bu fungusların enzim genlerinin klonlanarak karakterize edilmesi ile gen organizasyonu bakımından dinamik bir sisteme sahip oldukları gösterilmiştir. Sonuç olarak anaerobik rumen funguslarının enzim ve genetik sistemleri üzerine yapılan araştırmalar bu mikroorganizmalara ait fibrolitik enzimlerin endüstriyel olarak kullanılan diğer fungusların enzimleri kadar ümit verici olduğunu göstermektedir. Bu enzimlerden faydalanmak adına anaerobik funguslara ait enzim genlerinin klonlanması, karakterizasyonu ve ifadesinin sağlanması için laboratuvarlarda yoğun çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

- Akin, D.E., Gordon, G.L.R., Hogan, J.P. 1983. Rumen bacterial and fungal degradation of *Digiteria pentzii* grown with or without sulfur. Appl. Environ. Microbiol. 46: 738-748.
- Akin, D.E. 1994. Ultrastructure of plant cell-walls degraded by anaerobic fungi. In: Mountfort D.O., Orpin C.G., Eds, Anaerobic Fungi, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 169-190.
- Akyol, I., Comlekcioglu, U., Kar, B., Ekinci, M.S., Ozkose, E. 2009. Cloning of a xylanase gene *xyn2A* from rumen fungus *Neocallimastix* sp. GMLF2 in *Escherichia coli* and its partial characterization. Biologia 64(3).
- Asao, N., Ushida, K., Kojima, Y. 1993. Proteolytic activity of rumen fungi belonging to genera *Neocallimastix* and *Piromyces*. Lett. Appl. Microbiol. 16: 247-250.
- Aylward, J.H., Gobius, K.S., Xue, G.P., Simpson, G.D., Dalrymple, B.P. 1999. The *Neocallimastix patriciarum* cellulase, CelD, contains three almost identical catalytic domains with high specific activities on Avicel. Enz. Microbiol Technol. 24: 609-614.
- Bata, J., Gerbi, C. 1997. Glycoside hydrolase production by an anaerobic fungus *Caecomyces communis*. Res. Microbiol. 148:263-369.
- Bauchop, T. 1986. Rumen anaerobic fungi and the utilization of fibrous feeds. Rev. Rural Sci. 6: 118-124.
- Borneman, W. S., Akin, D. E., Ljungdahl, L. G. 1989. Fermentation products and plant cell wall degrading enzymes produced by monocentric and polycentric ruminal fungi. Appl. Environ. Microbiol. 9: 285-296.
- Borneman, W.S., Hartley, R.D., Morrison, W.H., Akin, D.E., Ljungdahl, L.G. 1990. Feruloyl and p-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 345-351.
- Borneman, W.S., Ljungdahl, L.G., Hartley, R.D., Akin, D.E. 1991. Isolation and characterization of p-coumaroyl esterase from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2377-2344.
- Borneman, W.S., Ljungdahl, L.G., Hartley, R.D., Akin, D.E. 1992. Purification and partial characterization of two feruloyl esterases from anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3762-3766.
- Breton, A., Gaillard-Martinie, B., Gerbi, C., De Segura, B. G., Durand, R., Kherratia, B. 1995. Location by fluorescence microscopy of glycosidases and a xylanase in the anaerobic gut fungi *Caecomyces communis*, *Neocallimastix frontalis*, and *Piromyces rhizinifita*. Curr. Microbiol. 31: 224-227.
- Chen, H., Xinliang, L., Ljungdahl, L.G. 1994. Isolation and Properties of an Extracellular β -glucosidase from the polycentric rumen fungus *Orpinomyces* sp. Strain PC-2. Appl. Environ. Microbiol. 60(1): 64-70.
- Chen, H, Li, X L, Ljungdahl, L G. 1997. Sequencing of a 1,3-1,4-beta-D-glucanase (lichenase) from the anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2: properties of the enzyme expressed in *Escherichia coli* and evidence that the gene has a bacterial origin. J. Bacteriol. 179: 6028-6034.
- Comlekcioglu, U., Akyol, I., Ozkose, E., Kar, B., Ekinci, M.S. 2008. Carboxymethylcellulase production by the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix* sp. GMLF7. Annals of Microbiology 58 (1): 115-119.

- Çömlekçioğlu, U. 2009. Rumen funguslarının izolasyonu ve bu funguslara ait enzim genleri üzerine moleküler çalışmalar. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Doktora Tezi, s. 19.
- Denman S., Xue G.P., Patel B. 1996. Characterization of a *Neocallimastix patriciarum* cellulase cDNA (*celA*) homologous to *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1889-1896.
- Eberhardt, R.Y., Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P. 2000. Primary sequence and enzymic properties of two modular endoglucanases, Cel5A and Cel45A, from the anaerobic fungus *Piromyces equi*. Microbiology 146: 1999-2008.
- Ekinci, M.S., Ozkose, E., Akyol, I. 2006. Effects of sequential sub-culturing on the survival and enzyme activity of *Neocallimastix hurleyensis*. Turk J Biol. 30: 157-162.
- Fliegerova, K., Hodrova, B., Voigt, K. 2004. Classical and molecular approaches as a powerful tool for the characterization of rumen polycentric fungi. Folia Microbiol. 49(2): 157-164.
- Flint, H.J. 1994. Molecular genetics of obligate anaerobes from the rumen. FEMS Microbiol. Lett. 121: 259-268.
- Freelove, A.C.J., Bolam, D.N., White, P., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J. 2001. A Novel Carbohydrate-binding Protein Is a Component of the Plant Cell Wall-degrading Complex of *Piromyces equi*. J. Biological Chem. 276(46): 43010-43017.
- Gerbi, C., Bata, J., Breton, A., Prensier, G. 1996. Glycoside and polysaccharide hydrolase activity of the rumen anaerobic fungus *Caecomyces communis* at early and final stages of the developmental cycle. Curr. Microbiol. 32: 256-259.
- Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., Laurie, J.I., Orpin, C.G., Xue, G.P. 1992. Homologous catalytic domains in a rumen fungal xylanase: evidence for gene duplication and prokaryotic origin. Mol. Microbiol. 6: 2065-2072.
- Gomez De Segura, B., Fevre, M. 1993. Purification and Characterization of Two 1,4- β -Xylan Endohydrolases from the Rumen Fungus *Neocallimastix frontalis*. Appl. Environ. Microbiol. 59(11): 3654-3660.
- Gomez De Segura, B., Durand, R., Fevre, M. 1998. Multiplicity and expression of xylanases in the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. FEMS Microbiol. Lett. 164: 47-53.
- Gordon, G.L.R., Phillips, M.W. 1989. Degradation and utilization of cellulose and straw by three different anaerobic fungi from the ovine rumen. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1703-1710.
- Gordon, G.L.R., Phillips, M.W. 1992. Extracellular pectin lyase produced by *Neocallimastix sp.* LM1, a rumen anaerobic fungus. Lett. Appl. Microbiol. 15: 113-115.
- Grenet, E., Barry, P. 1988. Colonization of thick-walled plant tissues by anaerobic fungi. Anim. Fd. Sci. Technol. 19: 25-31.
- Harhangi, H.R., Akhmanova, A., Steenbakkers, P.J.M., Jetten, M.S.M., Drift, C., Huub Op Den Camp, H.J.M. 2003. Genomic DNA analysis of genes encoding (hemi-) cellulolytic enzymes of the anaerobic fungus *Piromyces sp.* E2. Gene 314: 73-80.
- Ho, Y.W., Wong, M.V.L., Abdullah, N., Kudo, H., Jalaludin, S. 1996. Fermentation activities of some new species of anaerobic rumen fungi from Malaysia. J. Gen. Microbiol. 42: 51-59.
- Hodrova, B., Kopečný, J., Kas, J. 1998. Cellulolytic enzymes of rumen anaerobic fungi *Orpinomyces joyonii*, and *Caecomyces communis*. Res. Microbiol. 149: 417-427.
- Huang, Y.H., Huang, C.T., Hseu, R.S. 2005. Effects of dockerin domains on *Neocallimastix frontalis* xylanases, FEMS Microbiology Letters 243: 455-460.
- Joblin, K.N. 1989. Physical disruption of plant fibre by rumen fungi of the *Sphaeromonas* group. The Roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion. Ed. J.V. Nolan, R.A. Leng, D.I. Demeyer. Penambul Books, Armidale, Australia: 259-260.
- Liu, J.H., Selinger, B.L., Tsai, C.F., Cheng, K.J. 1999. Characterization of a *Neocallimastix patriciarum* xylanase gene and its product. Can. J. Microbiol. 45: 970-974.
- Liu, J.R., Yu, B., Liu, S.H., Cheng, K.J., Chen, Y.C. 2005. Direct cloning of a xylanase gene from the mixed genomic DNA of rumen fungi and its expression in intestinal *Lactobacillus reuteri*. FEMS Microbiol. Lett. 251: 233-241.
- Liu, J.R., Duan, C.H., Zhao, X., Tzen, J.T.C., Cheng, K.J., Pai, C.K. 2008. Cloning of a rumen fungal xylanase gene and purification of the recombinant enzyme via artificial oil bodies. Appl. Microbiol. Biotechnol. 79: 225-233.
- Ljungdahl, L.G. 2008. The cellulase/hemicellulase system of the anaerobic fungus *Orpinomyces* PC-2 and aspects of its applied use. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1125: 308-321.
- Lowe, S.E., Theodorou, M.K., Trinci, A.P.J. 1987. Cellulases and xylanases of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose and xylan. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1216-1223.

- McAllister, T. A., Dong, Y., Yanke, L. J., Bae, H. D., Cheng, K.J., Costerton, J. W. 1993. Cereal grain digestion by selected strains of ruminal fungi. *Can. J. Microbiol.* 39: 367-376.
- McSweeney, C.S., Dulieu, A., Katayama, Y., Lowry, J.B. 1994. Solubilization of lignin by ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2985-2989.
- Michel, V., Fonty, G., Millet, L., Bonnemoy, F., Gouet, Ph. 1993. *In vitro* study of the proteolytic activity of rumen anaerobic fungi. *FEMS Microbiol Lett.* 110: 5-10.
- Mountfort, D.O., Asher, R.A. 1985. Production and regulation of cellulose by two strains of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1314-1322.
- Mountfort, D.O., Asher, R.A. 1988. Production of α -amylase by the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2293-2299.
- Mountfort, D.O., Asher, R.A. 1989. Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1016-1022.
- Nagy, T., Tunnicliffe, R.B., Higgins, L.D., Walters, C., Gilbert, H.J., Williamson, M.P. 2007. Characterization of a Double Dockerin from the Cellulosome of the Anaerobic Fungus *Piromyces equi*. *J. Mol. Biol.* 373: 612-622.
- Pearce, P.D., Bauchop, T. 1985. Glycosidases of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* grown on cellulosic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1265-1269.
- Phillips, M.W., Gordon, G.L.R. 1988. Sugar and polysaccharide fermentation by anaerobic fungi from Australia, Britain and New Zealand. *BioSystems* 21: 377-383.
- Raghothama, S., Eberhardt, R.Y., Simpson, P., Wigelsworth, D., White, P., Hazlewood, G.P., Nagy, T., Gilbert, H.J., Williamson, M.P. 2001. Characterization of a cellulosome dockerin domain from the anaerobic fungus *Piromyces equi*. *Nat. Structural Biol.* 8(9): 775-778.
- Saad, W.Z., Abdullah, N., Alimon, A.R., Wan, H.Y. 2008. Effects of phenolic monomers on the enzymes activities and volatile fatty acids production of *Neocallimastix frontalis* B9. *Anaerobe* 14: 118-122.
- Srinivasan, K., Murakami, M., Nakashimida, Y., Nishio, N. 2001. Efficient production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis*, in a repeated batch culture. *J. Biosci. Bioeng.* 91 (2): 153-158.
- Steenbakkers, P.J.M, Harhangi, H.R., Bosscher, M.W., Van Der Hooft, M.M.C., Keltjens, J.T., Van Der Drift, C., Vogels, G.D., Op Den Camp, H.J.M. 2003. β -Glucosidase in cellulosome of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 is a family 3 glycoside hydrolase. *Biochem. J.* 370: 963-970.
- Tamblyn Lee, J.M., Hu, Y., Zhu, H., Cheng, K.J., Krell, P.J., Forsberg, C.W. 1993. Cloning of a xylanase gene from the ruminal fungus *Neocallimastix patriciarum* 27 and its expression in *E. coli*. *Can. J. Microbiol.* 39: 134-139.
- Theodorou, M.K., Zhu, W.Y., Rickers, A., Nielsen, B.B. Gull, K., Trinci, A.P.J. 1996. Biochemistry and ecology of anaerobic fungi. *The Mycota: VI Human and Animal Relationship*. Ed. D.H. Howard, J.D. Miller. Springer-Verlag, New York, 265-295.
- Tripathi, V.M., Sehgal, J.P., Puniya, A.K., Singh, K. 2007. Hydrolytic activities of anaerobic fungi from wild blue bull (*Boselaphus tragocamelus*). *Anaerobe* 13(1): 36-39.
- Wallace, R.J., Joblin, K.N. 1985. Proteolytic activity of a rumen anaerobic fungus. *FEMS Microbiol Lett.* 29: 19-25.
- Webb, J., Theodorou, M.K. 1988. A rumen anaerobic fungus of the genus *Neocallimastix*: ultrastructure of the polyflagellate zoospore and young thallus. *BioSystems* 21: 393-401.
- Williams, A.G., Orpin, C.G. 1987a. Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative growth stages of the rumen fungi *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and an unidentified isolate grown on a range of carbohydrate substrates. *Can. J. Microbiol.* 33 (5): 427-434.
- Williams, A.G., Orpin, C.G. 1987b. Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi on a range of carbohydrate substrates. *Can. J. Microbiol.* 33: 418-426.
- Wood, T.M., Wilson, C.A., McCrea, S.I., Joblin, K.N. 1986. A highly active extracellular cellulase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 34: 37-40.
- Wubah, D.A., Kim, D. S.H. 1996. Chemoattraction of anaerobic ruminal fungi zoospores to selected phenolic acids. *Microbiological Res.* 151: 257-262.
- Xue, G.P., Gobius, K.S., Orpin, C.G. 1992. A novel polysaccharide hydrolase cDNA (*celD*) from *Neocallimastix patriciarum* encoding three multi-functional catalytic domains with high endoglucanase, cellobiohydrolase and xylanase activities. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2397-2403.
- Xue, G.P., Gobius, K.S., Orpin, C.G. 1993. Isolation of a multi-functional cellulase cDNA (*celE*) from the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Proceeding of the XVIIth International Grassland Congress*, p 1221-1222.

- Yanke, L.J., Dong, Y., McAllister, T.A., Bae, H., Cheng, K.J. 1993. Comparison of amylolytic and proteolytic activities of ruminal fungi grown on cereal grains. *Can. J. Microbiol.* 39: 817-820.
- Yanke, L.J., Selinger, L.B., Lynn, J.R., Cheng, K.J. 1996. Comparison of the influence of carbon substrates on the fibrolytic activities of anaerobic rumen fungi. *Anaerobe* 2: 373-378.
- Ye, X.Y., Ng, T.B., Cheng, K.J. 2001. Purification and characterization of a cellulase from the ruminal fungus *Orpinomyces joyonii* cloned in *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33: 87-94.