



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RUMEN BAKTERİ VE FUNGUSLARININ BAZI
ENZİMLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE
KARAKTERİSAZYONU**

HALİT YÜCEL

**DOKTORA TEZİ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2022

**T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RUMEN BAKTERİ VE FUNGUSLARININ BAZI
ENZİMLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE
KARAKTERİSAZYONU**

HALİT YÜCEL

**DOKTORA TEZİ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2022

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Halit YÜCEL

Bu çalışma Yüksek Öğretim Kurulu (100/2000 YÖK Doktora Bursu Programı) ve Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No:2022/2-14 D

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

RUMEN BAKTERİ VE FUNGUSLARININ BAZI ENZİMLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE KARAKTERİSAZYONU

(DOKTORA TEZİ)

HALİT YÜCEL

ÖZET

Rumen mikroorganizmalarının sahip olduğu glikozit hidrolaz (GH) enzimleri gıda, kağıt, yem ve tekstil gibi farklı endüstriyel alanlarda aktif olarak kullanılmaktadır. Özellikle ksilanaz, selüloz ve inülinaz enzimleri biyoteknolojik özelliği olan enzimler olarak bilinmektedir. Bu çalışmada rumen içerisinde yayılım gösteren anaerobik gut fungus (AGF) ve rumen bakterisinin sahip olduğu biyoteknolojik potansiyeli olan enzimlerin tespiti ve moleküler düzeyde incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Bunun için Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği (BİGEM) kültür koleksiyonunda bulunan *Neocallimastix* sp. (GMLF1) izolatının sahip olduğu ksilanaz enzim aktivitesi, *Orpinomyces* sp. (GMLF 19) izolatı için selüloz enzim aktivitesi ve *Selenomonas ruminantium* suşuna ait inülinaz enziminin aktivitesi incelenmiştir. Ayrıca GMLF 1 izolatına ait ksilanaz enzimini kodlayan ve GMLF 19 izolatına ait selüloz enzimini kodlayan gen bölgeleri uygun primerler aracılığıyla PZR yardımıyla çoğaltılmış ve ilgili genler pUC18 plazmit vektör kullanılarak *Escherichia coli* DH5α suşuna klonlanmıştır. Daha sonra klonlanan gen bölgelerinin oligonükleotid analizleri gerçekleştirilmiştir. Doğal ve elde edilen rekombinant suşlardan sentezlenen enzimler ile *Selenomonas ruminantium* suşuna ait rekombinant olmayan inülinaz enziminin optimum sıcaklık, optimum pH, termal stabilite, pH stabilite, çeşitli iyonların (Mn^{+2} , Co^{+2} , Ca^{+2} , Mg^{+2} ve Zn^{+2}) enzim üzerine etkisi belirlenmiştir. Ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesi için yapılan dizilim analizi sonrası ilgili genin 900 bp uzunluğunda, bir açık okuma çerçevesi (ORF) ile bir katalitik domaini olan bir bölge olarak tespit edilmiştir. Elde edilen ksilanaz enzimi GH 11 ailesine ait olup, izoelektrik noktası (pI) 7.78'dir. İlgili gen bölgesinden sentezlenen enzimin hücresel aktivitesi 4986,24 μ mol/dk/mg protein, optimum sıcaklığı 50°C ve pH'ı ise 6.5 olarak belirlenmiştir. Rekombinant enzime ait ince tabaka kromatografi analizi sonrası R_f (Retention factor) değeri *Neocallimastix* sp. izolatından sentezlenen ksilanaz enzimi ile kıyaslanmış ve son ürün R_f değerlerinin aynı olduğu gözlemlenmiştir. *Orpinomyces* sp. izolatından izole edilen selüloz enzimini kodlayan gen bölgesine ait oligonükleotid dizi analizine göre bu bölge 1.4 kb uzunluğundadır, bir ORF bölgesi ile bir karbonhidrat bağlama modülüne (KBM) ait domain bölgesine sahiptir. Enzimin GH 6 ailesine üye olduğu ve pI değerinin

8.72 olduğu tespit edilmiştir. İlgili gen bölgesinden sentezlenen enzimin hücrel aktivitesinin 589,64 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein, optimum sıcaklık değerinin 50°C ve optimum pH değerinin ise 6.0 olduğu tespit edilmiştir. Rekombinant suş tarafından salgılanan selülaz enzimin 40°C’de termal stabilitesini koruduğu ve 4.0-8.5 pH değerleri arasında % 50.7 oranında pH stabilitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Rekombinant enzimin TLC analizi sonrası R_f değeri *Orpinomyces* sp. GMLF 19 izolatu için tespit edilen R_f değerine benzer çıkmıştır. *Selenomonas ruminantium* suşuna ait süpernatant inülinaz enzim aktivitesi 8.82 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein, optimum sıcaklığın 40°C ve pH’ın 5.5 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca inülinaz enzimin pH 3.0-9.0 değerleri arasındaki pH stabilitesi %50.90 oranında ve 40°C’de termal stabiliteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. *Selenomonas ruminantium* suşuna ait olan inülinaz enziminin inülin substratının hidrolizini gerçekleştirdiği yapılan TLC analizi ile belirlenmiştir. Ayrıca çalışılan bütün enzimler üzerinde Mn^{+2} , Co^{+2} , Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının 1mM’lık konsantrasyon uygulamalarının indükleyici olduğu, Zn^{+2} iyonunun ise aynı konsantrasyonda inhibitör etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: AGF, Biyoteknoloji, İnülinaz, Ksilanaz, Rumen mikroorganizmaları, Selülaz

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Zootehni Ana Bilim Dalı, 12 / 2022

Danışman : Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ

Sayfa sayısı : 181

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SOME ENZYMES IN RUMEN
BACTERIA AND FUNGI**

(PhD. THESIS)

HALİT YÜCEL

ABSTRACT

The glycoside hydrolase (GH) enzymes possessed by rumen microorganisms are actively used in different industrial areas such as food, paper/pulp, feed and textile. Especially xylanase, cellulase and inulinase hold a great potential as to be used in biotechnological application. In this study, the determination of the biotechnological potential enzymes of some anaerobic gut fungi (AGF) and rumen bacterium inhabiting in the rumen and their analysis at the molecular level were carried out. For this purpose, xylanase enzyme activity of *Neocallimastix* sp. (GMLF1), cellulase enzyme activity for *Orpinomyces* sp. (GMLF 19), and inulinase enzyme activity of *Selenomonas ruminantium* were investigated. In addition, the xylanase and cellulase enzyme encoding gene region of the isolate GMLF 1 and isolation GMLF 19 were amplified respectively by PCR using appropriate primer pairs. The relevant genes were cloned into *E.coli* DH5 α by strain using the pUC18 plasmid as vector. Then, the cloned gene regions were sequence. Optimum temperature, optimum pH, thermal stability, pH stability, and the effect of various ions (Mn⁺², Co⁺², Ca⁺², Mg⁺² and Zn⁺²) on the native and recombinant enzymes of GMLF1 and GMLF 19 and native inulinase enzyme of *Selenomonas ruminantium* were determined. The sequence analysis showed that the gene region encoding the xylanase enzyme activity was identified as a 900 bp long region with an open reading frame (ORF) and a catalytic domain. The obtained xylanase enzyme thought to be belongs to the GH 11 enzyme family and has an isoelectric point (pI) of 7.78. The cellular activity of the xylanase enzyme was determined as 4986.24 μ mol/min/mg protein, the optimum temperature was 50°C and the pH was 6.5. After thin layer chromatography (TLC) analysis of the recombinant enzyme, the R_f (Retention factor) value was compared with the xylanase enzyme synthesized from *Neocallimastix* sp. GMLF1 and it was observed that the final product R_f values were the same. According to sequence analysis of the gene region encoding the cellulase enzyme of *Orpinomyces* sp. GMLF19 the coding region is about 1.4 kb long, and has an ORF region and a carbohydrate binding module (CBM) domain region. The obtained cellulase enzyme thought a member of the family GH 6, its pI value was found to be 8.72. It was determined that the cellular activity of the enzyme was 589.64 μ mol/min/mg protein, the optimum

temperature was 50°C and the optimum pH was 6.0. It was determined that the cellulase enzyme secreted by the recombinant strain maintained its thermal stability at 40°C and pH stability of 50.7 % between 4.0-8.5 pH values. According to TLC analysis the *R_f* value of the recombinant enzyme, was similar to the *R_f* value of the *Orpinomyces* sp. GMLF19. It was determined that the inulinase supernatant of *Selenomonas ruminantium* was 8.82 µmol/min/mg protein, the optimum temperature was 40°C and the pH was 5.5. In addition, the pH stability of inulinase enzyme between pH 3.0-9.0 values is 50.90 % and has thermal stability at 40°C. The TLC analysis also proved that the inulinase enzyme of the *Selenomonas ruminantium* hydrolyse of the inulin substrate. In addition, it has been observed that 1mM concentrations of Mn⁺², Co⁺², Ca⁺² and Mg⁺² ions have an inducing effect on all the enzymes studied, while Zn⁺² ions have an inhibitory effect at the same concentration.

Keywords: AGF, Biotechnology, Cellulase, Inulinase, Rumen microorganism, Xylanase

University of Kahramanmaraş Sütçü İmam
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Animal Science 12/2022

Supervisor : Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ

Page number : 181

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında göstermiş oldukları her türlü yardım, rehberlik ve çok değerli katkılarından dolayı başta danışmanım Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ olmak üzere katkı, eleştiri ve yardımlarını esirgemeyen bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren Prof. Dr. Emin ÖZKÖSE ve Dr. Öğr. Üyesi Sabahattin CÖMERTPAY hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmam boyunca BİGEM laboratuvarında desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Altuğ KARAMAN, Arş. Gör. Kübra EKİNCİ, Dr. Öğr. Üyesi Tuğba ERDEM KARABEKMEZ, Şerife Nur AKYAR YAVAŞ ve Arş. Gör. Tuğçe TURGUT ‘a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi olarak beni destekleyen aileme teşekkür ederim. Özellikle bu süreçte devamlı yanımda olan ve en büyük destekçim olan eşim Özen ARSLAN YÜCEL ve oğullarım Kuzey Ata YÜCEL ile Ayaz Ekin YÜCEL’e sonsuz teşekkür ederim.

Halit YÜCEL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	I
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
ÇİZELGELER DİZİNİ	XV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XVII
1. GİRİŞ	1
1.1. Rumen ve Rumen Mikrobiyomu	1
1.2. Rumen Mikrobiyal Ekosistemi	2
1.3. Bitki Hücre Duvarının Yapısı	5
1.4. Bitki Hücre Duvarının Katabolizması	11
1.5. Bitki Hücre Duvarının Katabolizmasında Anaerobik Gut Fungus ve Bakterilerin Rolü	12
1.6. Anaerobik Gut Funguslar	13
1.7. Anerobik Gut Funguslarda Üreme ve Gelişme	17
1.8. Anerobik Gut Fungusların Ruminal Mikrobiyom ile Etkileşimi	19
1.8.1. Anerobik gut fungus ile metanojenik arke etkileşimi	19
1.8.2. Anerobik gut fungus ile rumen bakterileri arasındaki etkileşim	20
1.8.3. Anerobik gut fungus ile rumen protozoaları arasındaki etkileşim	21
1.9. Anaerobik Gut Fungusların Enzimatik Aktiviteleri	21
1.9.1. <i>Orpinomyces</i> cinslerine ait enzim özellikleri ve selülaz aktivitesi	25
1.9.2. <i>Neocallimastix</i> cinslerinin enzim özellikleri ve ksilanaz aktivitesi	28
1.10. Rumen Bakterilerinin Tanımlanması	31
1.11. Rumen Bakterilerinin Enzimatik Sistemleri	32
1.12. Rumen Bakterileri ve Glikozit Hidrolaz Enzimleri	34
1.13. Mikrobiyal İnülinaz	36
1.13.1. İnülin	36
1.13.2. İnülinaz	39
1.13.3. Bakteriyel inülinazlar	41
1.13.4. Endüstriyel inülinaz ve kullanım alanları	42
1.14. Çalışmanın Kapsamı ve Önemi	43
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	44
2.1. Anaerobik Gut Fungus ve Enzimleri	44
2.2. Rumen Bakterileri ve Enzimleri	50

3. MATERYAL VE METOT	55
3.1. Materyal	55
3.1.1. Kimyasallar	55
3.1.2. Kimyasal ve çözelti miktarları	55
3.1.3. Alet ve ekipmalar	56
3.1.4. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve plazmitler	57
3.1.5. Anaerobik basal besiyeri içeriği	57
3.2. Metot.....	58
3.2.1. Anaerobik gut fungus izolatlarının ve rumen bakteri suşununaktifleştirilmesi	58
3.2.2. Rumen sıvısının hazırlanması	59
3.2.3. Anaerobik basal besiyerinin hazırlanması.....	59
3.2.4. Antibiyotikler	60
3.2.5. Anaerobik gut funguslardan kromozomal DNAizolasyonu.....	60
3.2.6. Oligonükleotit primerler.....	62
3.2.6.1. Ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesine ait oligonükleotit primerler	62
3.2.6.2. Selüloz enzimini kodlayan gen bölgesine ait oligonükleotit primerler	64
3.2.7. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	65
3.2.7.1. Ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesi için PZR koşulları.....	67
3.2.7.2. Selüloz enzimini kodlayan gen bölgesi için PZR koşulları	67
3.2.8. Agaroz Jel elektroforez	67
3.2.9. Restriksiyon endonükleazlar	68
3.2.10. Ligasyon	69
3.2.11. pUC18 klonlama vektörü ve ligasyon.....	69
3.2.12. Plazmit DNA izolasyonu.....	71
3.2.13. Kalsiyum klorür metodu ve transformasyon.....	72
3.2.14. Rekombinant DNA içeren koloni seçimi	72
3.3. Enzim Analizleri	73
3.3.1. Protein analizi.....	74
3.3.2. Anaerobik gut fungus izolatlarında ksilanaz üretimi	74
3.3.3. Anaerobik gut fungus izolatlarında selüloz üretimi	75
3.3.4. Rumen bakteriyel suşlarında inülinaz üretimi.....	75
3.3.5. Enzim ekstraktlarının hazırlanması.....	76
3.3.6. Enzim aktivitelerinin belirlenmesi	76
3.3.7. Optimum pH değerinin belirlenmesi.....	76
3.3.8. Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi	77
3.3.9. pH stabilitesinin belirlenmesi.....	77
3.3.10. Termal stabilitenin belirlenmesi.....	77
3.3.11. Çeşitli kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	77
3.3.12. Enzim aktivitesi sonucu oluşan ürünlerin ince tabaka kromatografisi ile belirlenmesi	78
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	79
4.1. Anaerobik gut fungusların aktifleştirilmesi ve kültüre alınması	79
4.2. <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait Ksilanaz Enzimi Üretimi ve Karakterizasyonu.....	80
4.2.1. <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait ksilanaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi	81
4.2.2. <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait ksilanaz enziminin termal stabilitesinin belirlenmesi	82

4.2.3. <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait ksilanaz enziminin optimum pH'sının belirlenmesi	83
4.2.4. <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait ksilanaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi	84
4.2.5. <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait ksilanaz enzim aktivitesi sonucu oluşan ürünlerin ince tabaka kromatografi ile tespiti	85
4.3. Anaerobik Gut Funguslardan Kromozomal DNA İzolasyonu	87
4.4. <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait Ksilanazenzimini Kodlayan Gen Bölgesinin Klonlanması ve Karakterizasyonu	88
4.4.1. <i>Neocallimastix</i> sp. İzolatlarında ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesinin tespiti	88
4.4.2. <i>Neocallimastix</i> sp. izolatına ait ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesinin <i>E.coli</i> 'ye klonlanması.....	89
4.4.3. Klonlanan ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesineait nükleotit ve aminoasit dizisi	92
4.4.4. <i>E.coli/Xyn</i> rekombinant suşuna ait ksilanaz enzim üretimi ve karakterizasyonu.....	96
4.4.5. <i>E.coli/Xyn</i> rekombinant suşuna ait ksilanaz enziminin optimum sıcaklığınınbelirlenmesi	97
4.4.6. <i>E.coli/Xyn</i> rekombinant suşuna ait ksilanaz enziminin termal stabilitesinin belirlenmesi	98
4.4.7. <i>E.coli/Xyn</i> rekombinant suşuna ait ksilanaz enziminin optimum pH'ın belirlenmesi	100
4.4.8. <i>E.coli/Xyn</i> rekombinant suşuna ait ksilanaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi	101
4.4.9. <i>E.coli/Xyn</i> rekombinant suşuna ait ksilanaz enzimiüzerine etki eden iyonlar	102
4.4.10. <i>E.coli/Xyn</i> rekombinant suşundan salgılanan ksilanaz enziminin aktivitesi sonucu oluşan ürünlerin ince tabaka kromatografi ile tespiti.....	103
4.5. <i>Orpinomyces</i> sp. ait Selülaz Enzimi Üretimi ve Karakterizasyonu.....	104
4.5.1. <i>Orpinomyces</i> sp.'ye ait selülaz enzimin optimum sıcaklığının belirlenmesi.....	104
4.5.2. <i>Orpinomyces</i> sp.'ye ait selülaz enzimin termal stabilitesinin belirlenmesi	105
4.5.3. <i>Orpinomyces</i> sp.'ye ait selülaz enzimin optimum pH'ın belirlenmesi	106
4.5.4. <i>Orpinomyces</i> sp.'ye ait selülaz enzimin pH stabilitesinin belirlenmesi.....	106
4.5.5. <i>Orpinomyces</i> sp.'ye ait selülaz enzim aktivitesi sonucu oluşan ürünlerin ince tabaka kromatografi ile tespiti.....	107
4.6. <i>Orpinomyces</i> sp.'ye ait Selülaz Enzimini Kodlayan Geninin Klonlanması ve Karakterizasyonu	107
4.6.1. <i>Orpinomyces</i> sp. izolatlarında selülazenzimini kodlayan gen bölgesinintespiti	108
4.6.2. <i>Orpinomyces</i> sp.'ye ait olan selülaz enzimini kodlayangen bölgesinin <i>E.coli</i> 'ye klonlanması.....	109
4.6.3. Klonlanan selülaz enzimini kodlayan gen bölgesine ait nükleotit ve aminoasit dizisi	111
4.6.4. <i>E.coli/Cel</i> rekombinant suşuna ait selülaz enzim üretimi ve karakterizasyonu	116
4.6.5. <i>E.coli/Cel</i> rekombinant suşuna ait selülaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi	117
4.6.6. <i>E.coli/Cel</i> rekombinant suşuna ait selülaz enziminin termal stabilitesinin belirlenmesi	118

4.6.7. <i>E.coli</i> /Cel rekombinant suşuna ait selüloz enziminin optimum pH'ın belirlenmesi	119
4.6.8. <i>E.coli</i> /Cel rekombinant suşuna ait selüloz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi	120
4.6.9. <i>E.coli</i> /Cel rekombinant suşuna ait selüloz enzimi üzerine etki eden iyonlar	121
4.6.10. <i>E.coli</i> /Cel rekombinant suşuna ait selüloz enzimi aktivitesi sonucu oluşan ürünlerin ince tabaka kromatografi ile tespiti	122
4.7. Rumen Bakterilerinin Aktifleştirilmesi ve Kültüre Alınması	123
4.7.1. <i>Selenomonas ruminantium</i> ve özellikleri	124
4.7.2. <i>Selenomonas ruminantium</i> ' ait inülinaz enzimi üretimi ve karakterizasyonu	124
4.7.3. <i>Selenomonas ruminantium</i> 'a ait inülinaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi	125
4.7.4. <i>Selenomonas ruminantium</i> 'a ait inülinaz enziminin termal stabilitesinin belirlenmesi	126
4.7.5. <i>Selenomonas ruminantium</i> 'a ait inülinaz enziminin optimum pH'ın belirlenmesi	127
4.7.6. <i>Selenomonas ruminantium</i> 'a ait inülinaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi	128
4.7.8. <i>Selenomonas ruminantium</i> 'a ait inülinaz enzime etki eden iyonlar.....	129
4.7.9. <i>Selenomonas ruminantium</i> 'a ait inülinaz aktivitesi sonucu oluşan ürünlerin ince tabaka kromatografi ile belirlenmesi	130
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	132
5.1. Sonuçlar	132
5.2. Öneri	133
KAYNAKLAR.....	134
ÖZ GEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Rumende yayılış gösteren mikroorganizmaların bulunma oranı	3
Şekil 1.2. Bitki hücre duvarının (çeperinin) yapısı	6
Şekil 1.3. Yüksek bitkilerin birincil hücre duvarlarında bulunan glikozil kalıntıları.....	7
Şekil 1.4. Ksiloz ve glukuronik asit bulunduranhemiselülozun yapısı	8
Şekil 1.5. Ksilan yapısı	9
Şekil 1.6. Selülozun yapısı	10
Şekil 1.7. Bazı bitkilerdeki selüloz içeriği.....	10
Şekil 1.8. Selüloz molekülünün hidrolizi	11
Şekil 1.9. Hemiselüloz yapının hidrolizi (ksilan esas olarak alınmıştır)	12
Şekil 1.10. Anerobik Gut Funguslar (AGF) rizoid yapısı bakımından dallanmış (filamentli) (monosentrik,polisentrik) ve küresel (monosentrik, polisentrik) olmak üzere ikiye ayrıldığı şematize edilerek günümüzde bağlı olduğu sistematik taksonu gösterilmiştir.....	14
Şekil 1.11. Anaerobik gut fungus (AGF)'un rumen içerisindeki yaşam döngüsü ve ruminant bir herbivorun mide bölmeleri gösterilmiştir	18
Şekil 1.12. Anaerobik gut fungus (AGF) ve metananojenik arke arasındaki simbiyotik ilişki şematize edilmiştir	20
Şekil 1.13. <i>Orpinomyces</i> cinslerinin sahip olduğu enzim grupları.....	26
Şekil 1.14. Selülozun hidrolizinde görevli olan selülazların takımlar halinde etki mekanizması şematize edilmiştir.....	27
Şekil 1.15. Neocallimastix cinslerinin sahip olduğu karbonhidart aktif enzim sistemi	29
Şekil 1.16. XynA'nın modüler yapısı	30
Şekil 1.17. İnülin yapısı. a. Sadece fruktosil kalıntıları içeren inülin molekülü. b. Zincirin sonunda bir glikoz birimi içeren inülin molekülü. c. İnülin genel kimyasal yapısı.....	37
Şekil 1.18. İnülin içeren bazı bitkisel örnekler ve inülin oranları	38
Şekil 1.19. Ruminantlarda prebiyotik tüketiminin etkisine ilişkin şematik diyagram	39
Şekil 1.20. İnülinin inülinazlar tarafından parçalanma modeli	40

Şekil 3.1. Rumen fungus kültür koleksiyonu sıvı azot yardımı ile muhafazası (A), kültür koleksiyonundan alınan gmlf kodu ile muhafaza edilen anarobik gut fungusun CO2 gazı ile aktiveleştirme basamağı.....	58
Şekil 3.2. Rumen mikroorganizmalarının <i>in vitro</i> koşullarda yetiştirildiği basal besiyerinin şematik hazırlanışı	60
Şekil 3.3.AGF'larda kromozomal DNA izolasyonu için Doyle ve Doyle (1987) tarafından geliştirilen CTAB (hexa-decyltrimethylammonium bromide) metodunun şematik gösterimi.....	61
Şekil 3.4. <i>Neocallimastix</i> spp. rumen funguslarına ait ksilanaz enzimini kodlayan xynA gen bölgesinin sekans bilgileri ve oligonükleotit primerler	63
Şekil 3.5. <i>Orpinomyces</i> spp. ve <i>Anaeromyces</i> sp. rumen funguslarına ait selüloz enzimini kodlayancelAgen bölgesi sekans bilgileri ve oligonükleotit primerler	65
Şekil 3.6. PZR basamaklarının gösterimi	66
Şekil 3.7. pUC 18 plazmit DNA gen haritası	70
Şekil 3.8. pUC18 vektör (plazmit) DNA ile hedef gen bölgesinin ligasyon basamağı.....	71
Şekil 3.9. Beyaz/Mavi Seçim yöntemine göre rekombinant olmayan kolonilerin X-Gal hidroliz sonucu mavi renk vermesi şematize edilmiştir	73
Şekil 3.10. Farklı BSA konstrasyonu sonucu elde edilen protein standardı kalibrasyon denklemleri ve grafiği	74
Şekil 3.11. Lugol-İyot solüsyon metodu ile inülinaz aktivitesi tespiti. Zon oluşumuna bağlı olarak inülinaz – (A) ve inülinaz + (B).....	75
Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan <i>Neocallimastix</i> sp. (A) ve <i>Orpinomyces</i> sp. (B) izolatlarına ait mikroskopik görüntü (S:Spor kesesi, RM: Rizomiselyum).....	79
Şekil 4.2. <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait olan ksilanaz enziminin farklı sıcaklıklarda gösterdiği rölatif aktive.....	82
Şekil 4.3. <i>Neocallimastix</i> sp.'yeait olan ksilanaz enziminin termal stabilitesi.....	83
Şekil 4.4. <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait olan ksilanaz enziminin farklı pH aralığında gösterdiği rölatif aktive.....	84
Şekil 4.5. <i>Neocallimastix</i> sp.'yeait olan ksilanaz enziminin pH stabilitesi	85
Şekil 4.6. <i>Neocallimastix</i> sp. izolatına ait ince tabaka kromagram (TLC) görüntüsü.....	86
Şekil 4.7. CTAB metodu sonucu elde edilen fungal kromozomal DNA'larına aitagaroz jel görüntüsü. <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait genomik DNA'lar 1'den 5'a kadar sırası ile GMLF 7-4-3-2-1. <i>Orpinomyces</i> sp.'ye ait genomik DNA'lar ise 6'dan 11'e kadar sırası ile GMLF 16-19-21-17-6-5.	87

Şekil 4.8. <i>Neocallimastix</i> sp. izolatlarında xynA primerleri ile gerçekleştirilen PZR. M:100bp 1:GMLF1 2:GMLF2, 3:GMLF3, 4: GMLF:4.....	88
Şekil 4.9. PZR işlemi sonucu elde edilen ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesinin pUC18 plazmit DNA'ya ligasyonu (M:100bç, a-b:pNeoXyl, c-d:PZR ile amplifiye edilen ksilanaz enzimi kodlayan DNA parçası)	90
Şekil 4.10. 'Beyaz/Mavi Seçim' yöntemi sonucu rekombinant bireylerin seleksiyonu. Beyaz ve Mavi renkli kolonilerin oluşturduğu petride mavi renkli koloniler rekombinat olmayan, beyaz renkli koloniler ise rekombinat suşları göstermektedir (A), rekombinant beyaz kolonilerin çizme yöntemi ile gösterimi (B).....	91
Şekil 4.11. Klonlama işlemi sonunda elde edilen rekombinant plazmit (a-b-e-f), Ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesi (c), pUC18 plazmit vektörü(d). M:100bç.....	91
Şekil 4.12. XynA primerleri ile gerçekleştirilen PZR agaroz jel görüntüsü. pUC18 plazmiti (a), <i>E.coli</i> /Xyn'dan izole edilen pNeoXyl plazmiti (b). M:1kb.....	92
Şekil 4.13. <i>Neocallimastix</i> sp. izolatından klonlanan ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesi sekans ve aminoasit dizilimi	93
Şekil 4.14. <i>Neocallimastix</i> sp. izolatından klonlanan gen bölgesinden sentezlenen ksilanaz enziminin üç boyutlu gösterimi	94
Şekil 4.15. Ksilanaz enzimi kodlayan gen bölgesi ile referans fungal ksilanaz gen bölgelerine ait aminoasit homolojisi.....	95
Şekil 4.16. NCBI veri tabanına kayıtlı olan ksilanaz enzimi sentezleyen gen bölgelerinin GMLF1 izolatına ait (GMLF1-BİGEM) ksilanaz enzimi sentezleyen gen bölgesi ile birlikte filogenetik analizi. Elde edilen filogenetik ağaç MEGA programı yardımıyla Bootstrap parametresi kullanılarak Neighbour Joining yöntemi ve iTOL (https://itol.embl.de/) veri tabanı kullanılarak elde edilmiştir.	95
Şekil 4.17. <i>E.coli</i> /Xyn rekombinant suşuna ait ksilanazenziminin farklı sıcaklıklarda gösterdiği rölatif aktive yüzdesi.....	97
Şekil 4.18. <i>E.coli</i> /Xyn rekombinant suşundan salgılanan ksilanaz enziminin termal stabilitesi.....	99
Şekil 4.19. <i>E.coli</i> /Xyn rekombinant suşundan salgılanan ksilanaz enziminin farklı pH aralığında gösterdiği rölatif aktive.....	100
Şekil 4.20. <i>E.coli</i> /Xyn rekombinant suşundan salgılanan ksilanaz enziminin pH stabilitesi	101
Şekil 4.21. Ksilanaz enzim aktivitesinin ince tabaka kromatogram görüntüsü1-4:Ksilan standart,2:Ksiloz standart,3:Ksilobiyoz standart,5: <i>Neocallimastix</i> sp. enzim ekstratı,6-7: <i>E.coli</i> /Xyn rekombinant suşuna ait ekstrat,a:Örneğin aldığı mesafe,b:Çözücü madde mesafesi	103

Şekil 4.22. <i>Orpinomyces</i> sp.'ye ait selülaaz enziminin farklı sıcaklıklarda gösterdiği rölative aktive yüzdesi	105
Şekil 4.23. <i>Orpinomyces</i> sp.'ye ait selülaaz enzimin termal stabilitesi	105
Şekil 4.24. <i>Orpinomyces</i> sp.'ye ait selülaaz enzimin farklı pH aralığında gösterdiği rölative aktive yüzdesi	106
Şekil 4.25. <i>Orpinomyces</i> sp.'ye ait olan selülaaz enziminin pH stabilitesi.....	107
Şekil 4.26. <i>Orpinomyces</i> sp.'ye ait selülaaz enzimini kodlayan gen bölgesinin PZR amplifikasyonu M:100bp 1:GMLF19 2:GMLF16, 3:GMLF5	108
Şekil 4.27. PZR sonucu elde edilen selülaaz enzimini kodlayan gen bölgesinin plazmit vektöre ligasyonu.....	109
Şekil 4.28. <i>E.coli/Cel</i> rekombinant suşun selülaaz aktivitesinin kongo kırmızısı ile gösterilmesi.....	110
Şekil 4.29. pOrpCel'e ait PZR amplifikasyondan elde edilen selülaaz enzimini kodlayan gen bölgesi (a), pUC18 plazmit vektörü (b) vepOrpCel (c-d), M:1kb.....	111
Şekil 4.30. <i>Orpinomyces</i> sp. izolatından klonlanan selülaaz enzimini kodlayan gen bölgesi sekans ve aminoasit dizilimi	112
Şekil 4.31. <i>Orpinomyces</i> sp. izolatından klonlanan selülaaz enzimini kodlayan gen bölgesine ait sekans diziliminin NCBI blast sonucu	113
Şekil 4.32. <i>Orpinomyces</i> sp. izolatından klonlanan gen bölgesinden sentezlenen selülaaz enziminin üç boyutlu gösterimi	114
Şekil 4.33. <i>Orpinomyces</i> sp. izolatından klonlanan selülaaz enzimi kodlayan gen bölgesi ile referans fungal selülaaz gen bölgelerine ait aminoasit homolojisi.....	115
Şekil 4.34. NCBI veri tabanına kayıtlı olan selülaaz enzimi sentezleyen gen bölgelerinin GMLF19 izolatına ait (GMLF19-BİGEM) selülaaz enzimi sentezleyen gen bölgesi ile birlikte filogenetik analizi. Elde edilen filogenetik ağaç MEGA programı yardımıyla Bootstrap parametresi kullanılarak Neighbour Joining yöntemi ve iTOL (https://itol.embl.de/) veri tabanı kullanılarak elde edilmiştir.	116
Şekil 4.35. <i>E.coli/Cel</i> rekombinant suşuna ait selülaaz enziminin farklı sıcaklıklarda gösterdiği rölative aktivite yüzdesi	117
Şekil 4.36. <i>E.coli/Cel</i> rekombinant suşundan salgılanan selülaaz enziminin termal stabilitesi	118
Şekil 4.37. <i>E.coli/Cel</i> rekombinant suşundan salgılanan selülaaz enziminin farklı pH aralığında gösterdiği rölative aktive.....	120
Şekil 4.38. <i>E.coli/Cel</i> rekombinant suşundan salgılanan selülaaz enziminin pH stabilitesi	121

Şekil 4.39. <i>Orpinomyces</i> sp. izolatu ve <i>E.coli/Cel</i> rekombinant suşuna ait ince tabaka kromatogram görüntüsü. <i>E.coli/Cel</i> rekombinant ekstratu (5-7), <i>Orpinomyces</i> sp. izolatına ait ekstrat (6), Standart solüsyonlar selüloz (2), sellotrioz (3), sellobiyoz (2), sellobiyoz (a,b,c).....	122
Şekil 4.40. Rumen bakterilerinin <i>in vitro</i> koşullarda üretim süreci.....	123
Şekil 4.41. <i>Selenomonas ruminantium</i> 'a ait süpernatant agar plaka testi	124
Şekil 4.42. <i>S.ruminantium</i> 'a ait inülinaz enziminin optimum sıcaklık durumu	126
Şekil 4.43. <i>S.ruminantium</i> 'a ait inülinaz enziminin termal stabilitesi.....	127
Şekil 4.44. <i>Selenomonas ruminantium</i> 'a ait inülinaz enzimi optimum pH aktivitesi	127
Şekil 4.45. <i>Selenomonas ruminantium</i> 'a ait inülinaz enziminin pH stabilitesi	129
Şekil 4.46. <i>S.ruminantium</i> 'a ait inülinaz enzim aktivitesi ince tabaka kromatogram görüntüsü. i: İnülin, 1: Fruktoz standartı, 2-3: <i>S.ruminantium</i> 'a ait ürün, a: Çözünen madde mesafe, b: Çözücü madde mesafe	131

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Birincil hücre duvarının yapısında bulunan bazı karbonhidratlar	8
Çizelge 1.2. Anaerobik gut fungus (AGF)'ların taksonomik basamak kriterleri	15
Çizelge 1.3. Günümüze kadar cins düzeyinde tanımlanmış anaerobik gut fungusların (n=20) taksonomik basamaktaki konumu ve isimleri.....	17
Çizelge 1.4. Anaerobik Gut Fungus (AGF)'ların substrat olarak kullanabildiği bazı karbonhidrat çeşitleri, bu karbonhidratlar üzerinde etkili olduğu bilinen enzimler ve AGF örnekleri	23
Çizelge 1.5. Glikozit hidrolaz enzim ailesi 6'ait selüloz enzim aktivitesi gösteren bazı <i>Orpinomyces</i> sp. tür isimleri, sahip olduğu selüloz ismi, Uniprot ID ve referans bilgileri.....	28
Çizelge 1.6. Glikozit hidrolaz 11 ailesi ait ksilanaz enzim aktivitesi gösteren bazı <i>Neocallimastix</i> sp. tür isimleri, sahip olduğu ksilanaz ismi, Uniprot ID ve referans bilgileri.....	30
Çizelge 1.7. Bazı rumen bakterilerinin sahip olduğu degradatif enzim özellikleri	32
Çizelge 1.8. Bitkisel materyalin hidrolizde görev alan ve glikozit hidrolaz enzim aktivitesi gösteren bazı rumen bakteri isimleri, sahip olduğu enzim ismi, Uniprot ID ve referans bilgileri.....	35
Çizelge 1.9. Rumende bulunan baskın (predominant) selülotik ve ikincil (sekonder) selülotik bakteri türlerinin karşılaştırılması	35
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal ve çözeltiler ile kullanım miktarları	55
Çizelge 3.2. Kullanılan alet ve ekipmanlar.....	56
Çizelge 3.3. Rekombinant plazmit ve bakteri suşlarının özellikleri.....	57
Çizelge 3.4. Rumen mikroorganizmalarının in vitro koşullar altında optimum düzeyde gelişimini gösterebilmesi için gerekli olan basal besiyeri	58
Çizelge 3.5. <i>Neocalimastix</i> sp.'ye ait ksilanaz gen bölgesinin tespiti için tasarlanan oligonükleotit primerler	64
Çizelge 3.6. <i>Orpinomyces</i> sp.'ye ait olan selüloz enzimini kodlayan gen bölgesinin tespiti için tasarlanan oligonükleotit primerler.....	65
Çizelge 3.7. Çalışmada kullanılan gen bölgelerinin PZR ile amplifikasyonunda kullanılan kimyasallar ve miktarları	66

Çizelge 3.8. <i>Neocallimastix</i> sp.'ait ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesinin tespiti için PZR koşulları	67
Çizelge 3.9. <i>Orpinomyces</i> sp. izolatlarına ait selülaz enzimi kodlayan gen bölgesinin tespiti için PZR koşulları	67
Çizelge 3.10. Rumen funguslarına ait selülaz ve ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgelerinin klonması için <i>Bam</i> HI tanıma bölgeleri (5'-GGATCC-3') eklenerek tasarlanmış oligonükleotit primerler	68
Çizelge 3.11. Vektör DNA ve/veya PZR ürününün restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi için gerekli olan kimyasal ve miktarları.....	68
Çizelge 3.12. Vektör DNA ile PCR ürününün ligasyon işlemi için gerekli olan kimyasal ve miktarları.....	69
Çizelge 4.1. <i>Neocallimastix</i> sp.'ye ait ksilanaz enziminin hücre sel ve süpernatant spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) ve toplam enzim ($\mu\text{mol/dk/ml}$) aktiviteleri	81
Çizelge 4.2. <i>Neocallimastix</i> sp. izolatından klonlanan ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesine ait domain bilgileri (http://pfam.xfam.org/search/sequence)	93
Çizelge 4.3. <i>E.coli/Xyn</i> rekombinant suşunun süpernatant ve hücre sel ksilanaz enzimine ait spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) ve toplam enzim ($\mu\text{mol/dk/ml}$) aktiviteleri	96
Çizelge 4.4. <i>E.coli/Xyn</i> rekombinant suşundan salgılanan ksilanaz enziminin çalışmasına etki eden iyonlar	103
Çizelge 4.5. <i>Orpinomyces</i> sp. süpernatant ve hücre sel selülaz enzimine ait spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) ve toplam enzim ($\mu\text{mol/dk/ml}$) aktiviteleri.....	104
Çizelge 4.6. <i>Orpinomyces</i> sp. izolatından klonlanan selülaz enzimini kodlayan gen bölgesine ait domain bilgileri	113
Çizelge 4.7. <i>E.coli/Cel</i> rekombinant suşunun süpernatant ve hücre sel selülaz enzimine ait spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) ve toplam enzim ($\mu\text{mol/dk/ml}$) aktiviteleri ..	116
Çizelge 4.8. <i>E.coli/Cel</i> rekombinant suşu tarafından salgılanan selülaz enzimi (hücre sel) üzerine etki eden iyonlar.....	122
Çizelge 4.9. <i>Selenomonas ruminantium</i> 'a ait süpernatant ve hücre sel toplam ($\mu\text{mol/dk/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) inülinaz enzim aktivitesi	125
Çizelge 4.10. <i>Selenomonas ruminantium</i> 'a ait süpernatant inülinaz enzimi üzerine etki eden iyonların farklı konsantrasyondaki aktivitesi.....	130

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Amp ^r	: Ampisilin dirençlilik geni
bç	: Baz Çifti
BİGEM	:Biyoteknoloji ve Gen Mühendisiliği Laboratuvarı
BSA	: Bovin serum albumin
°C	: Santigrad derece
CTAB	:Hexadecyltrimethylammonium bromide
Da	: Dalton
dk	: Dakika
DNS	: 3-5 dinitrosalisilik asit
dH ₂ O	: Distile su
dNTP	: Deoksi nükleotit trifosfat
E.C.	: Enzim kobisyon kodu
Et-Br	: Etidium Bromür
<i>g</i>	: Gravity
G-C	: Guanin-Sitozin
g	: gram
HCl	: Hidroklorik asit
ITS	: Internal transcriptiona
kb	: kilobaz
kDa	: Kilodalton
<i>lacZ</i>	: β-galaktosidaz
lt	: litre
mA	: miliamper
μg	: mikrogram
μL	: mikrolitre
mM	: milimolar
n	: Örnek sayısı
NCBI	: National Center for Biotechnology Institute
OD	: Optik yoğunluk
ORF	:Açık okuma çerçevesi (Open Reading Frame)
pI	: İzoelektrik noktası

PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
sp.	: tür
TBE	: Tris, Borikasit, EDTA
TE	: Tris, EDTA
T _m	: Erime sıcaklığı
TLC	:İnce Tabaka Kromatografi (Thin Layer Chromatograph)
UV	: Ultraviole
V	: Volt
X-gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside
AGF	: Anaerobik gut fungus
GH	: Glikozit hidrolaz
R _f	: Retention factor (Alıkonma faktörü)
CFU	: Colony forming units

1. GİRİŞ

Herbivorlar anatomik ve fizyolojik olarak bitkisel materyal ile beslenmeye uyum sağlamış canlılardır (Huntly,1991). Bu adaptasyonun en önemli yapısı sindirim kanallının farklılaşması sayesinde gerçekleşmiştir (Sakaguchi,2003). Bu farklılaşma evrimsel süreçte bitkisel materyalin herbivor canlılar tarafından mekanik ve kimyasal sindirime uğraması sayesinde olduğu bilinmektedir (Langer,1988). Özellikle sindirim kanalında yayılım gösteren simbiyotik mikroorganizmaların rolü bu sindirim basamağında oldukça önemlidir (Kohl ve Dearing, 2016). Bu mikroorganizmalar herbivor canlıların temel besin kaynağı olan bitkisel materyalleri kimyasal olarak sindirimi sırasında kullandıkları enzimleri sayesinde aktif bir rol oynamaktadır (Bayané ve Guiot, 2011).Bu nedenle, ruminantların gastrointestinal sisteminin mikrobiyal ekolojisini, mevcut organizmaların aktivitelerinin ve ilişkilerinin araştırılması önemlidir (McSweeney ve Mackie, 2012; Pitta ve ark., 2018). Mikrobiyal ekosistem içerisinde öncelikle bu mikroorganizmaların sahip oldukları hidroliz enzimleri ve işlevleri önemli bir yer almaktadır. Son dönemlerdeCAZyme sisteminde netlik kazanması ile rumendekilignoselülotik materyallerin katabolizmasında görevli olan bir dizi hidrolitik enzimin görevli olduğu ortaya çıkmıştır (Kala ve ark., 2019).

1.1. Rumen ve Rumen Mikrobiyomu

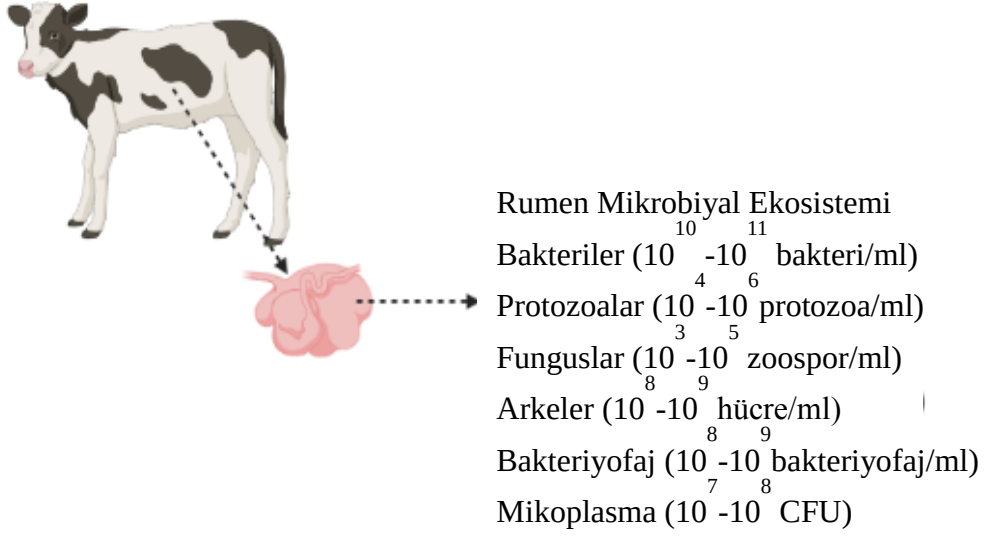
Herbivor canlılar arasında bitki hücre çeperinden yüksek oranda yararlanabilen ruminantlar sistematik basamak olarak Artiodactyla (çift toynaklılar) takımı üyesidir (Hackmann ve Spain, 2010; McCann ve ark., 2014). Ruminantların sindirim kanalı diğer herbivorlardan farklılık göstererek mideleri rumen, retikulum, omasum, abomasum olmak üzere dört bölmeden meydana gelmiştir (Agarwal ve ark., 2015). Ruminant midesinin bu özelleşmiş durumu sayesinde monogastrik herbivorlara göre bitki hücre duvarından ya da lignoselülotik materyalden daha fazla oranda faydalanmasını sağlar (Selinger ve ark., 1996; Öztürk,2007; Pérez-Barbería, 2020). Çünkü ruminant sindirim kanalının yaklaşık olarak % 65-80'lik kısmını oluşturan rumen bölgesinde hem lignoselülotik materyalin bekleme süresinin (yaklaşık olarak 20-48 saat) hem de mikrobiyom yoğunluğunun diğer kısımlardan daha fazla olması bitkisel besinlerin mikrobiyal katabolizma süresi üzerinde herbivor canlı için pozitif bir etkiye sahiptir (Diao ve ark., 2019). Rumen hacmi herbivor canlılar arasında farklılık gösterebilmektedir (Kang ve ark., 2018; Oddy ve ark., 2018). Bu hacim inekte ortalama olarak 100-150 litre iken küçükbaş herbivorlarda ise 8-10 litre

arasında olduğu bilinmektedir (Hobson ve ark., 1982). Rumen ortamı besin olarak tüketilen bitkisel materyalin katabolizmasında görevli mikroorganizmalar için anaerobik, negatif bir redoks potansiyeli (-350 ile -450mV) bulunduran, pH'ı 6.0-7.0 arasında değişkenlik gösteren ve sıcaklık olarak 39°C'ye sahip olan bir yapıya sahiptir (Murphy ve ark., 1982; Rode, 2000; Huang ve ark., 2018; Ogata ve ark., 2019).

1.2. Rumen Mikrobiyal Ekosistemi

Rumenin sahip olduğu karakteristik ortam koşulu özelliklerinden dolayı burada zorunlu anaerobik mikroorganizmalar yayılım göstermektedir (Şekil 1.1). Zorunlu anaerobik mikroorganizmalar arasında bakteriler 10^{10} - 10^{11} (bakteri/ml), protozoalar (10^4 - 10^6 protozoa/ml), funguslar (10^3 - 10^5 zoospor/ml) ve arkeaların (10^8 - 10^9 hücre/ml) simbiyotik olarak yayılım gösterdiği bilinmektedir (Hespel ve ark.,1997; Orpin ve Joblin 1997; Itabashi,2004; Guo ve ark.,2020). Rumen ekosistemi içerisinde bu mikroorganizmalar dışında zorunlu obligant parazit olarak bilinen ve bakterileri konak olarak kullanan bakteriyofaj (10^8 - 10^9 bakteriyofaj/ml) topluluğu (Kamra, 2005; Friedersdorff ve ark., 2020) ve bakterilerden köken alan ancak hücre duvarı bulundurmeyen parazit zorunlu anaerobik mikoplazma (10^7 - 10^8 CFU)'lar (Joblin ve Naylor,2002) da rapor edilmiştir

Rumenin anaerobik yapısından dolayı rumen ekosistemi üzerinde *in vitro* çalışmaların yapılmasında zorluklar bulunabilmektedir (Krause ve ark.,2013). Bu zorlukların ortadan kaldırılması ve günümüzde rumen mikrobiyal ekosistem ile ilgili çalışmaların başlaması Hungate'nin 1940'lı yıllarda rumen bakterisinin izolasyonunu gerçekleştirmesi ile sağlanmış (Hungate,1944;Chung ve Bryant,1997) ve rumen ekosisteminin taksonomisi ile ilgili her türlü çalışmalar gerçekleştirmeye başlamış (Kobayashi,2006) ve ruminant hayvanların beslenme koşulları başta olmak üzere çeşitli çevresel faktörlerden dolayı rumen mikrobiyomu herbivorlar arasında farklılık göstermektedir (Kim ve ark., 2011; Huws ve ark., 2015; Paul ve ark., 2018).



Şekil 1.1. Rumende yayılış gösteren mikroorganizmaların bulunma oranı

Rumen ekosistemi içerisinde prokaryotik hücre topluluğu arasında en fazla yoğunluğa sahip grup şüphesiz bakterilerdir (Bekele, 2010; Zhong ve ark., 2018; Liang ve ark., 2021). Ruminantların beslenme kültüründeki değişiklik rumen bakteri topluluğu üzerinde de değişkenliğe yol açmaktadır (Bekele, 2010). Beslenme kültüründeki farklılığa rağmen rumen bakterilerinin sahip olduğu enzimatik özellikleri sayesinde hem rumen bakteri topluluğunun sabit oranda kalmasını hem de ruminantların geniş bir beslenme yelpazesine sahip olmasını sağlamaktadır (Leedle ve ark., 1982; Dehorty ve ark., 1989; Li ve ark., 2018). Rumen bakterileri taksonomik olarak gruplara ayrılırken gram boyası (gram pozitif veya gram negatif), etki ettikleri substrat çeşidi (selülotik, hemiselülotik, amilolitik, pektinolitik ve proteolitik), morfolojik yapı (basil, kok ve spiral), solunum (zorunlu aerob, zorunlu anaerob ve fakültatif) şekli ve oluşturduğu son ürün çeşidine göre ayrılır (Oimogoto ve Imai, 1981; Alataş ve Umucalı, 2011; McGovern ve ark., 2018; Wang ve ark., 2019).

Ökaryotik hücre yapısına sahip olan rumende yaşayan funguslar ise herbivorların ana besin kaynağı olan bitkisel materyal üzerinde kolonize olmaları ve lignoselülotik enzim aktivitelerinden dolayı önemli bir yere sahiptir (Dollhofer ve ark., 2018; Kar ve ark., 2021). Anaerobik gut fungus (AGF)'lar zoosporik yapıya sahip olan, hücre duvarında kitin bulunduran ve tallus gelişiminin önemli olduğu bir gruptur (Ho ve Barr, 1995; Kamra, 2005; Lange ve ark., 2019). Rumen içerisinde populasyon yoğunluğu az olmasına rağmen sahip oldukları fibrolitik enzim aktiviteleri bu mikroorganizmaların rumen ekosistemi içerisinde önemli yere sahip olduğunu göstermektedir (Dollhofer ve ark., 2016).

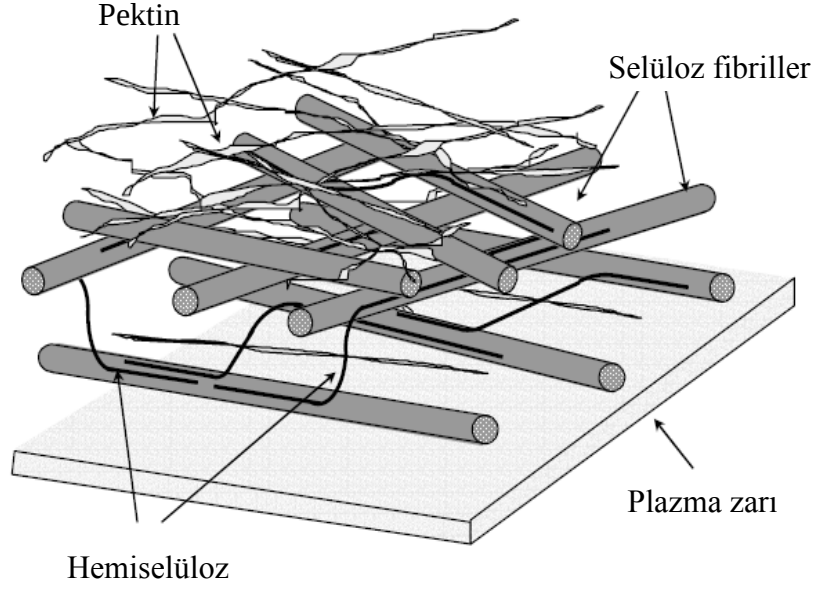
Ökaryot tek hücreli rumen protozoa'ları hücre duvarı bulundurmeyen (Solomon ve ark., 2021) ve taksonomik olarak iki büyük grup (Entodinomorfik ve Holotrick) altında sınıflandırılan canlılardır (García ve ark., 2018). Bu mikroorganizmaların sınıflandırılmasında sahip oldukları hareket yetenekleri de etkin bir rol oynamaktadır. Aktif olarak yer değiştirmeleri her protozoa grubu için farklılık gösterebilmekle birlikte amipsi hareket edebilen (Sarcodina grubu), kamçı yardımıyla hareket edebilen (Mastigophora grubu) ve silleri yardımıyla hareket edebilen (Ciliophora grubu) takson üyeleri mevcuttur (Madigan ve Martingo, 2010). Bu hareket yetenekleri sayesinde de taksonomik olarak birbirinde ayrılabilen protozoa'lardan rumen içersinde en fazla bulunan grubu sillilerdir (Kamra, 2005; Firkins ve ark., 2020). Rumende bulunan protozoa'lar sahip oldukları amilaz, pektinaz, esteraz, invertaz, poligalakturonaz (Thurstone ve Grain, 1971), selülaz ve hemiselülaz (Williams ve Coleman, 1985) enzimlerinin etkinlikleri sayesinde bitkisel substrat (yaklaşık olarak %30) parçalanmasında görev alırlar (Williams, 1986). Rumen protozoa'ları bitki hücre duvarının katabolizması dışında rumen içi bakteri popülasyonunun dengesi (Coleman, 1975; Dehortiy, 1998), herbivor canlı için azot kaynağı ve rumen içi pH dengesinde de (Kamra, 2005) görev aldığı bilinmektedir. Arke'ler taksonomideki üç büyük alandan biri olup, prokaryotlar ile ökaryotlar arası geçiş formu şeklide de düşünülebilir. Çünkü genomik olarak bakteriler alanına moleküler düzeyde ise ökaryotlar alanına benzerlik göstermektedir (Stancik ve ark., 2018). Doğada farklı yayılış alanına sahip olan bu grup canlılar hem normal koşullar altında hem de ekstrem koşullar altında yaşamına devam edebilirler. Günümüzde yaklaşık olarak 28 cins düzeyinde arke izolasyonu sağlanmış bunlardan 5 tane cins düzeyindeki izolasyon rumen içersinden gerçekleştirilmiştir (Janssen ve Kirs, 2008; Mao ve ark., 2021). Rumen içersinde metanojenik arkealar en fazla oranda bulunan gruptur (Kamra, 2005; Tan ve ark., 2020). Metanojenik arkelar rumen ekosisteminde bulunan diğer simbiyotik mikroorganizmalar tarafından üretilen H_2 ve CO_2 moleküllerini substrat olarak kullanarak metan (CH_4) üretimini gerçekleştirirler (Kim ve ark., 2011). Üretilen metanın atmosfere verilmesi ile günümüzdeki atmosferik metanın yaklaşık olarak %50-60'ına yakınının ana kaynağı ruminantlar olmaktadır (Hill ve ark., 2016; Difford ve ark., 2018). Üretilen metanın atmosfer koşullarında olumsuz etkisinden dolayı metan üretiminin azaltılması için yapılan çalışmalardan biri olarak rumen içersinde fibrolitik enzim aktivitesi fazla olan mikroorganizma grubunun sayısının artırılması (H_2 üretimi yapmazlar) ve lignoselülotik substratın katabolizmasının etkilenmeden metan üretimi azaltılabileceği bilinmektedir (Morgavi ve ark., 2010).

Zorunlu hücre içi parazit olarak bilinen bakteriyofajlar rumen içerisinde metanojenik arke'lerin populasyon yoğunluğunu kontrol altında tutmaktadır (Kamra, 2005). Bakteriyofajlar bakterilerin lizis işlemi dışında transdüksiyon sayesinde bazı bakteriler arası kalıtsal varyasyonda ya da biyoteknolojik basamaklarda (yeni enzim keşifleri ve gen terapisi gibi) da kullanılmaktadır (Gilbert ve Kilve, 2015; Nandi ve ark., 2020). Bakteriyofajlar konakçı canlı için parazit veya patojen bir karaktere sahip olmamakla birlikte bakterilerin populasyon yoğunluklarının kontrolünde ve lizis sonrası herbivor canlıya protein kaynağı oluşturabilmektedir (Kamra, 2005).

1.3. Bitki Hücre Duvarının Yapısı

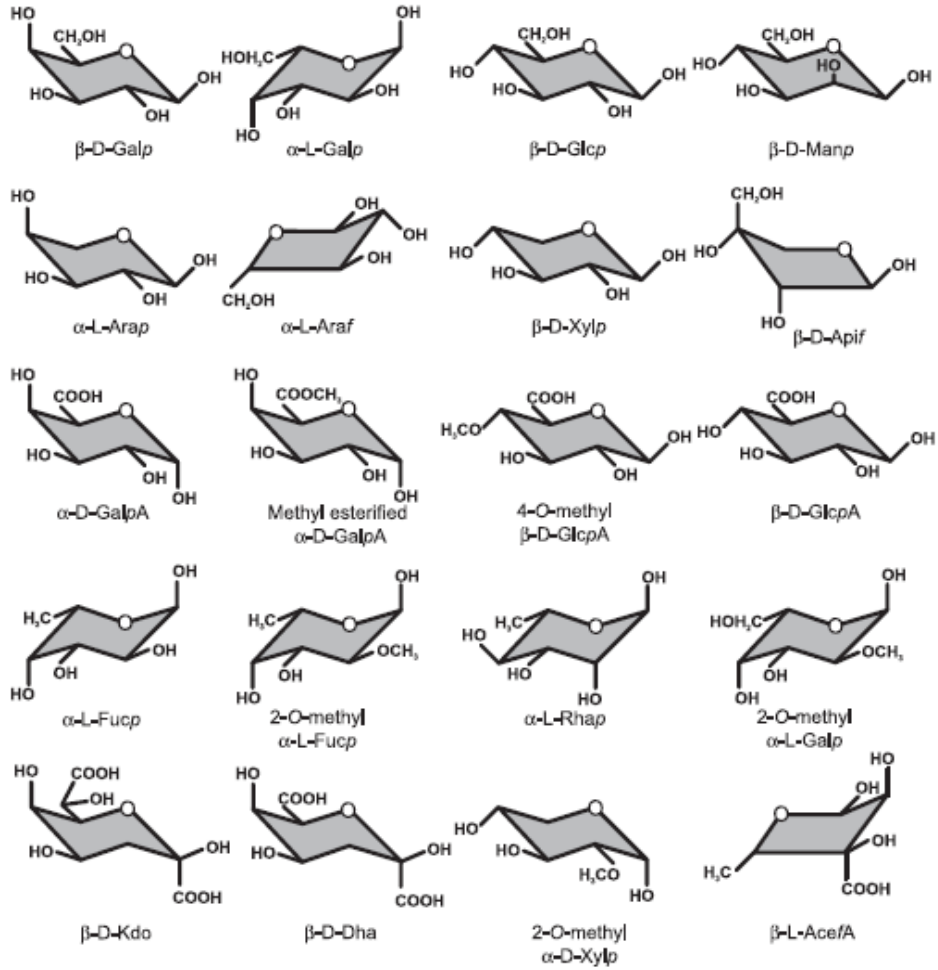
Herbivor hayvanların ana besin kaynağı olan bitkilerin hücre çeperi fibrolitik (Akin, 1993) ve ya lignoselülotik yapılıdır (Biseria ve ark., 1984). Bitki dokuları yapı ve şekil bakımından farklılık gösterirken hücre duvarının bileşimi de bitkisel dokunun yapısına göre farklılık gösterebilmektedir (Pauly ve Keegstra, 2008; Holland ve ark., 2020). Lignoselülotik yapı içerisinde selüloz, hemiselüloz ve pektin gibi polisakkarit ile fenolik bileşikler ve proteinler gibi polisakkarit olamayan fraksiyonlardan meydana gelmiştir (Le Gall ve ark., 2015). Bütün bitkilerin hücre çeperinde bulunan en karakteristik polisakkarit β -1,4 glukan zincirinden oluşan fibril yapılı selüloz bileşimidir. Bunun dışında hemiselüloz yapı ise ksilan, ksiloglukan, glukomannan ve kompleks bağlantılı glukan moleküllerinde oluşmuştur (Somerville, 2006).

Pektin polimeri de homogalakturonan ve ramnogalakturan I-II bileşiklerini içermektedir (Harholt ve ark., 2010). Bitki hücre duvarının kimyasal bileşenleri Şekil 1.2'de şematize edilmiştir.



Şekil 1.2. Bitki hücre duvarının (çeperinin) yapısı (McCann,1991)

Bitki hücrelerinin çoğunda odunlaşmamış birincil hücre duvarı mevcuttur (Chebli ve ark., 2021).Gelişmiş yapılı bitki dokularından ve hücrelerinden izole edilen birincil duvarları, ağırlıklı olarak karbonhidratlardan (kuru ağırlığın %90'ına kadar), yapısal glikoproteinlerden (%2-10), fenolik esterlerden (<%2) ve mineraller (%1–5)'den meydana gelmiştir. On iki farklı glikozil kalıntısının farklı miktarlarda da olsa tüm birincil duvarların bileşenleri olduğu gösterilmiştir (O'Neillve ark., 2003) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Yüksek bitkilerin birincil hücre duvarlarında bulunan glikozil kalıntıları (O'Neill ve ark., 2003)

Bütün bitkilerin hücre çeperinde farklı miktarlarda bulunmasına rağmen selüloz, hemiselülozlar (ksiloglukan, glukomannan veya arabinoksilan) ve pektin polisakkaritleri (homogalakturnan, ramnogalakturnanlar ve süstitüe galakturonanlar) ortak olarak mevcuttur (Mansora ve ark., 2019).

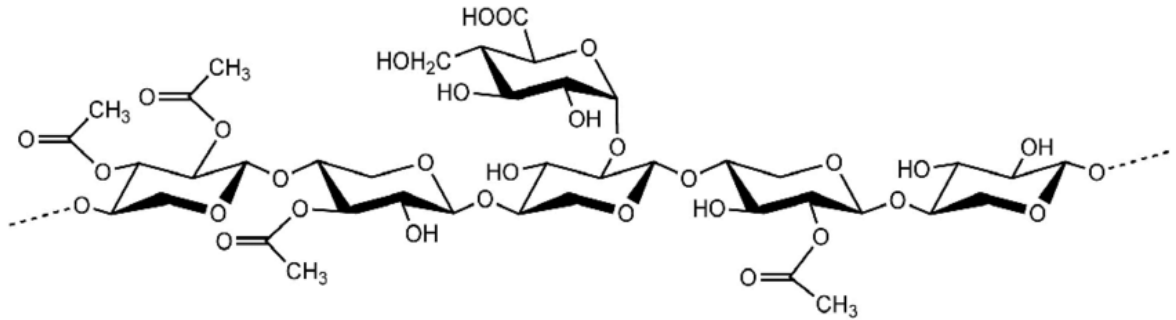
Pektin polisakkarit miktarlarına ve hemiselüloz polisakkaritlerin yapısına ve miktarlarına dayanan iki genel duvar tipi vardır. Tipik olarak tip I duvar yapısı ksiloglukan ve/veya glukomannan ve %20-35 pektin (Carpita ve Gibeaut, 1993), tip II ise arabinoksilan açısından zengin, ancak < %10 pektin içeren bir yapıya sahiptir (Carpita, 1996). Birincil hücre duvarının yapısında bulunan bazı karbonhidratların bulunma oranı Çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge1.1. Birincil hücre duvarının yapısında bulunan bazı karbonhidratlar (O'Neill ve ark.,2003)

Polimer	Tip I (hücre duvarının %)	Tip II (hücre duvarının %)	Yapısı
Selüloz	20-30	-	1,4 β -D-Glcp
Hemiselüloz			
Ksiloglukan	10-20	1-5	1,4 β -D-Glcp
Glukomannan	5-10	-	1,4 β -D-Glcp/1,4 β -D-Manp
Ksilan	5	20-40	1,4 β -D-Xynp
Pektin			
Homogalakturnan	15-20	1-5	1,4 α -D-Galp A
Rhamnogalakturnan	2-5	1	1,4 α -D-Galp A
Ksilogalakturnan	5	-	1,4 α -D-Galp A

Birincil hücre duvarının yapısında bulunan hemiselülozlar ksiloglukan, ksilanlar (glukuronoksilan, arabinoksilan, glukuronoarabinoksilan), mannanları (glukomannan, galaktomannan, galaktomannan) ve arabinogalakturnanı içerir. Ayrıca kimyasal olarak, glikoz, mannoz gibi 1,4-bağlı β -D-piranosil kalıntılarından oluşan bir omurgaya sahip olmaları nedeniyle yapısal olarak selüloza homolog olan bitki hücre duvarı polisakkaritleri (genellikle dallı) olarak tanımlanabilir (O'Neill ve ark.,2003). Ksiloz ve glukuronik asit bulunduran hemiselülozun yapısı Şekil 1.4'de verilmiştir.

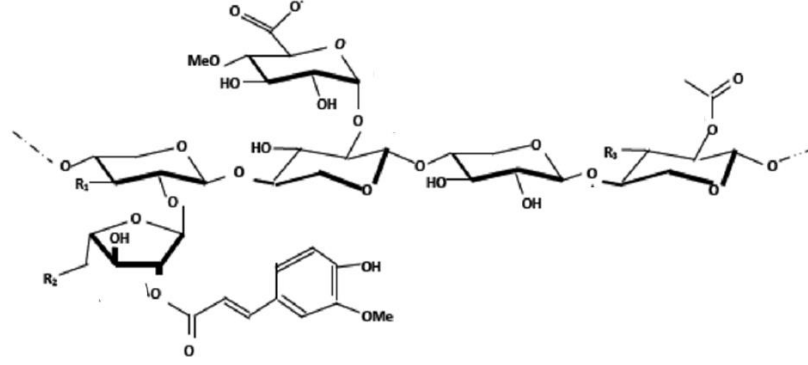
Hemiselüloz ve selüloz arasındaki yapısal benzerlik, büyük olasılıkla, hemiselülozun selüloz mikrofibrilleri ile güçlü, kovalent olmayan bir ilişkisine yol açabilen bir konformasyonel (atomların oluşturduğu üç boyutlu yapı) homolojiye yol açar.



Şekil 1.4. Ksiloz ve glukuronik asit bulunduran hemiselülozun yapısı (Hu ve ark., 2020)

Hemiselüloz omurgası içerisinde bulunan ksilan (Şekil 1.5) molekülü asetil, glukuronik asit, 4-O-metil glukuronik asit ve arabinoz bileşiklerinin β -1,4 glikozit bağları

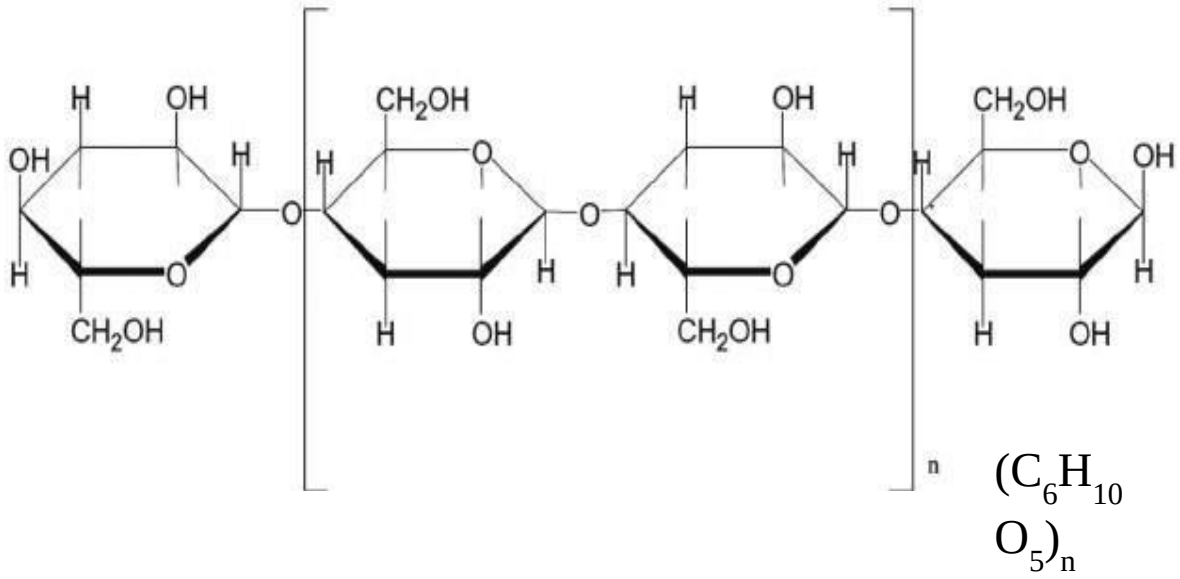
ile bağılı ksiloz moleküllerinden meydana gelmiş doğrusal yapılı heteropolisakkarit kökenli bir karbonhidrattır (Brommley ve ark., 2013)



Şekil 1.5. Ksilan yapısı (Shallom ve Shoham, 2003)

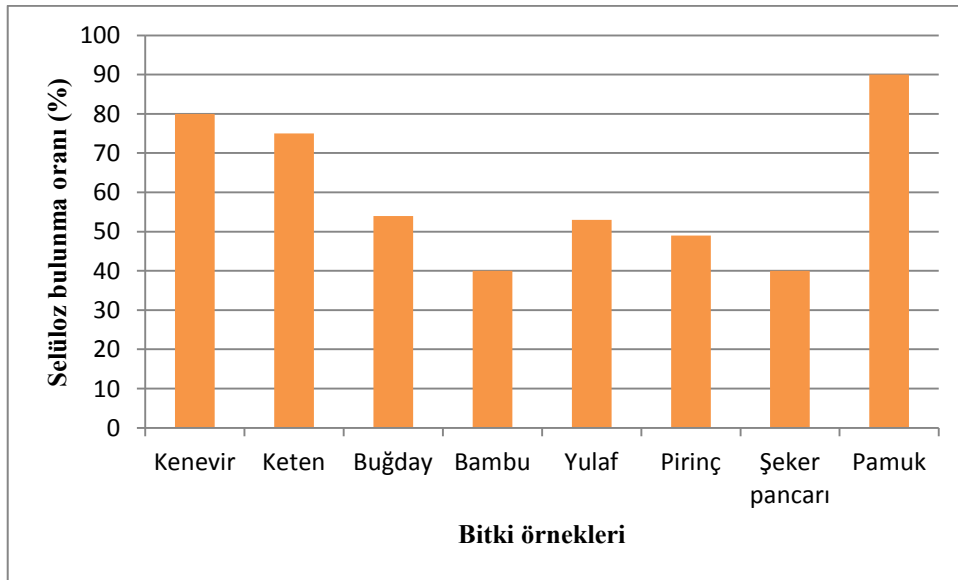
Farklı türler arasında ve hatta aynı türün farklı dokuları arasında ksilan yapılarındaki farklılıklar söz konusudur. Dikotiledonlarda, ksilan ikincil hücre duvarlarında baskın olan hemiselülozdur, ancak birincil hücre duvarlarında çok az bulunur. (Busse-Wicher ve ark., 2016). Aynı şekilde yumuşak ağaç ksilanları, sert ağaç ksilanlarından daha az asidik yan zincire sahiptir. Genellikle, sert ağaç ksilinin iki ksiloz tortusu başına bir asetil grubu bulunur, bu tür asetilasyon genellikle 0-2 yerine 0-3 konumunda meydana gelmektedir (Gruppen ve ark., 1992). Kimyasal karakter bakımından dört farklı kompozisyona sahip olan ksilanlar sırası ile α -L-arabinofuranosil'in dallanma yapan arabinoksilan (0-3 pozisyonunda), 4-O metil eter türevi içeren glukuronoksilanlar, 4-O-metil- α -D-glukuronik asit ile α -L-arabinoz gruplarını beraber bulunduran glukurono arabinoksilanlar ve β -D-galaktransil grubu içeren galaktoglukurono arabinoksilanlardır (Rennie ve ark., 2014).

Bitki hücresinin diğer önemli bileşeni olan selüloz ise yeryüzünde en fazla oranda bulunan organik bileşik olup, sadece bitkisel kökenli olmayıp bazı prokaryot ve ökaryot canlıların da yapısında bulunabilir (O'sullivan, 1997). Selüloz molekülü (Şekil 1.6) kimyasal omurgası dallanmamış, β -1,4 glikozit bağı içeren ve β -D-glukopiranozlardan (α -D-glukopiranoz izomeri) meydana gelmiş homopolisakkarit yapılı bir bileşiktir (Bhat, 2000).



Şekil 1.6. Selülozun yapısı (Thakur ve ark.,2014)

Bitkilerde selülozun içeriği farklılık gösterebilmektedir (Kumar ve ark.,2009). Bazı bitkilerdeki selüloz içeriği Şekil 1.7’de verilmiştir. Selüloz yapısında çok sayıda hidroksil grubu bulundurmaktadır. Bu özellikleri sayesinde farklı gruplar ile kovalent yapıli hidrojen bağı kurabilmektedirler. Kurulan bu bağlar sayesinde su ve başka çözeltilerdeki çözünürlüğünü korumaktadırlar (Yang ve Pan, 2021).



Şekil 1.7. Bazı bitkilerdeki selüloz içeriği (Kumar ve ark., 2009)

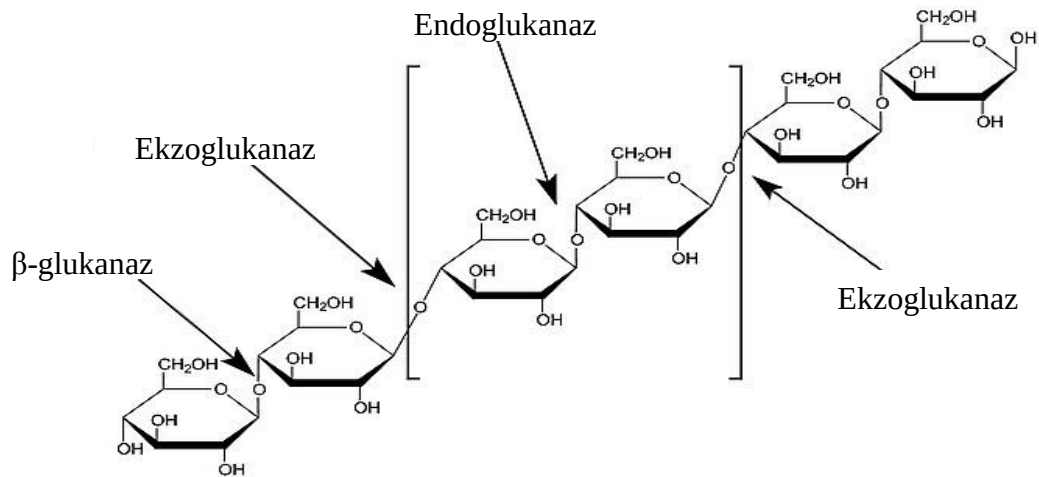
Selüloz genel olarak kağıt endüstrisinde aktif olarak kullanılmasının dışında farklı sektörlerde de aktif olarak kullanılmaktadır. Bu kullanım alanlarının artırılması için selülozun türevlerine de ihtiyaç vardır (Ciolacu ve Suflet, 2018). Selüloz türevleri genel

olarak selülozun kimyasal yapısında bulunan karbon atomlarındaki (C2-3-6) hidroksil gruplarının konumlarına göre şekillenmektedir.

Hidroksil grupları dışında yapısında bulunan glikozit bağlarının hidrolizi sonucu da farklı karakterde selüloz türevleri meydana gelebilmektedir. Hidroksil grupları sayesinde meydana gelen bu selüloz türevleri ester selülozlar (Tsiptsias ve ark., 2022) ve eter selülozlar (Arca ve ark., 2018) olmak üzere iki ana başlık altında toplanmaktadır.

1.4. Bitki Hücre Duvarının Katabolizması

Bitki hücre duvarı çoğunlukla karbonhidrat temelli bir polimerdir. Bu polimer yapı genellikle selüloz, hemiselüloz, lignin ve pektin gibi bileşiklerden meydana gelmektedir. Başka bir ifade ile bitkisel gelişim sürecinde sekonder ve/veya genişlemede bulunan tüm bitki hücreleri hemiselüloz, pektin matriksine gömülü liflerden meydana gelmiştir (Burton ve ark., 2010). Bitki hücreleri sekonder gelişim gösterdiği zaman selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşan sekonder bir katman öncül hücre duvarına yakın bir yerde birikim yapmaktadır (Zhong ve ark., 2019). Hücre çeperinde bulunan bu lignoselülotik yapının hidrolizinde görevli enzim grupları mevcuttur (Glass ve ark., 2013). Hücre duvarının ana omurgası olan selüloz (β -1,4-homopolimer) zincirleri arasındaki bağların hidrolizi için endo-, ekzo- ve β -glukanaz enzimlerinin etki mekanizması önemlidir (Binod ve ark., 2019; Martinez ve ark., 2017). Selüloz molekülünün hidrolizi Şekil 1.8’de verilmiştir.

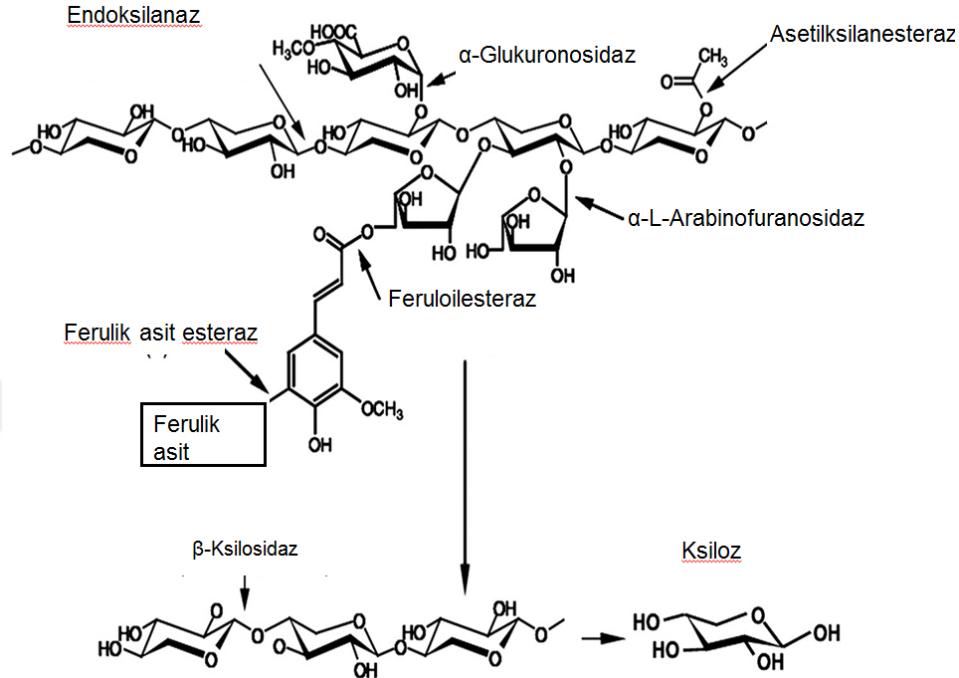


Şekil 1.8. Selüloz molekülünün hidrolizi

(<https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/g4423>)

Hücre çeperinde bulunan hemiselüloz yapıda ksiloz, arabinoz, mannoz, glukoz, galaktoz ve galakturonik asit gibi monomer yapıları bileşiklerden meydana gelmiştir (Zhao

ve ark., 2012). Heterojen özelliğinden dolayı bu bileşiğin hidrolizinde hem endo-glikozil hidrolaz (ksilanaz,mannaz gibi) hem de ekzo-glikozil hidrolaz (β -galaktosidaz, β -glikosidaz gibi) enzim çeşitlerine ihtiyaç vardır (Houfani ve ark., 2020).Hemiseluloz yapının hidrolizi Şekil 1.9’da gösterilmiştir.



Şekil 1.9. Hemiseluloz yapının hidrolizi (ksilan esas olarak alınmıştır) (Sun ve ark., 2012)

α -1,4-polisakkarit yapılı olan pektin molekülü D-galakturonik asit,L-ramnoz,L-arabinoz,D-galaktoz,-D-ksiloz gibi bileşiklerin kovalent bağlanması sonucu meydana gelmiştir (Mohnen, 2008).Bu özelliğinden dolayı pektinin hidrolizinde glikozil hidrolaz ve liyaz (poligalaturanaz) enzim grupları beraber etki göstermektedir (Gainvors ve ark., 1994).Fenolik yapıli bileşik olan ligninin hidrolizinde oksiperoksidaz enzim gruplarını bulunduran ligninazlar görev almaktadır (Haemmerli ve ark., 1986).

1.5. Bitki Hücre Duvarının Katabolizmasında Anaerobik Gut Fungus ve Bakterilerin Rolü

Bitki hücre duvarının hidrolizi herbivor sindirim kanalının doğal florasında bulunankonakçı ile simbiyotik veya karşılıklı ilişkiler içinde yaşayan mikroorganizma toplulukları tarafından gerçekleştirilir (Zhang ve ark., 2022). Bu mikroorganizmalar arasında bulunananaerobik gut fungus (AGF)’lar hem kimyasal hem de mekanik olarak hücre duvarının parçalanmasında oldukça önemli bir rol üstlenmektedir (Joblin, 1989). Rumen funguslarının sahip olduğu zoosporlar sayesinde herbivor hayvanların

beslenmesinden sonra rumen içerisine salınarak bitkisel substratın yüzeyine bağlanır ve bitki çeperine nüfuz ederek polisakkaritaz enzimlerini segrasyona uğratar (Munn ve ark., 1981; Akin ve Borneman, 1990). Bitki hücre duvarındaki kolonizasyon işlemi gerçekleştikten sonra rumen bakterilerinin kısmen hidrolize edebildiği lignin içeren dokularını tamamen hidrolizi gerçekleştirmektedirler (Akin ve ark., 1983). Ayrıca selüloz ve ksilanaz gibi enzimlerin salgılanması sonucu etkili olduğu bitkisel doku parçalanmalarında rumen funguslarının aktif rol üstlendiği de bilinmektedir (Pearce ve ark., 1985). Rumen bakterileri de bitki materyalinin dış yüzeyine ortalama olarak 5 dakikalık kısa bir sürede kolonize olabilmekte (Cheng ve ark., 1977; Akin, 1979) ve kolonizasyon işlemi sırasında rumen funguslarından farklı olarak yapılarında bulunan glikokaliks tabakası aktif rol üstlenmektedir (Costerton ve ark., 1978). Hücre çeperine tutunma işlemi gerçekleştikten sonra enzimatik aktiviteleri sayesinde bitki hücre duvarının hidrolizini gerçekleştirmektedirler (Cheng ve ark., 1977).

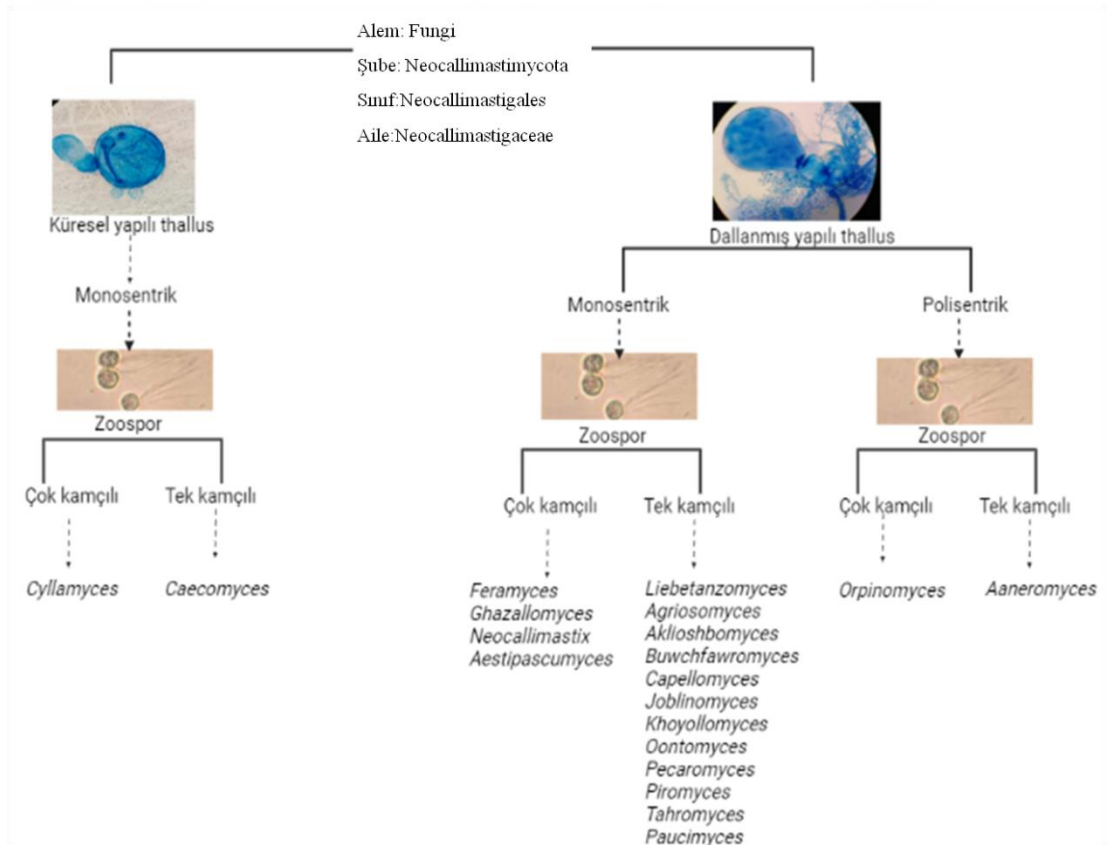
1.6. Anaerobik Gut Funguslar

Anaerobik gut fungus (AGF)'lar ilk olarak yirminci yüzyılın başlarında Liebetanz (1910) ve Braune (1913) tarafından kamçılı protozoa grubu olarak ileri sürülen *Sphaeromonas communis* ve *Callimastix frontalis* türleri gözlemlenmiştir. Ancak daha sonra Orpin (1975) tarafından koyun rumenindeki araştırmalar sonucu bu canlıların protozoa olmadığı (morfolojik, fizyolojik karakterlerden dolayı) ve bu canlıların taksonomideki yerlerinin farklı olduğunu göstermesi ile rumen fungusların keşfi gerçekleşmiştir (Orpin, 1975). *Neocallimastix frontalis* olarak literatüre giren rumen funguslarının hücre duvarında kitin bulunması ile sistematik düzeyi netlik kazanmıştır (Orpin, 1977).

AGF'ların tanımlanması ve sınıflandırılmasında makroskobik (koloni ve besiyerindeki büyüme desenleri), fenotipik (kullanılan substrat çeşitleri ve enzim aktiviteleri), mikroskobik ve dizi bazlı yaklaşımlar kullanılmaktadır. Mikroskobik karakterizasyonda bu canlıların karmaşık yaşam döngülerinde üretilen tüm yapılar ile ilgili şekil, boyut ve genel gelişim süreçlerinin tanımlanmasını içermektedir. Moleküler düzeydeki yaklaşımlarda ise belirli lokusların filogenetik olarak değerlendirilmesi oldukça önemlidir (Hanafy ve ark., 2022). AGF zoospor ile aseksüel olarak çoğalabildikleri için zoosporlu funguslar Eumycota taksonuna bağlı Mastimycota alt taksonundaki *Neocallimastimycota* şubesinde (filum) bulunurlar (Hibbert ve ark., 2007).

Neocallimastigomycota, sporangia (zoospor kesesi)'dan hareketli kamçılı sporların (zoosporlar) üretilmesini ve salınmasını içeren bir yaşam döngüsüne girer. Bu zoosporlar, yeni sporangia oluşumunu sağlayan bir tallus yapısına dönüşmektedir.

Yaşam döngüsü içindeki bu çoklu yapılar, taksonlar arasında önemli farklılıklar gösterir ve bu nedenle cins veya tür düzeyinde ayırım için kullanılabilir (Hanafy ve ark., 2022). Cins düzeyindeki ayırımı belirlemek için son derece önemli bir yere sahip olan rizoidal yapıları dallanmış (filamentli) ve küresel (bulbous) olmak üzere ikiye ayrılır (Barr, 2016; Hanafy ve ark., 2022). AGF sistematğinde rizoid yapısına ek olarak zoosporda bulunan kamçı sayıları da cins düzeyinde ayırt etmek için kullanılan diğer bir kriterdir (Hibbert ve ark., 2007; Li ve ark., 1997/a). AGF'ların taksonomik basamakları ve cins düzeyinde morfolojik farklılıklar Şekil 1.10'da verilmiştir.



Şekil 1.10. Anergik Gut Fungusları (AGF) rizoid yapısı bakımından dallanmış (filamentli) (monosentrik, polisentrik) ve küresel (monosentrik, polisentrik) olmak üzere ikiye ayrıldığı şematize edilerek günümüzde bağlı olduğu sistematik taksonu gösterilmiştir

AGF'ların taksonomik olarak yerinin tespit edilmesinde morfolojik olarak gözlemlenen bazı sorunların bulunmasından dolayı moleküler çalışmalar hız kazanmıştır (Hanafy ve ark., 2018; Smith ve ark., 2020). Bu sorunlar arasında AGF'ların gelişim gösterdiği *in vitro* koşullardan dolayı morfolojik yapıda farklılaşma ve polisentrik yapıya

sahip olan fungusların zoospor salınımının nadir olmasından dolayı cins düzeyinde sınıflandırma yapılırken hataların olabileceği düşünülmüştür (Heath, 1988; Ho ve ark., 2000).

Moleküler çalışmaların güvenilirliği açısından tercih edilmesi AGF'ların sistematik düzeyinin daha kararlı olmasını sağlamaktadır (Hanafy ve ark., 2018). Moleküler çalışmalar arasında DNA dizi analizleri (Bridge ve ark., 1998), Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgesi (Brookman ve ark., 2000), 5.8S, 18S ve 28S gibi RNA bölgeleri (Dore ve Stahl, 1991; Kar, 2013; Hanafy ve ark., 2017), G/C veya A/T nükleotitleri arası kıyaslama ve PZR-RFLP (Ozköse ve ark., 2003) gibi çalışmalar mevcuttur.

Bundan dolayı AGF'ların sınıflandırılması yapılırken morfolojik ve filogenetik özellikler beraber değerlendirilmektedir (Elshaded ve ark., 2022). Günümüzde AGF'ların taksonomik basamaktaki yerlerinin güvenilirliği için Çizelge 1.2'de verilen kriterler kullanabilmektedir.

Çizelge 1.2. Anaerobik gut fungus (AGF)'ların taksonomik basamak kriterleri (Elshaded ve ark., 2022)

Parametreler	Özellikleri
Morfolojik/Mikroskopik kriterler	
Koloni morfolojisi	Şekil, boyut, renk ve nükleer merkez farklılığı
Zoospor	Kamçı sayısı: Tek kamçılı ($n=1-4$), Çok kamçılı ($n>4$) Zoospor boyutu Kamçı uzunluğu
Tallus gelişimi	Monosentrik veya polisentrik
Sporangial gelişim	Monosentrik: Endojen, interkalar benzeri endojen, ekzojen Polisentrik: Terminal İnterkalar
Sporangiofor (Kese boynu)	Sporangiofor boyutu, dallanma şekli, morfolojisi ve boyutu
Sporangia (Zoospor kesesi)	Sporangial şekiller (oval, küresel, kalp şeklinde, piriform vb.) Sporangial boyun yapısı (sporangia ile rizoit arası mesafe) Ekzojen, Endojen ve İnterkalar sporangia farklılıkları
Rizoid gelişimi	Dallanmış (Filamentli) veya Küresel (Bulbous)
Filogenetik kriterler	
Internal transcribed spacer (ITS)	Bölgeye ait çoğaltılmış 12 adet PZR bölge homolojisi
D1/D2 ribozomal bölge	Bölgeye ait çoğaltılmış 12 adet PZR bölge homolojisi

Moleküler çalışmalarda DNA dizi analizi yapılırken canlıya ait halkasal DNA, çekirdek DNA'sı veya mitokondriyal DNA tercih edilmektedir (Lapedes ve ark., 2018). AGF'ların zorunlu anaerob yapısından dolayı mitokondri organeline sahip olmamakla beraber enerji ihtiyacını hidrojenozomlar sayesinde karşılamakta olduğu bilinmektedir

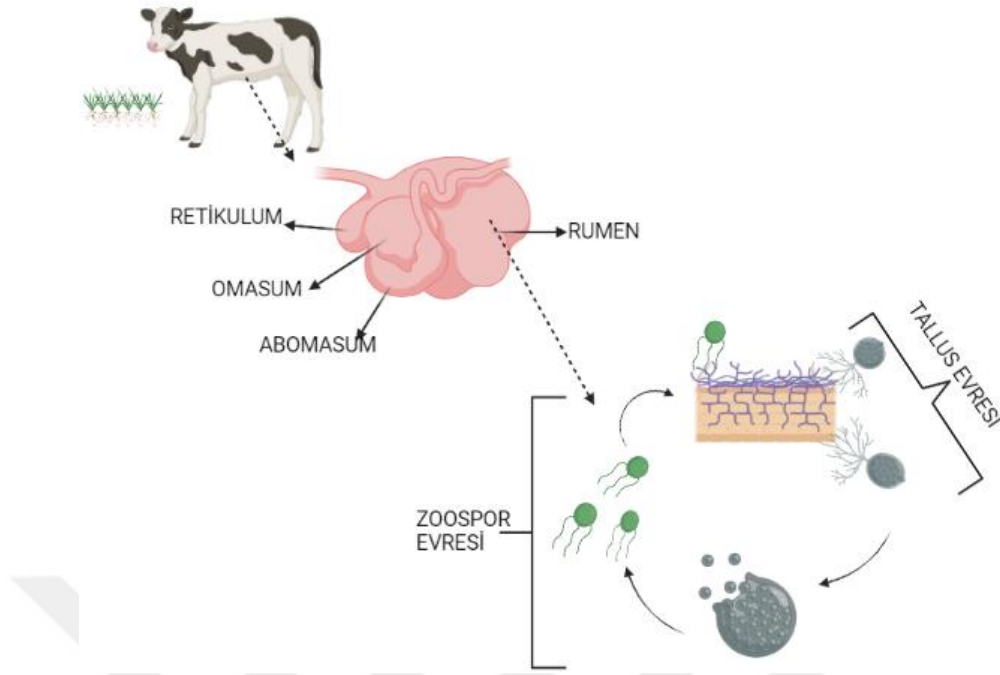
(Yarlett ve ark., 1986; Yazdıç ve ark., 2021). Bundan dolayı AGF’larda çekirdek DNA’sının analizi gerçekleştirilmekte ve mutasyona karşı korunmuş bölgeler tercih edilmektedir. Özellikle AGF’lar için yapılan moleküler çalışmaların en temel analizi ITS bölgesindeki varyasyonlardır (Dieffenbach ve ark., 1993).ITS bölgesinin çeşitli çevresel faktörlerden ya da mutasyonlardan korunaklı olması bu bölgenin güvenilirliğini artırmakta (Paul ve ark., 2018), aynı zamanda ITS bölgesi evrensel primerler sayesinde hızlı bir şekilde de sonuç vermesi bu bölgenin tercih edilmesi sebepleri arasında gösterilmektedir. Çevresel etkenlere karşı korunaklı olduğu bilinen ITS1 (18S rRNA-5,8S rRNA arasında) ve ITS2 (5,8S rRNA -28S rRNA arasında) bölgelerindeki baz farklılıkların kıyaslanması AGF’ların sistematik basamaktaki konumunu netleştirmektedir (Joshi ve ark.,2018; Dolhofer ve ark.,2018). Sınıflandırma durumunun güçlendirilmesi için Hanafy ve ark. (2021) DNA tarafından kodlanan protein karşılığı olmayan 28S rRNA (LSU) bölgesindeki domain (D1-D2) dizilimleri kullanmıştır. Sistematik basamakların kıyaslanması için DNA parçası üzerinde spesifik olamayan belli başlı primerlerin kullanılması sonucu PZR-RADP metodu ile oluşan genetik haritalamada kalıtsal varyasyon gösterilmiştir (Ozköse ve ark., 2015). Moleküler ve morfolojik özellikler değerlendirildikten sonra AGF’ların *in vitro* koşullarda kullandığı monomer, dimer veya polimer yapılı substratlar, fermantasyon sonucu oluşturdukları uçucu yağ asitleri, dikarboksilik asitler, alkol, H₂, CO₂ ve diğer metabolik ürünlerin üretimi ve miktarı da sınıflandırmalarına yardımcı olmaktadır (Elshaded ve ark., 2022). Günümüze kadar kullanılan morfolojik ve moleküler çalışmalar sonucunda *Neocallimastix* cinsine ait 20 farklı cins belirlenmiş ve Çizelge 1.3’de verilmiştir.

Çizelge 1.3. Günümüze kadar cins düzeyinde tanımı yapılmış anaerobik gut fungusların (n=20) taksonomik basamaktaki konumu ve isimleri

Alem	Fungi
Şube	Neocallimastigomycota
Sınıf	Neocallimastigomycetes
Takım	Neocallimastigales
Aile	Neocallimastigaceae
Cins	<i>Caecomyces</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor, Gold ve ark.,1988) <i>Neocallimastix</i> (Monosentrik, Çok kamçılı zoospor, Barr,1981) <i>Piromyces</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor,Barr ve ark.,1989) <i>Orpinomyces</i> (Polisentrik, Çok kamçılı zoospor,Breton ve ark.,1989) <i>Anaeromyces</i> (Polisentrik,Tek kamçılı zoospor,Breton ve ark.,1990) <i>Cyllamyces</i> (Polisentrik,Tek kamçılı zoospor,Ozköse ve ark.,2001) <i>Feramyces</i> (Monosentrik,Çok kamçılı zoospor,Hanafy ve ark.,2018) <i>Pecaromyces</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoosporHanafy ve ark.,2017) <i>Oontomyces</i> (Monosentrik,Tek kamçılı zoospor,Dagar ve ark.,2015) <i>Buwchfawromyces</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor, Callaghan ve ark., 2015) <i>Liebetanzomyces</i> (Monosentrik,Tek kamçılı zoospor,Joshi ve ark.,2018) <i>Ghazallomyces</i> (Monosentrik,Çok kamçılı zoospor,Hanafy ve ark.,2019) <i>Aklioshbomyces</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor, Hanafy ve ark.,2019) <i>Agriosmyces</i> (Monosentrik,Tek kamçılı zoospor, Hanafy ve ark.,2019) <i>Capellomyces</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor, Hanafy ve ark.,2019) <i>Joblinomyces</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor, Hanafy ve ark.,2019) <i>Khoyollomyces</i> (Monosentrik,Tek kamçılı zoospor, Hanafy ve ark.,2019) <i>Tahromyces</i> (Monosentrik,Tek kaçmılı zoospor, Hanafy ve ark.,2019) <i>Aestipascumyces</i> (Monosentrik, Çok kamçılı zoospor, Hanafy ve ark.,2020) <i>Paucimyces</i> (Monosentrik, Tek kamçılı zoospor, Hanafy ve ark.,2020)

1.7. Anerobik Gut Funguslarda Üreme ve Gelişme

Anaerobik gut fungus (AGF) birbirini takip eden vejetatif (tallus) ve genaratif (zoospor) evre olmak üzere iki kısımdan oluşmuş bir yaşam döngüsüne sahiptir (Gruninger ve ark., 2014). Herbivor canlıların ana besin kaynağı olan bitkilerin hücre duvarına zoosporlar dış yüzeyine tutunarak vejetatif evre olarak bilinen fungal tallus formuna dönüşmeye başlar. Vejetatif evrede kolonileşme ve fibrolitik enzim etkinliğinin artışı görülmeye başlar (Davies ve ark., 1993). AGF'un rumen içerisindeki yaşam döngüsü ve ruminant bir herbivorum mide bölmeleri Şekil1.10 gösterilmiştir.



Şekil 1.11. Anaerobik gut fungus (AGF)'un rumen içerisindeki yaşam döngüsü ve ruminant bir herbivorun mide bölmeleri gösterilmiştir

Rizoid yapıları farklı olan AGF'ların sahip olduğu yaşam döngüleri de farklılık göstermektedir. *Neocallimastix*, *Piromyces* gibi AGF'lar monosentrik yaşam döngüsüne sahip iken *Cyllamyces* sp. gibi AGF'larda polisentrik yaşam döngüsüne sahiptir (Ozköse ve ark., 2003).

Monosentrik yapılu AGF'ların sahip olduğu zoosporların rumen sıvısı içerisinde salınımı zoosporogenesis olarak da ifade edilebilir (Heath ve ark., 1986). Zoosporogenesis sonucu etrafa yayılan zoosporlar bitki hücre duvarına doğru kemotaksis adı verilen yönelim hareketini gerçekleştirirler (Orpin ve Bountiff, 1978; Munn ve ark., 1981). Bitki hücre duvarına temas ettikten sonra penetrasyonu başlayan AGF'ların vejetatif basamağı gözlemlenir.

Bu basamakta sahip oldukları hidrolitik enzim aktiviteleri de artmaya başlamıştır (Gordon ve Phillips, 1998). Polisentrik tallus yapısına sahip olan AGF'larda ise zoosporogenesis sonucu zoospor salınımı çok nadir bir şekilde gerçekleşir. Bu funguslar sahip oldukları nükleer yapıyı kese boynu yardımıyla misellerine doğru ileterek monosentrik veya polisentrik tallus oluşumunu gerçekleştirir (Barr ve ark., 1989; Ho ve ark., 1993).

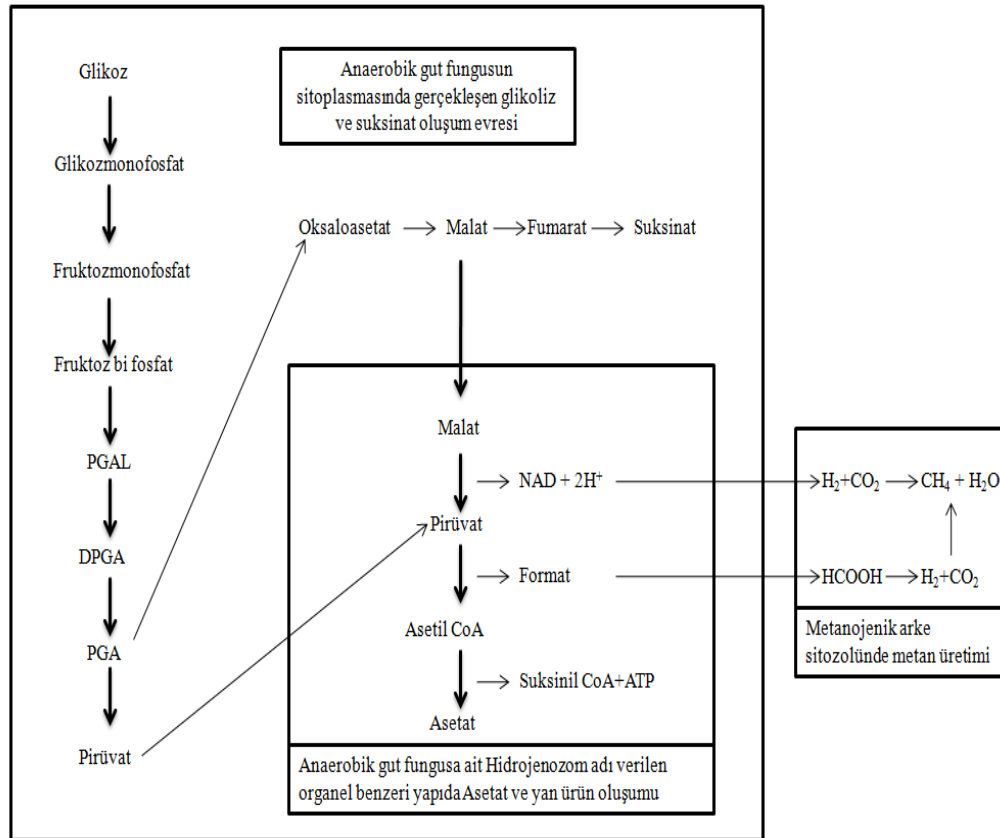
1.8. Anerobik Gut Fungusların Ruminal Mikrobiyom ile Etkileşimi

Rumen içerisinde bulunan mikroorganizmaların oluşturduğu simbiyotik birliktelik sayesinde herbivorlar tarafından alınan organik maddelerin yüksek oranda hidrolizi gerçekleşmektedir (Bladen ve ark., 1961). Rumen içerisinde oluşan bu birliktelik ile kompleks yapıları yem maddelerinden basit şeker üretilir ve mikrobiyal popülasyonun diğer üyeleri tarafından fermente edilir, bu da yem maddelerinin parçalanmasından sorumlu diğer mikroorganizmalar için dallı zincirli yağ asitleri, vitaminler veya kofaktörlerin oluşmasına yardımcı olur (Puniya ve ark., 2015). Rumen mikrobiyomu üyesi olan anerojik gut fungus (AGF) *in vivo* koşullar altında optimum bir yaşam döngüsüne sahip olan aynı zamanda rumen içerisinde diğer mikroorganizmalar ile simbiyotik bir ilişki içerisinde olduğu bilinen bir topluluktur.

1.8.1. Anerobik gut fungus ile metanojenik arke etkileşimi

En iyi çalışılmış kokültür çalışması olarak AGF ile metanojenik arkeler arasındaki etkileşim olmuştur (Bauchop ve Mountfort, 1981; Mountfort ve ark, 1982). Bu etkileşim içerisinde özellikle metan üretiminde proton (H^+) transferi ön plana çıkmıştır (Li ve ark.,2021). Bunun için AGF'ları yapısal polisakkaritleri, deposal polisakkaritleri ve çözünür karbonhidratları fermente edebilme özelliğinden faydalanılmıştır (Hibbett ve ark.,2007). Hücre zarından geçebilecek büyüklüğe kadar hidrolize olan şekerler AGF'ların sitozolüne girdikten sonra hücre içi enzimler tarafından H_2 , CO_2 , format, asetat, etanol ve süksinik aside metabolize edilir (Li ve ark., 2016). AGF'ların karbonhidratları fermente etmesi sonucu oluşan H_2 iyonlarının rumen içerisinde birikmemesi, oluşan bu iyonun başka bir mikroorganizma tarafından substrat olarak kullanabileceğini göstermiş ve bu mikroorganizma grubunun metanojenik arke'ler olduğu tespit edilmiştir (Cheng ve ark.,2009; Kumar ve ark.,2015/a). Metanojenik arke'ler ile AGF'lar arasındaki bu simbiyotik yapı Cheng ve ark. (2009) tarafından yapılan *in vitro*kokültür çalışmasında gösterilerek netlik kazandırılmıştır. Metanojenik arke'ler H_2 ve CO_2 gibi substratları kullanarak metan (CH_4) üretimi gerçekleştirmekte (Şekil 1.12) ve oluşan metan sayesinde H_2 iyonlarının rumen içerisinde birikiminin engellenerek optimum rumen pH'ı sağlanmaktadır. Yapılan *in vitro* kokültür çalışmalarında asetatın %72'den %134'e arttığı, karbondioksitin %37'den %89'a arttığı, format'ın %83'den %1'e düştüğü etanol'ün %37'den %19 düştüğü, laktat'ın %62'den %2'ye düştüğü ve hidrojen'nin %35'den %0 (ortamda tespit edilemedi) düştüğü, metan'ın ise %0'dan %58'e kadar çıktığı görülmüştür

(Bauchop ve Mountfort, 1981; Marvin ve ark., 1990; Leggieri ve ark., 2021). Bununla birlikte metanojenik arke'ler AGF'ların fibrolitik enzim aktivitesini üzerinde de pozitif bir etkiye sahip olduğu ve AGF'ları hidrojenozomlarındaki metabolik yolları da uyardığı bilinmektedir (Li ve ark., 2021).



Şekil 1.12. Anaerobik gut fungus (AGF) ve metananojenik arke arasındaki simbiyotik ilişki şematize edilmiştir (Li ve ark., 2021)

1.8.2. Anerobik gut fungus ile rumen bakterileri arasındaki etkileşim

Rumen içerisinde AGF'ların bitkisel materyaller üzerinde kolonileşmesi ve fibrolitik aktivitesi rumen bakterilerine benzerlik göstermektedir (Williams ve ark., 1994). Ancak sahip oldukları enzim faaliyetleri bakterilere oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Joblin, 1981; Ho ve ark., 1988; Akin ve ark., 1988). Rumen bakteri ile aralarındaki etkileşimin aktivatör, inhibitör veya nötr yapılı olduğu gözlemlenmiştir (Joblin, 1990). Özellikle son yıllarda, transkriptom analizi sayesinde AGF'ların bir dizi karbonhidrat aktif enzim (CAZyme)'yi kodlamak için geniş transkript kütüphanesine sahip olduğu (Da Silva ve ark., 2017) ve bu CAZyme sisteminin karbonhidrat fermentasyonu veya glikozit bağı üzerinde etkili olan enzimler grubu olması ile (Kala ve ark., 2019) AGF'lar ve rumen bakterileri arasında yapılan kokültür çalışmalarının değerlendirilmesi bu

sistem üzerinden yapılabilmektedir. Bunun için *Neocallimastix* sp. ile *Selenomonas* sp. suşlarının CAZyme ailesine üye olan ksilanaz enzimin üretimi üzerinde sinerjit bir etkiye sahip olduğu ancak *R. flavefaciens*'in antogonist bir karakter ortaya koyduğu gösterilmiştir (Williams ve ark., 1991; Takizawa ve ark., 2021).

Aynı şekilde *Caecomycetes* sp. ile *Selenomonas* sp.'nin CAZyme ailesine ait selüloz enziminin etkinliği üzerinde de sinerjit bir karakterde olduğu bilinmektedir (Bernalier ve ark., 1991). Aynı zamanda AGF'ların genomundaki biyosentez yollarının rumen bakterilerin transkripsiyon mekanizması üzerinde de etkili olabileceği ve *Anaeromyces* sp., *Caecomycetes* sp. ve *Fibrobacter* sp. ile oluşturulan kokültür çalışmasında *Fibrobacter* sp.'ye ait 6 farklı ribozomal olmayan peptid sentetaz ve metiltransferaz gibi enzimlerin transkripsiyon regülasyonunda etkili olduğu görülmüştür (Swift ve ark., 2021). AGF'ların metanojenik arke ve rumen bakterileri ile ayrı ayrı yapılan *in vitro* kokültür çalışmalarına ek olarak bu üç mikroorganizmanın bir arada bulunduğu ortak kültür çalışmaları sayesinde lignosellülozik enzim etkinliklerinin pozitif yönde gelişmekte olduğu da gösterilmiştir (Robert ve ark., 2001; Leng ve ark., 2018).

1.8.3. Anerobik gut fungus ile rumen protozoaları arasındaki etkileşim

Rumen mikrobiyomu üyesi olarak çok sayıda cins ve türten meydana gelen silli rumen protozoaları da mevcuttur (Firkins ve ark.,2020). Rumen protozoaları genel olarak rumen bakteri popülasyonu üzerinde aktif bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Zhang ve ark., 2022). Protozoların bakteriler ile arasındaki av-avcı ilişkisine ek olarak kanibalizm (Fregulia ve ark., 2020) ve diğer mikrobiyum üyeleri ile etkileşimleri ön plana çıkmaktadır. Bunun için AGF ile yapılan kokültür çalışmaları sayesinde fungal zoosporların tüketiminin gerçekleştirdiği, protozoların sistemden uzaklaştırılması sonucu AGF popülasyonunda artış olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak AGF ile rumen protozoaları arasında predatör bir besin ağı olduğu ortaya çıkmıştır (Joblin,1990; Lee ve ark.,2001). Ancak AGF'ların bitkisel materyale kolonize olmasından sonra AGF miktarında azalmanın olmadığı gözlemlenmiştir (Paswan ve ark., 2022).

1.9. Anaerobik Gut Fungusların Enzimatik Aktiviteleri

Anaerobik gut fungus (AGF)'lar sahip oldukları fibrolitik enzimler sayesinde glikozit bağlar üzerinde etkili olarak depolimerasyon işlemini gerçekleştirirler (Borneman ve ark., 1990; Wilson ve Wood, 1992). AGF'ların glikozit bağ üzerinde etkili olan bu

enzimler topluluğu aynı zamanda lignoselülitik enzimler olarak bilinen karbonhidrat aktif enzim (CAZyme) ailesine üyedir (Da Silva ve ark., 2017). AGF'ların sahip olduğu CAZyme enzim aktivitesi ile ruminant hayvanların ana besin kaynağı olan bitki hücre duvarındaki karbonhidrat yapılı polimerin hidrolizde oldukça önemli bir göreve sahiptir (Haitjema ve ark., 2017; Hagen ve ark., 2021). Glikozit bağların hidrolizde görevli olan bu enzimler AGF'ların karakteristik özelliğinden dolayı rizoid ve rizomiselyumlarında depo edilerek extraselüler olarak da salınabilirken (Lowe ve ark., 1987) zoosporlarında da bu enzimlerin sekresyonu görülmektedir (Williams ve Orpin, 1987). Enzim üretimine çok sayıda faktör etki edebilir ancak biyotik faktör olarak AGF'larda ön plana çıkan ilk yapı bitki hücre duvarında vejetatif evreye geldiği dönemde sekresyon hızının üst seviyede olduğu, bu salınımın zoosporogenes sırasında azaldığı görülmüştür (Breton ve ark., 1995).

AGF'ların selüloz, hemiselüloz gibi karbonhidratların hidrolizini sağlayan kompleks bir enzim grubuna sahip olduğu bilinmektedir. Bu enzimler selülazlar (Lowe ve ark., 1987; Dollofer ve ark.,2015; Kadam, 2018; Saye ve ark., 2021), hemiselülazlar (Mountford ve Asher, 1989; Henske ve ark., 2018 a; Hess ve ark., 2020) ve ksilanazlar (Dagar ve ark., 2015) gibi ayrılabilir. AGF'ların sahip olduğu glikozit hidrolazlar ve etki ettiği substratlar Çizelge1.4'de verilmiştir.

Çizelge 1.4. Anaerobik Gut Fungus (AGF)'ların substrat olarak kullanabildiği bazı karbonhidrat çeşitleri, bu karbonhidratlar üzerinde etkili olduğu bilinen enzimler ve AGF örnekleri (<http://www.cazy.org>)

SUBSTRAT	EC NUMARASI	İŞLEV	ÖRNEK
Selüloz	3.2.1.4	endo- β -1,4-glucanase / cellulase	<i>Neocallimastix</i> (Chen ve ark.,2012) <i>Orpinomyces</i> (Morrison ve ark.,2016) <i>Piromyces</i> (Steenbakkers ve ark.,2003)
	3.2.1.91	cellulose 1,4- β -cellobiosidase	<i>Neocallimastix</i> (Wang ve ark.,2011) <i>Orpinomyces</i> (Jin ve ark.,2011) <i>Piromyces</i> (Tsai ve ark.,2003)
Hemiselüloz	3.2.1.37	xylan 1,4- β -xylosidase	<i>Neocallimastix</i> (Wang ve ark.,2011) <i>Orpinomyces</i> (Morrison ve ark.,2016) <i>Piromyces</i> (Herhangi ve ark.,2003)
	3.2.1.55	α -L-arabinofuranosidase	<i>Neocallimastix</i> (Wang ve ark.,2011) <i>Orpinomyces</i> (Morrison ve ark.,2016)
	3.1.1.72	acetylxytan esterase	<i>Neocallimastix</i> (Adesioye ve ark.2016) <i>Orpinomyces</i> (Adesioye ve ark.2016)
	3.2.1.23	β -galactosidase	<i>Neocallimastix</i> (Wang ve ark.,2011) <i>Orpinomyces</i> (Morrison ve ark.,2016)
	4.2.2.2	pectate lyase	<i>Neocallimastix</i> (Kopečný ve Hodrová, 1995) <i>Orpinomyces</i> (Couger ve ark.,, 2015)
Nişasta	3.2.1.1	α -amylase	<i>Neocallimastix</i> (Kelleci ve Comlekcioglu,2015) <i>Orpinomyces</i> (Couger ve ark.,, 2015)
	3.2.1.20	α -glucosidase	<i>Neocallimastix</i> (Chen ve ark.,2012) <i>Orpinomyces</i> (Morrison ve ark.,2016) <i>Piromyces</i> (Steenbakkers ve ark.,2003)
Mannan	3.2.1.78	mannan endo-1,4- β -mannosidaz	<i>Orpinomyces</i> (Ximenes ve ark.,2005) <i>Piromyces</i> (Millward ve ark.,1996)

EC : Enzim Komisyon Numarası

Enzimlerin biyokimyasal reaksiyonlardaki mekanizmaları dışında sahip oldukları genetik karakterin özelliği ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda enzimi kodlayan gen bölgesinin tespiti ve bu bölgenin uygun koşullar altında klonlanması enzim hakkında sonuçlar verebilir (Cheng ve ark., 1991; Liu ve ark., 2019). DNA dizilemesi sonucu elde edilen veriler enzimlerin açıklanamayan bazı biyokimyasal özelliği hakkında da bilgi vermektedir (Cheng ve ark., 1991). Dizileme sonucu çoğu endoglukanaz ve ksilanazların aktif bölgeleri (katalitik domain)'nin bir polipeptit zincir üzerinde çok sayıda olduğu ve bu bölgelerin de benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Gilbert ve ark., 1992; Khalili ve ark., 2017; Wen ve ark., 2021). Ancak ksilanazların hepsinde böyle bir durum olmadığı *Neocallimastix patricium* gibi bazı anaerobik gut funguslarda glikozit hidrolaz 11 ailesine üye olan endoksilanaz *xynB* (Henrissat, 1991) gen bölgesinde tekrarsız katalitik bölge veya uzun olmayan katalik bölgelerin olduğu da görülmüştür (Black ve ark., 1994).

Neocallimastix sp. cinslerine ait *celA* (sellobiyohidrolaz), *celB* (endoglukanaz) ve *celC* gibi selülozun hidrolizinde görevli olan enzimlerin gen bölgeleri izole edilerek AGF'ların DNA kütüphanesinde yer almaya başlamış ve özellikle *celA* yani sellobiyohidrolaz geni rekombinant çalışmalarda ön plana çıkmıştır (Liu ve ark., 2020).

Metagenomik çalışmaların hızlanmaya başlaması ile *celA* geninin başka glikozit hidrolazlar ile oluşturduğu rekombinant yapıların endüstriyel alanlarda da tercih edildiği rapor edilmiştir (Fan ve ark., 2021). AGF'lara ait cDNA'larında gen bölgelerinin katalitik domain kıyaslaması dikkate alındığında endoglukanaz enziminin sentezinden sorumluluğu *celD* genine ait üç adet fonksiyonel bölgenin olduğu bu bölgelerin endoglukanaz, ksilanaz ve sellobiyohidrolaz aktivitelerine sahip olduğu bilinmektedir (Xue ve ark., 1992 a; Fan ve ark., 2021). *Neocallimastix* sp.'nin DNA dizilemesi sonucu diğer enzim ailelerine ait gen bölgelerinin taraması devam etmekle birlikte ksilanaz gen bölgesi için endoksilanaz enzim sentezinde görevli olan *xynA*, *xynB* ve β -ksilanaz enziminin sentezinde görevli olan *xyn1* gen bölgelerin tespiti sağlanarak klonlaması gerçekleştirmiştir (Gibert ve ark., 1992). Ksilanaz gen bölgesi ile ilgili cDNA geliştirme çalışmalarında *Anaeromyces* sp.'ye ait endo- β -1,4 ksilanaz enzime ait *xyn10* bölgesinin yeni keşfi ince tabaka kromatografi (TLC) ile tespit edilmiştir (Wen ve ark., 2021). Endoksilanaz'dan sorumlu gen bölgesinin klonlama çalışmaları ile promotor bölgesi ve domain bölgeleri ile ilgili bilgiler netlik kazanmaya başlamış (Thambly ve ark., 1993) ve bu bölgenin rekombinant modifikasyonları sayesinde ekspresyon hızının 1,25 kat arttığı görülmüştür (Xiong ve ark., 2018). Endüstriyel kullanım alanında yaklaşık olarak %25'lik katkı payına sahip olan pektinazlar bakteri, mantar (rumen bakterileri hariç) ve bitki ekstraksiyonlarından elde

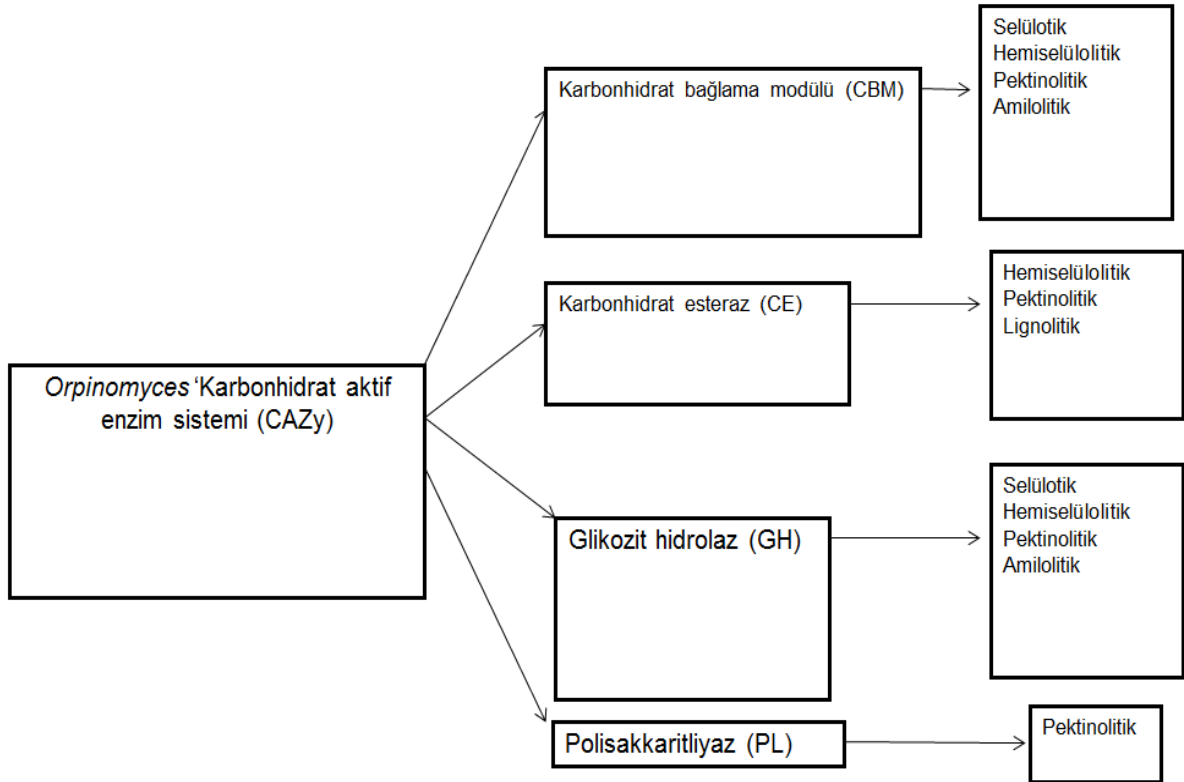
edilmektedir (Jayani ve ark., 2005; Shet ve ark., 2018). Orpin (1984)'e göre AGF'ların bitkisel substrat olarak kullanılan buğday samanındaki pektinin ortalama %20-40 arasındaki kayıbindan sorumlu olabileceğini ifade etmiştir. Ek olarak AGF'lardan *Neocallimastix* sp. ve *Orpinomyces* sp.' ile yapılan çalışmalarda pektinaz üyesi olan pektin liyaz (EC 4.2.2.10) ile poligalakturaz (EC 3.2.1.15) enzimlerinin spesifik aktiviteleri tespit edilmiştir (Kopečný ve Hodrová, 1995). Ek olarak AGF'lar pektinin yadımlama reaksiyonunda görev alabileceği halde yadımlama ürünleri olan galakturonik asit gibi monomer yapıları substrat olarak kullanamadığı da bilinmektedir (Philips ve Gordon, 1988). Esterazlar genellikle ksilanın hidrolizinde sinerjistik bir etkiye sahip olan ve endüstriyel alanda kullanılan bir enzim grubudur (Wong, 2006). AGF'ların monosentrik ve polisentrik yaşam döngülerinin her basamağında görev alan esterazlar ksilan, feruloil ve *p*-kumaril esteraz enzimlerinin sentezini gerçekleştirmektedirler. Bu özellikleri sayesinde lignin yapısında bulunan feruloil ve *p*-kumaril bağlarının hidrolizde etkin bir rol üstlenirler (Borneman ve ark., 1990; Goel ve ark., 2015). Rumen sıvısında yapılan metagenomik çalışmalar sayesinde AGF'lara ait olan esteraz gen bölgesi klonlanarak enzimin substratlar üzerindeki etkinliği de incelenebilmiştir (Wong ve ark., 2015).

AGF'lar nişasta ve maltoz gibi karbonhidratları da substrat olarak kullanabildiği (Mountfort ve Asher, 1988) ve *Neocallimastix* sp. ile *Piromonas* sp. suşları ile yapılan çalışmalarda nişasta ve maltoz içeren besi ortamındaki glikozit hidrolaz etkinliğinin arttığı gözlemlenmektedir (Williams ve Orpin, 1987). Yanke ve ark. (1993) da amilolitik enzim aktivitesinin bazı rumen funguslarında hücre dışı etkinliğinin daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı şekilde proteinlerin hidrolizde görevli olan proteolitik enzimler peptit bağlarının hidrolizasyonu sırasında amino ve karboksil gruplarının ayrı ayrı katabolize ederler. Ancak *Neocallimastix* sp., *Piromyces* sp. ve *Caecomycetes* sp.'de aminopeptidaz aktivitesi gözlemlenirken karboksipeptidaz etkinliği görülmemektedir (Michel ve ark., 1993). Aynı zamanda bazı herbivorların *in vitro* yem sindirilebilirliğini artırılması için de *Piromyces* sp., *Anaeromyces* sp. ve *Orpinomyces* sp. gibi rumen funguslarının proteolitik aktivitesi pozitif bir etki yapmıştır (Paul ve ark., 2004).

1.9.1. *Orpinomyces* cinslerine ait enzim özellikleri ve selüloz aktivitesi

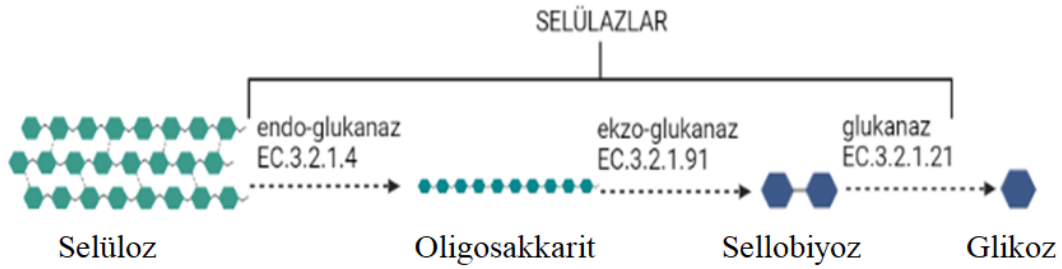
Neocallimastix şubesine üye olan *Orpinomyces* cinsleri ilk olarak inek rumeni sıvısında gözlemlenmiş (Akin ve ark., 1988), ancak ilk kültür çalışması Breton ve ark. (1989) tarafından gerçekleştirilmiştir. *Neocallimastix joyonii* olarak tanımlanan bu cins daha sonra polisentrik tallus yapısı ve aseksüel üremesinde görevli olan

zoosporlarının çok kamçılı olmasından dolayı yeni bir cins olarak kabul edilmiştir (Breton ve ark.,1989).Günümüzde *O.joyonii* (Breton ve ark., 1989) ve *O.intercalaris* (Ho ve ark., 1994) olmak üzere iki türü mevcuttur. Ruminantların sindirim kanalında doğal bir habitata sahip olan *Orpinomyces* cinsleri selüloz, hemiselüloz ve bitkisel kökenli organik bileşiklerin hidroliz ve fermentasyon işlemini gerçekleştirebilecek enzim sistemlerine sahiptir (Borneman ve ark., 1989; Selinger ve ark., 1996; Hartinger ve Zebeli, 2021; Yücel ve Ekinci, 2022). *Orpinomyces* cinslerinin sahip olduğu enzim grupları Şekil 1.13’de verilmiştir. Genel olarak *Orpinomyces* cinslerinin sahip olduğu enzimler glikozit hidrolaz (GH) enzim ailesine üyedir.GH11 ailesine üye olan ksilanaz (*xynA*) (Trevizano ve ark., 2012;, Passarinho ve ark.,2019), GH16 ailesine üye likenaz (*licA*) (Chen ve ark., 1997; Comlekcioglu ve ark.,2011) ve GH5 ailesine üye olan mannaz (*manA*) (Ximenes ve ark.,2005; Hooker ve ark.,2019),karbonhidrat esteraz ailesine üye olan asetil ksilan esteraz (*axeA*) (Adesioye ve ark.,2016), α -amilaz (Counger ve ark., 2015; Kelleci ve Comlekcioglu, 2016), pektinolitik aktivite (Kopečný ve Hodrová, 1995) ve feruloil esteraz (*faeA*) etkinliğine sahip olduğu da bilinmektedir (Dilokpimol ve ark., 2018).



Şekil 1.13. *Orpinomyces* cinslerinin sahip olduğu enzim grupları

Orpinomyces cinsleri aynı zamanda bitki hücre duvarının temel yapısını oluşturan selülozu katabolize eden enzim gruplarına da sahiptir (Sharada ve ark., 2013). Bunlar Glikozit hidrolaz 6 (GH6) enzim ailesine üye *celA* (Li ve ark., 1997 b), *celC* (Li ve ark., 1997), *celF* (Chen ve ark., 2003), *celH* (Wang ve ark., 2014) ile *celI* (Li ve ark., 2004) ve Glikozit hidrolaz 5 (GH5) enzim ailesine ait *celE* (Ljungdahl, 2008), *celB* (Ljungdahl, 2008), *celG* (Ljungdahl, 2008) ile *celJ* (Ljungdahl, 2008) genleri olmak üzere selülozun hidrolizinde aktif görev alan enzim gruplarıdır. Ek olarak selülozun yapısında bulunan β 1-4 glikozit bağların hidrolizini gerçekleştiren β -glukosidaz (*bglA*) aktivitesi de gözlemlenmiştir (Li ve ark., 2004; Ljungdahl, 2008). Selülaz enzim grubu kristalite ve protein yapısına göre farklı katalitik domainlere sahiptir (Bayer ve ark., 1998). Domainlere göre oluşan bu farklılık sonucu selülozun hidrolize olması endo 1-4- β -glukanaz, ekzo 1-4- β -glukanaz ve β -glukanaz enzimlerinin takımlar halinde çalışması sonucu meydana gelir (Bhat, 2000; Ang ve ark., 2013). Endoglukanazlar (EC.3.2.1.4) β 1-4 glikozit bağı sonucu oluşan polisakkarit yapılı selülozu oligosakkarite katalize ederek ekzoglukanaz (EC.3.2.1.91) için substrat oluşturabilmektedir. Ekzoglukanaz etkinliği sonucu sellobiyoz gibi dimer ve glukoz monomerleri oluşmaya başlar. Oluşan dimer grupların glukanaz (EC.3.2.1.21) enzim etkinliği sonucu yapıtaşlarına kadar hidrolizasyon işlemi gerçekleşmiş olur (Davies ve Henrissat, 1998). Selülozun hidrolizinde görevli olan selülazların takımlar halinde etki mekanizması şematize yapısı Şekil 1.14’de gösterilmiştir.



Şekil 1.14. Selülozun hidrolizinde görevli olan selülazların takımlar halinde etki mekanizması şematize edilmiştir

Selülaz enzimleri ile ilgili genel olarak bakteri ve rumen dışındaki mantarlar üzerinde geniş bir araştırma yapılmış (Hu ve ark., 2014). Bu mantarlar arasında rumende bulunan AGF’lar ile ilgili çalışmalarında artmaya başladığı bilinmektedir. *Neocallimastix* sp. başta olmak üzere bazı AGF’ların yüksek oranda endoglukanaz (EC.3.2.1.4) aktivitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Williams ve Orpin, 1987; Chang ve Park, 2020) (Çizelge 1.5).

Çizelge 1.5. Glikozit hidrolaz enzim ailesi 6'ait selüloz enzim aktivitesi gösteren bazı *Orpinomyces* sp. tür isimleri, sahip olduğu selüloz ismi, Uniprot ID ve referans bilgileri

Organizma adı	Selüloz ismi	Uniprot ID	Referans
<i>Orpinomyces</i> sp.PC-2	<i>celA</i>	P78720	Li ve ark.,1997
<i>Orpinomyces</i> sp.PC-2	<i>celC</i>	P78721	Li ve ark.,1997
<i>Orpinomyces</i> sp.PC-2	<i>celF</i>	Q874D8	Chen ve ark.,2003*
<i>Orpinomyces</i> sp.Y102	<i>celC16</i>	V9I1G2	Liu ve ark.,2013*
<i>Orpinomyces</i> sp.Y102	<i>celC7</i>	A0A0764926	Chen ve ark.,2014

*: Yayınlanmamış(http://www.cazy.org/GH6_characterized.html)

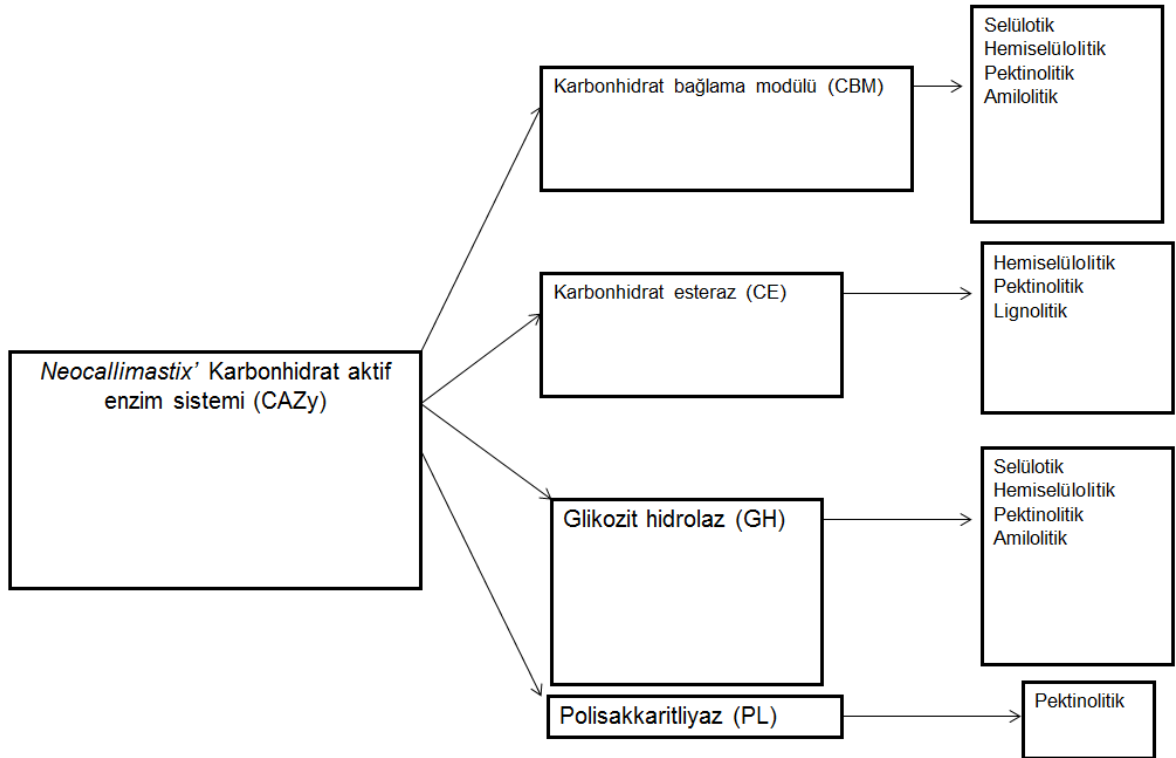
GH6 enzim ailesine üye selobiyohidrolazlar filamentli AGF'larda en temel selüloolitik enzimler olarak işlev görmektedir (Chang ve Park,2020).Yapısal çalışmalar, bu ailenin selobiyohidrolazlarının, endoglukanazlarda korunmayan esnek halkalarla (flexible loops) kaplı tünel benzeri (tunnel-like) katalitik bölgelere sahip olduğunu ortaya koymuştur (Amore ve ark.,2017).Ek olarak bu bölge içersinde bir N-terminal bölgesi içeren bir alan ve bir C-terminal selobiyohidrolaz katalitik alanı mevcuttur (Chen ve ark., 2014).Aynı zamanda C-terminal veya N-terminal uçlarında karbonhidrat bağlama modülü (CBM) eklenmiştir (Armenta ve ark., 2017; Janeček ve ark., 2019).

GH 6 ailesine üye olan bu enzimin substratı tanıyan iki aktif bölgesinin de mevcut olduğu bilinmektedir (Himmel ve ark., 2018). AGF'ların sahip olduğu selüloz enzimleri sadece ekstraselüler olarak salgılanmamakla beraber kristal yapılı selülozun katabolizmasında da görev alabileceği düşünülmektedir (Orpin, 1981; Wilson ve Wood, 1992; Haitijema ve ark., 2017). Ek olarak selülozun hidrolizi sonucu oluşan sellobiyoz ürün miktarındaki artış selüloz sindiriminin yavaşlamasına neden olmaktadır (Li ve Calsa, 1991; Teunissen ve ark., 1992; Narasimha ve ark., 2016).

1.9.2. *Neocallimastix* cinslerinin enzim özellikleri ve ksilanaz aktivitesi

Neocallimastix cinsleri ilk olarak rumende yayılım gösteren bir protozoa cinsi olan *Callimastix* cinsine ait bir tür olduğu (Vavra ve Joyon, 1966) ancak daha sonrasahip olduğu morfolojik özelliği (monosentrik tallus yapısı) ve çok kamçılı (poliflagellat) zoospor salınımından dolayı bugünkü mevcut cins düzeyindeki ayrımı gerçekleşmiştir (Bar, 1981). Günümüzde *N. frontalis* (Heath ve ark., 1983), *N.patriciarum* (Orpin ve Munn,1986), *N.hurleyensis* (Webb ve Theodorou, 1991), *N.variabilis* (Ho ve ark., 1993), *N. cameroonii* (Ariyawansa ve ark., 2015), *N. Californiae* (Li ve ark., 2016) ve *N. lanati* (Wilken ve ark., 2021) olmak üzere 7 farklı türü mevcuttur. *Neocallimastix*'e ait türleri lignoselüloolitik yapının depolimerasyon işlemini gerçekleştiren enzimleri sayesinde bitkisel materyallerin parçalanması ve oluşan ürünlerin fermantasyon işleminde

kullanılmasını gerçekleştirirler (Henske ve ark., 2018 b). Bu fungus cinsleri selülozun hidrolizde görevli olan *celA* (Denman ve ark., 1996; Ekinci ve ark., 2002), *celB* (Li ve ark., 1997), *celD* (Xue ve ark., 1992), hemiselülozun yapısında bulunan asetik asidin uzaklaştırılmasında görevli olan karbonhidrat esteraz ailesine üye asetil ksilan esteraz (*axeA*) (Kwon ve ark., 2016), pektinolitik (Gordon ve Phillips, 1992), α -amilaz (Mountfort ve Asher, 1988) enzim aktivitelerine sahiptir. *Neocallimastix* cinslerinin sahip olduğu enzimler Şekil 1.15’de verilmiştir.



Şekil 1.15. *Neocallimastix* cinslerinin sahip olduğu karbonhidart aktif enzim sistemi

Aynı şekilde *Neocallimastix* cinsleri bitkisel kökenli olan ksilanın hidrolizde görevli *xynA* (Li ve ark., 1997), *xynB* (Black ve ark., 1994) ve *xynC* (Liu ve ark., 1999) gen bölgeleri tarafından kontrol edilen enzim aktivitelerine de sahiptir. Ksilanın yapısal özelliğinden dolayı bu polisakkarit hidrolizi için endoksilanaz (de Freitas ve ark., 2021), asetil ksilan esteraz (Marasinghe ve ark., 2021) ve β -ksilanaz (Chaudhary ve ark., 2021) gibi bir dizi enzim grubuna ihtiyaç vardır. Bu enzim grupları CAZyme veri tabanına göre protein dizi benzerliklerinden dolayı GH10 ve GH11 ailesine üye olduğu bilinmektedir (Yi ve ark., 2021). Ancak biyoteknolojik uygulamalar açısından, GH11 ksilanazları geniş pH ve sıcaklık stabilitesinden dolayı en çok tercih edilen enzim ailesidir (Xing ve ark., 2021). GH

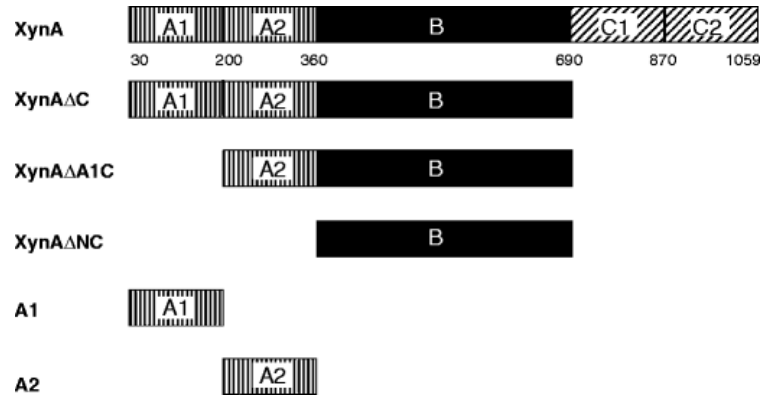
11 ksilanaz enzim aktivitesi gösteren bazı *Neocallimastix* sp. türleri Çizelge 1.6'da verilmiştir.

Çizelge 1.6. Glikozit hidrolaz 11 ailesi ait ksilanaz enzim aktivitesi gösteren bazı *Neocallimastix* sp. tür isimleri, sahip olduğu ksilanaz ismi, Uniprot ID ve referans bilgileri (Paës ve ark.,2012)

Organizma adı	Ksilanaz ismi	Uniprot ID	Referans
<i>Neocallimastix</i> sp. GMLF 2	Xyn2A	B8YQ34	Akyol ve ark.,2009
<i>N. frontalis</i> MCH3	Xyn3	Q01421	Durand ve ark.,1996
<i>N. frontalis</i> SK1	Xyn11A	Q5YB84	Huang ve ark.,2005
<i>N. frontalis</i> SK1	Xyn11B	Q7Z8B8	Huang ve ark.,2005
<i>N. patriciarum</i>	Xyn11A	P29127	Gilbert ve ark.,1992
<i>N. patriciarum</i>	XYCN	Q9UV68	Liu ve ark.,1999
<i>N. patriciarum</i>	XynS20	A8TGA1	Liu ve ark.,2008
<i>N. patriciarum</i>	XynS20E	B8YG19	Liu ve ark.,2010

Uniprot ID: Erişilebilir protein dizisi ve sisteme kayıtlı numarası

GH 11 enzim ailesine üye olan *xynA* gen bölgesinin Protein Data Bank veri tabanında bulunan sekans bilgileri bu enzimin sahip olduğu domain bölgesinde5 farklı (A_1 - A_2 - B - C_1 - C_2) alanın olduğunuŞekil 1.16'da gösterilmiştir (30-1059 baz çifti). Bu alan içerisinde, karbonhidrat bağlanma modülüne ait olan (CBM) ve iki tane benzer N-terminal sinyal peptit bölgesi (A_1 - A_2), glikozit hidrolaz ailesine ait katalitik alan (B) ve karbonhidrat bağlanma modülüne ait olan (CBM) C- terminal peptit alanı (C_1 - C_2) mevcuttur (Irwin ve ark., 1994; Hayashi ve ark., 1997; Black ve ark., 1994; Kleine ve Liebl, 2006).



Şekil 1.16. XynA'nın modüler yapısı

Şekil 1.16 göre XynA'nın iki benzer N-terminal alanı (A_1 - A_2), karbonhidrat bağlama modülleridir (CBM). Katalitik alan (B), glikozit hidrolaz ailesi. C-terminal alanı (C_1 - C_2), XynA kutularının altındaki sayılar, ve diğerleri tarafından önerildiği gibi XynA alanlarının yaklaşık sınırlarını temsil eder(Winterhalter ve ark., 1995; Meissner ve ark., 2000; Kleine ve Liebl, 2006).

GH 11 ailesine üye olan ksilanaz genellikle yüksek bir izoelektrik noktası (pI), düşük moleküler ağırlık (<30 kDa), bir çift yer değiştirmeli katalitik mekanizma (displacement catalytic mechanism), katalitik kalıntılar olarak görev yapan iki glutamat ve kıvrımlı yapısı (β -jelly roll) ile karakterize edilir (Fushinobu ve ark., 1998; Rahmani ve ark., 2019; Vucinic ve ark., 2021).

AGF'lar tarafından üretilen diğer enzim grupları arasında en fazla sekresyona uğrayan enzim olması ile ksilanaz ön plana çıkmaktadır (Lowe ve ark., 1987; Williams ve Orpin, 1987; Akyol ve ark., 2009). *Neocallimastix* sp. ile yapılan çalışmalarda ksilanaz aktivitesi sonucunda ksiloz, ksilobiyoz, ksilotrioz ve ksilotetraoz gibi ürünleri oluşturduğu görülmüş (Pearce ve Bauchop, 1985), Liu ve ark. (2005)'inin yaptığı *xynA* gen bölgesi klonlama çalışmalarında da oluşan ürünlerin aynı olduğunu rapor etmişlerdir. Bazı AGF'larda bu enzimin hücre içi aktivitesinin hücre dışına göre daha fazla salınım yaptığını göstermişlerdir (Gomez de Segura ve ark., 1998).

1.10. Rumen Bakterilerinin Tanımlanması

Orla-Jensen (1919) rumen içerisinde gram pozitif, fakültatif ve laktik asit fermentasyonu yapan *Streptococcus bovis* olarak isimlendirilen bir bakteri suşu izole etmesine rağmen aslında rumen içerisinde laktik asit fermentasyonu yapan bakterilerin popülasyon yoğunluğunun daha az olması ve daha sonra bu bakterilerin fakültatif anaerob olduğu ortaya çıkmıştır (Hardie, 1984; Hungate, 1979). Yirminci yüzyılın (1940-1950 arası) ortalarında sitrik anaerobik tekniklerin gelişmeye başlaması ile rumende bulunan bakterilerin izolasyonu ve kültür çalışmaları başlamış (Hungate, 1947; Krause ve Russell, 1996) ve ilk olarak *Bacteroides* olarak isimlendirilen gram negatif, çubuk şekilli bakteriler topluluğu sınıflandırılmıştır (Hungate, 1950). Hamlin ve Hungate (1959) daha sonraki izolasyon çalışmalarında nişasta ve maltozun hidrolizini gerçekleştiren ancak selüloz ve izomerlerinin hidrolize edemeyen gram negatif, spor oluşturmeyen, anaerobik çubuk bakterisini (*B.amylophilus*) tanımlamayı başarmışlardır. Daha sonraki dönemlerde laktat kullanımı ile ayırt edilen *Selenomonas* cinsleri (Bryant ve ark., 1958; Prins, 1971), bütirik asit üretimi ile ön plana çıkan *Butryvibrio* sp. taksonları (Bryant ve Small, 1956) netlik kazanmaya başladı. Günümüzde bakterilerin taksonomik basamaktaki yerinin tespiti için morfolojik özellikleri, etki ettikleri substrat çeşitleri, moleküler tanımlamalar ve diğer özellikleri kullanılmaktadır.

Bu özellikler dikkate alındığı zaman rumende yayılış gösteren bakteri toplulukları *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* ve *Spirochaetes* olmak üzere farklı şubelere ayrılmıştır (Kenters ve ark., 2011). Rumen mikrobiyal florasında bulunan rumen bakterileri ile birlikte arkea ve ökaryot (rumen fungusları) domainleri biribiri ile olan simbiyotik ilişkileri aynı zamanda herbivor canlının sağlığı üzerinde de etkilidir (Kumar ve ark., 2015; Dias ve ark., 2017).

1.11. Rumen Bakterilerinin Enzimatik Sistemleri

Rumen bakterileri sahip olduğu fibrolitik enzimler sayesinde ruminat hayvanın beslenmesi üzerinde pozitif bir etkiye sahiptirler (Sujani ve Seresinhe, 2015). Ayrıca rumen endoglukanaz (Nguyenve ark., 2021) ve ksilanaz (Hespell ve Whitehead, 1990) gibi enzim aktivitelerinin çoğuna rumen bakterilerinin de katkıda bulunmasından dolayı rumen sindiriminde oldukça önemli bir yere sahiptir. Rumen bakterileri karbonhidratların sahip olduğu glikozit bağlar üzerinde etkin bir enzim sistemine sahiptir (Zhao ve ark., 2010). Bu enzim grupları sayesinde bitkisel materyalin yapısında bulunan karbonhidratların hidrolizi ve oluşan ürünlerin fermantasyonu gibi bir çok biyokimyasal reaksiyonların gerçekleştirilmesinde aktif rol oynamaktadırlar (Singh ve ark., 2022). Rumen içerisinde yayılış gösteren bazı rumen bakterileri ve sahip oldukları enzimatik aktiviteleri Çizelge 1.7’de verilmiştir.

Çizelge 1.7. Bazı rumen bakterilerinin sahip olduğu degradatif enzim özellikleri (Choudhury ve ark., 2015)

Enzimatik etkisi	Organizma adı
Asetojen	<i>Acetitomaculum ruminis</i> , <i>Eubacterium limosum</i>
Asit kullanıcı	<i>Megasphaera elsdeni</i> , <i>Wolinella succinogenes</i> , <i>Veillonella gazogene</i> , <i>Micrococcus lactolytica</i> , <i>Oxalobacter formigenes</i> , <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> , <i>Desulfotomaculum ruminis</i> , <i>Succiniclasticum ruminis</i>
Selüloolitik	<i>Fibrobacter succinogenes</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Clostridium cellobioparum</i> , <i>Clostridium longisporum</i> , <i>Clostridium locheadii</i> , <i>Eubacterium cellulosolvens</i>
Hemiselüloolitik	<i>Prevotella ruminicola</i> , <i>Eubacterium xylanophilum</i> , <i>Eubacterium uniformis</i>
Lipolitik	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>
Pektinolitik	<i>Treponema saccharophilum</i> , <i>Lachnospira multiparus</i>
Proteolitik	<i>Prevotella ruminicola</i> , <i>Ruminobacter amylophilus</i> , <i>Clostridium bifermentans</i>
Amilolitik	<i>Streptococcus bovis</i> , <i>Ruminobacter amylophilus</i> , <i>Prevotella ruminicola</i>
Sakkarolitik	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> , <i>Succinivibrio amylolytica</i> , <i>Selenomonas ruminantium</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Bifidobacterium globosum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium thermophilum</i> , <i>Bifidobacterium ruminale</i> , <i>Bifidobacterium ruminantium</i>
Tanilolitik	<i>Streptococcus caprinus</i> , <i>Eubacterium oxidoreducens</i>
Üreolitik	<i>Megasphaera elsdenii</i>

Rumen bakterileri substrat özgülüklerinde büyük farklılıklar gösterir (Cao ve ark., 2021). Rumen bakterilerinin çoğu nişasta, pektin, selüloz, hemiselüloz ve lipitler dahil olmak üzere polimerlerin hidrolizi ile bitki materyalinden serbest bırakılan monomerleri veya oligomerleri kullanabilme özelliğine sahiptir (Warren, 1996). Polimer hidrolizde görevli olan rumen bakterileri, hidroliz yoluyla açığa çıkan monosakkarit veya diğer organik bileşikleri fermente edebilirler (Owens ve Basalan, 2016). Bunlar arasında nişasta ve yadımlama ürünlerini kullanan *Ruminobacter amylophilus* ve selüloz ve ürünlerini kullanan *Fibrobacter succinogenes* türler ön plana çıkmaktadır (Burnet ve ark., 2015). Ayrıca Ekinci ve ark. (2001) *Ruminococcus flavefacies* suşları üzerinde yapmış olduğu çalışmada selüloz ve hemiselülozun hidrolizini sağlayan enzim gruplarının tespitini ve bu enzimlerin çalışmasına etki eden çevresel faktörlerin netlik kazanmasını sağlamıştır. Buna karşılık *Butyrivibrio fibrisolvens* suşları, hidroliz ürünleri üzerinde büyüyen nişasta, selüloz, ksilan ve pektin dahil olmak üzere bir dizi substratı hidrolize edebilen diğer bakteri grubu olarak ifade edilebilir (Kasperowicz ve ark., 2016).

Kompleks yapılı karbonhidratların hidrolizi dışında rumende fermentasyon sonunda oluşan süksinat gibi ürünler *Selenomonas* sp.'ye ait bakteriler tarafından probiyonat gibi farklı bir ürüne dönüştüren bir dizi enzim grubuna sahiptir (Wang ve ark., 2012). Aynı zamanda *Selenomonas* sp.'ye ait bazı suşların sahip olduğu β -d-ksilozidaz/ α -l-arabinofuranosidaz enzim etkinliği endüstriyel alanlarda etanol üretiminde aktif olarak kullanılmaktadır (Dehnavi ve ark., 2016).

Rumen bakterilerinde glikozit hidrolaz etkinliği dışında farklı substratlara etki eden fitaz, üreaz ve lipaz gibi enzimlerde mevcuttur (Jain ve Singh, 2016). *Selenomonas ruminantium*'un diğer rumen bakterilere oranla yüksek miktarda fitaz enzimi sekrasyonuna sahip olması (Yanke ve ark., 1998) sayesinde fitik asit gibi bileşiklerin yadımlanmasını hızlandırmaktadır. Buna benzer çok farklı yapıdaki enzim gruplarının özellikleri ve genetik yapılarının araştırılabilmesi için DNA dizilemesi ile birlikte görevli bölgenin klonlanması gerçekleştirilmiştir (Kobayashi ve Onodera, 1999). Klonlama çalışmaları sayesinde *Streptococcus bovis*'in nişastayı hidrolize edebilmesi ve hidrolizinde görevli olan amilaz geninin karakterizasyonunu gerçekleştirilmiş ve bu gene ait katalitik domain bölgesi hakkında net bilgiler ortaya çıkmıştır (Cotta ve Whitehead, 1993). Enzim sentezinde görevli olan gen bölgelerinin karakterizasyon çalışmalarının hızlanmasıyla beraber Ekinci ve ark. (1997)'da *S.bovis*'e ait olan β 1-3/1-4 glukanaaz geninin klonlanması ve rekombinant plazmitlerin (pTRW10 veya pIL253) farklı mikroorganizmalara aktarılması sonucu bu bölgenin ekspresyonu hakkında bilgi vermişlerdir.

Rumen bakterilerini sahip olduğu enzim bölgeleri üzerinde yapılan çalışmalar sırasında gen klonlaması ve ekspresyon vektörlerinin araştırmaları da gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda Teather (1982) tarafında ilk doğal plazmit izolasyonu *Butyrivibrio* sp.'ye ait cinsten elde edilmiş, halen bu cinse ait çok sayıda plazmit izolasyonu gerçekleşmeye devam etmektedir (Mann ve ark., 1986; Teather, 1992; Hefford ve ark., 1997). Daha sonraki dönemlerde artan çalışmalar sayesinde *Selenomonas* sp.'ye ait plazmid izolasyonu ve karakterizasyonu da gerçekleştirilmiştir (Martin ve Dean, 1989; Attwood ve Brooker, 1992).

1.12. Rumen Bakterileri ve Glikozit Hidrolaz Enzimleri

Doğada en fazla miktarda bulunan biyopolimer yapılı selüloz bileşiği selülotik bakterilerin sahip olduğu selülaz (EC.3.2.1.4) enzimi sayesinde katabolize olabilmektedir (Sadhu ve Maiti, 2013). Bu polisakkarit ayrıca, hem farklı polimer düzenlemeleri (kristalin, yarı kristalin ve amorf) hem de fermentasyon bağlamında serbest monosakkarit birimleri bakımından endüstriyel öneme sahiptir (Ruiz ve ark., 2016). Aynı zamanda diğer kompleks yapılı polisakkaritler ile olan ilişkisinden dolayı selülaz enzimleri glikozit hidrolaz ailesine bağlı enzim etkinliği ((GH) (EC 3.2.1.-)) ile açıklanabilmektedir (Lombard ve ark., 2014). Selüloz kimyasal olarak basit bir molekül olmasına rağmen (β -1,4-bağı glukosil kalıntıları), bitki hücre duvarından ekstraksiyonu ve yapı taşalarına kadar hidrolizi oldukça zordur. Bu zorluğun en temel nedeni hemiselülozlarla çapraz bağ yapması ve sulu çözeltide düşük çözünürlük göstermesinden dolayıdır (Bayer ve ark., 2004). Bu nedenle, selülazın enzimatik depolimerizasyonu için GH5 ailesine bağlı olan endoglukanazlar (endo- β -1,4-glukanazlar), selobiyohidrolazlar (ekzo-- β -1,4-glukanazlar) ve β -glukosidazların enzimsel aktivitesine ihtiyaç vardır (Cragg ve ark., 2015). Aynı zamanda bitki hücre duvarı bileşenleri arasında bulunan hemiselüloz ve pektin gibi polimerlerinin dallarının ayrılması ve parçalanması için α -l-arabinofuranosidaz, β -d-ksilosidaz, α -l-arabinanaz ve β -d-galaktosidaz enzimleride etkin bir göreve sahiptir (Mewis ve ark., 2016). GH43 ailesine üye olan bu enzim gruplarının etkinliği rumen bakterilerinde de mevcut olduğu bilinmektedir. Rumende yayılım gösteren bazı rumen bakterileri ve glikozit hidrolaz enzim grupları Çizelge 1.8'de verilmiştir.

Çizelge 1.8. Bitkisel materyalin hidrolizde görev alan ve glikozit hidrolaz enzim aktivitesi gösteren bazı rumen bakteri isimleri, sahip olduğu enzim ismi, Uniprot ID ve referans bilgileri

Organizma adı	Enzim ismi	Uniprot ID	GH	Referans
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Endo- β -1,4-glukanaz	P22541	GH 5	Hazlewood ve ark.,1990
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Endo- β -1,4-glukanaz	P20847	GH 5	Berger ve ark.,1989
<i>Clostridium ongisprium</i>	Endo- β -1,4-glukanaz	P54937	GH 5	Mittendorf ve ark.,1993
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Endo- β -1,4-glukanaz	P14250	GH 5	McGavin ve ark.,1989
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Endoglukanaz	066065	GH 5	Cho ve ark.,2000
<i>Prevotella bryantii</i> B14	Arabino-furanohidrolaz	D7SFH6	GH 43	Dodd ve ark.,2010
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Arabino-furanosidaz	052575	GH43	Whitehead ve Cotta,2001
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Arabino-furanosidaz	C9RS26	GH43	Yoshida ve ark.,2010

GH:Glikozit hidrolaz(<http://www.cazy.org/>)

Glikozit hidrolaz enzim gruban ait enzim çalışmalarına ek olarak Hungate (1950) tarafından rumende bulunan baskın selülotik bakteriler *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus* ve *Ruminococcus flavefaciens* olarak sınıflandırıldı. Fakat yapılan moleküler çalışmalar (16SrRNA bölgesi) sonucunda *Bacteroides succinogenes* türünün aslında *Fibrobacter* sp. cinsine ait olduğu tespit edilerek yeniden sınıflandırılmıştır (Montgomerly ve ark., 1988). Rumen içerisinde sellozun hidrolizde görevli olan predominant ve sekonder bakteri türleri de mevcut olmaktadır. Bu bakteri türlerinin karşılaştırılması Çizelge 1.9’da verilmiştir (Weimer, 1996).

Çizelge 1.9. Rumende bulunan baskın (predominant) selülotik ve ikincil (sekonder) selülotik bakteri türlerinin karşılaştırılması(Weimer,1996)

Karakteristik yapı	Predominant	Sekonder
Örnek Türleri	<i>Fibrobacter succinogenes</i> <i>Ruminococcus albus</i> <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>Butyrivibrio fibrosolvens</i> <i>Clostridium longisprium</i> <i>Clostridium lacheadii</i>
Bitkisel materyale tutunma	Glikokaliks yüzeyinden	Minimal bağlanma
Selülaözlerinin lokasyonu	Hücre yüzeyine	Ekstraselüler bölme

Predominant yapıları selülotik rumen bakterileri (SRB) bitki hücre duvarına tutunma ve hidrolize edebilme özelliklerinin diğer rumen bakterilerine oranla yüksek düzeyde olduğu *in vitro* bağımsız kültür çalışmalarında gösterilmiştir (Mosoni ve ark., 1997; Pegden ve ark., 1998). Bu bakterinin bitkisel substrata yapışmasına etki eden faktörler arasında bakterinin yaşı, glikokaliks durumu, mikrobiyal rekabet, kütikül koruması, yüzey alanı, hidrasyon, iyon yükü dahil olmak üzere substratın doğasıyla ilgili faktörler ön plana çıkmaktadır (Miron ve ark., 2001). Bitki hücre duvarının diğer ana bileşeni olan hemiselülozlar β 1-4 glikozit bağı ile oluşan ksilanlar (Rennie ve Scheller, 2014),

glikomannanlar (Gille ve ark., 2011) ve arabinogalaktan (Murzin ve ark., 2015) gruplarından meydana gelmiştir. Hemiselüloz yapının farklı gruplar içermesinde kimyasal olarak ana omurgaya bağlanan yan zincir, lokasyon şekli ve glikozit bağ çeşidi önemli bir yer almaktadır (Ebringerova, 2005). Rumen bakterileri sahip oldukları glikozit hidrolaz enzim etkinlikleri sayesinde glikozit bağlar üzerinde aktif rol oynayan rumen mikrobiyom üyesidir. Hemiselülotik enzim aktivitesi gösteren *Prevotella* sp.'nin cinsleri, *Butyrivibrio fibrisolvens* türü (Emerson ve Weimer, 2017) ve *Eubacterium* sp.'ye ait bazı türleri (Kamra, 2005) hemiselülozu hidrolize eden rumen bakterileri olarak rapor edilmiştir. Pektin bitki hücresinde bulunan yapısal ve işlevsel olarak en karmaşık diğer bir polisakkarittir (Mohnen, 2008). Pektin substratı üzerinde etkili ve bu organik bileşiğin hidrolizinde görevli olan pektinazlar biyoteknolojik karakteri sayesinde gıda ve içecek sektöründe kullanılan enzimlerin %25'lik kısmını oluşturmaktadır (Amin ve ark., 2019). Rumen içerisinde pektinaz aktivitesinin yüksek olduğu bilinen *Treponema saccharophilum* (Liu ve ark., 2014) ve *Lachnospira multiparus* (Kamra, 2005) türleri mevcuttur.

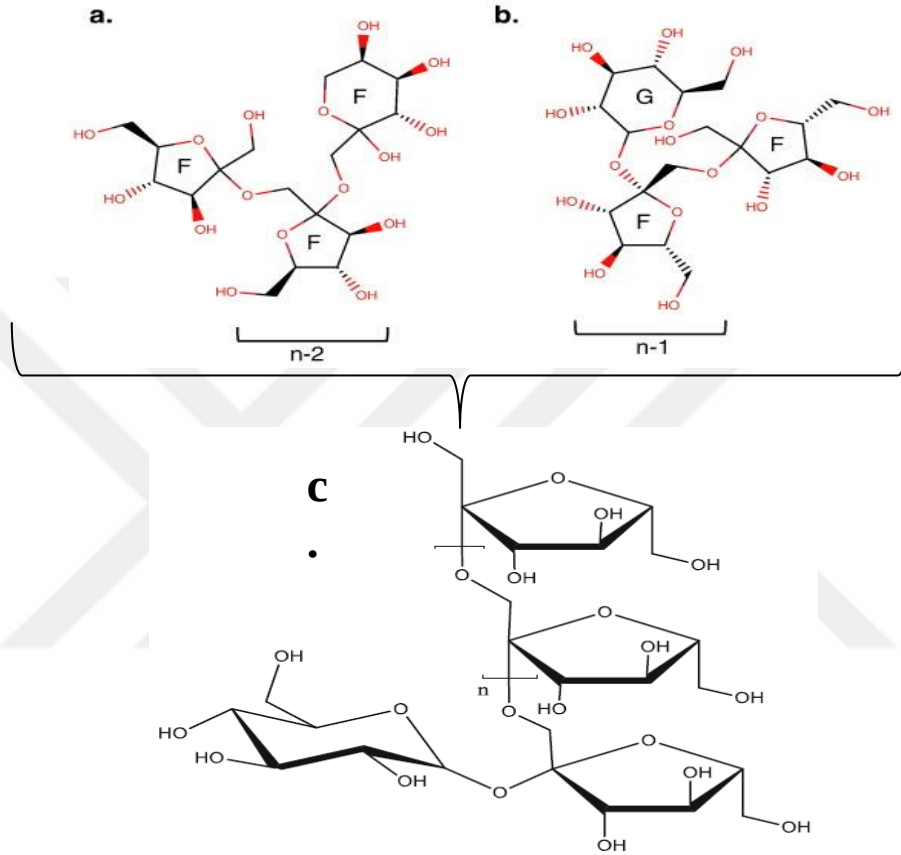
1.13. Mikrobiyal İnülinaz

İnülinazlar, fruktoz veya fruktooligosakkaritler üretmek için inülinin yapısında bulunan β -2,1 bağları üzerinde etkili olan bir enzimdir (Singh ve ark., 2017). Bu enzimmaya, mantar ve bakteri gibi mikrobiyal kaynaklı olabilmektedir (Singh ve ark., 2017; Temkov ve ark., 2018; Das ve ark., 2019). Bakteriyel inülinazlarla ilgili veriler, diğer mikrobiyal kaynaklarla karşılaştırıldığında azdır. Bakterilerden inülinaz verimi, inülinazların mantar ve maya kaynaklarına kıyasla çok daha azdır (Singh ve ark., 2017). Ancak basit moleküler organizasyonları ve yüksek termostabilite yeteneklerinden dolayı bakteriyel inülinazlar endüstriyel alanda daha fazla tercih edilmeye başlamıştır (Singh ve ark., 2017; Boger ve ark., 2018; Fachrial ve ark., 2021). İnülinazlar, esas olarak yüksek fruktoz şurubu (Singh, 2011; Magadum ve Yadav, 2018), fruktooligosakkaritler (de Moura ve ark., 2015; Cano ve ark., 2020), biyoetanol (Hu ve ark., 2012; Khatun ve ark., 2017), biyoyakıtlar (Chi ve ark., 2011; Ni ve ark., 2019) gibi karbonhidrat türevli ürünlerin üretimi için kullanılan çok yönlü endüstriyel enzim sınıfıdır.

1.13.1. İnülin

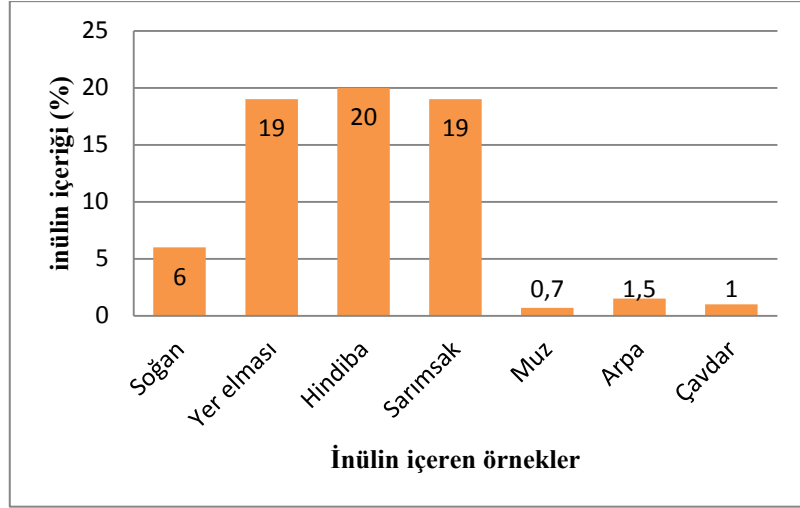
İnülin, esas olarak terminal ucunda bir glikoz ünitesine bağlı lineer β -2, 1-D-fruktofuranozdan oluşan bir fruktan polimeridir (Mensink ve ark., 2015; Redondo-Cuenca

ve ark., 2021). Glikoz molekülü tipik olarak fruktoz zincirinin sonunda sakkarozda olduğu gibi bir α (1-2) bağı ile bağlanır. Oluşan bu polimer yapıdaki fruktanların zincir uzunlukları 2 ila 60 birim arasında değişmektedir (Heyer ve ark., 1998; Franck, 2002; Zhang ve ark., 2020). İnülinin yapısı Şekil 1.17’de verilmiştir. Nişastadan sonra en fazla bulunan depo polisakkariti olan inülinin 10 fruktoz molekülünden meydana gelmiş olan yapısı oligofruktoz olarak tanımlanmaktadır (Zhu ve ark.,2016).



Şekil 1.17. İnülin yapısı. a. Sadece fruktosil kalıntıları içeren inülin molekülü. b. Zincirin sonunda bir glikoz birimi içeren inülin molekülü. c. İnülin genel kimyasal yapısı

Hayvan beslemede prebiyotik kaynağı olan inülin hindiba kökü, sarımsak, kuşkonmaz kökü, dulavratotu kökü ve karahindiba kökü, sarımsak, muz, soğan, pırasa, buğday, çavdar ve arpa gibi bitkisel kökenli besinlerde mevcuttur (Mensink ve ark., 2015). İnülin içeren bazı bitkisel örnekler ve inülin oranları Şekil 1.18’de verilmiştir.

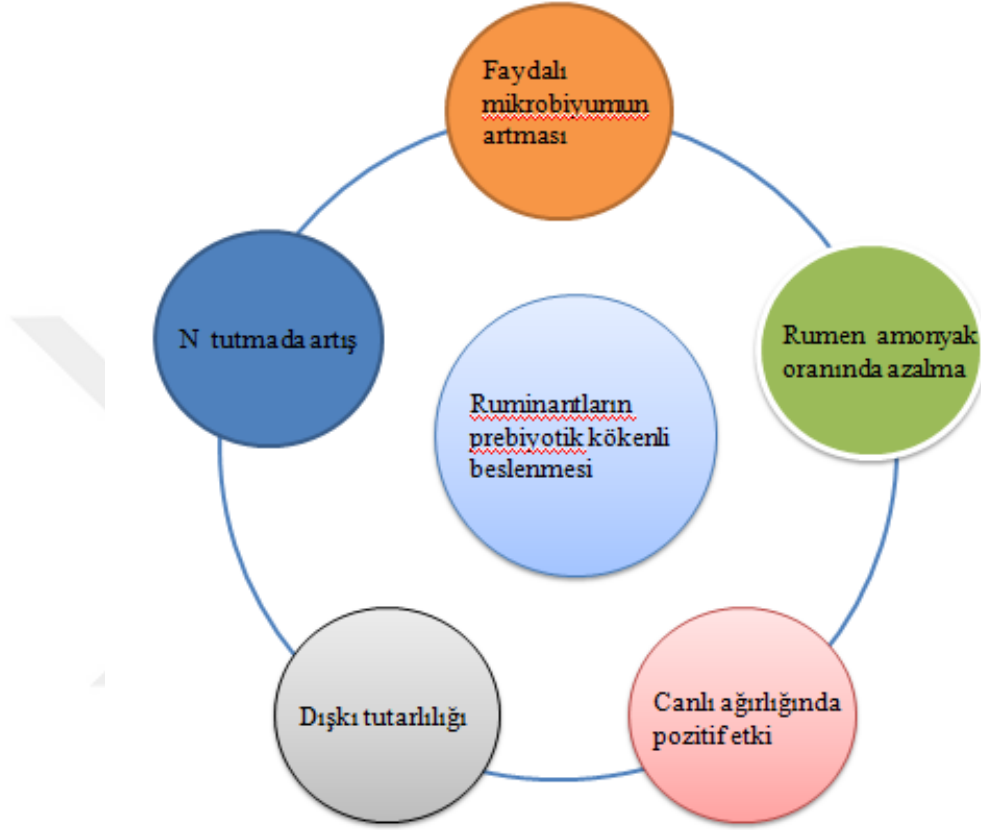


Şekil 1.18. İnülin içeren bazı bitkisel örnekler ve inülin oranları (Roberfroid,2005)

Prebiyotiklerin insan sağlığı, özellikle de bağırsak mikrobiyal ekolojisi üzerindeki pozitif etkileri sonrasında, ruminant canlılar üzerinde etkisi için sığır, manda, koyun vb. gibi farklı hayvan türleri üzerindeki potansiyeli keşfedilmiştir (Fraser ve ark., 1998; Weary ve Chua, 2000). Ruminantlar, süttten kesme, ishal, büyümenin baskılanmasına, bağırsak morfolojisinin bozulmasına neden olan farklı streslere maruz kalmaktadır. Bu gibi durumlarda, prebiyotik yoluyla ekolojik tedavi, ruminant sindirim kanalı ile ilgili sorunlarının üstesinden gelmek için alternatif bir yöntem olabilir (Wearyve Chua, 2000). Özellikle prebiyotik kökenli inülin ve oligofruktozun herbivor hayvanların beslenme pogramnda bulunması ile bu canlıların sindirim kanalında bulunan patojen bakteri aktivitesini baskılayan ve toksik fermentasyon ürünlerinin oluşumunu azaltan *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* cins popülasyonunu artırma özelliğine sahiptir (Samanta ve ark., 2013). Aynı zaman da prebiyotik katkı maddesi ile beslenme yapan ruminant hayvanların rumeni içerisindeki amonyak üreten canlıların baskılandığı bunun sebebi olarak mikrobiyal protein sentezi için amonyağın kullanılmasına bağlı olduğu düşünülmüştür (Mwenya ve ark.,2004; Torres ve ark.,2010). Artan mikrobiyal protein sentezi sayesinde daha yüksek azot tutma eğiliminin olduğu da bilinmektedir (Santoso ve ark., 2003; Sar ve ark., 2004; Samanta ve ark., 2013).

İnülinin geniş getiren buzağıkların süt ikame maddesine dahil edilmesi, önemli ölçüde yüksek canlı ağırlık artışına ve daha iyi dışkı kıvamına yol açmaktadır (Kaufhold ve ark., 2000; Drackley, 2008; Samal ve Behura, 2015).Herbivor canlılarda meydana gelen vücut ağırlığındaki artışın, sindirim kanalında artan fermentasyon ve buna bağlı olarak artan mikrobiyal nitrojenin rumende stabil mikroflora bileşimine katkı sağlamasına bağlı olabileceği varsayılmaktadır (Verdonk ve ark., 1998; Tóth ve ark., 2020). Prebiyotiklerin

tüketilmesi ve fermentasyonlarının ardından ortaya çıkan faydalı etkiler dikkate alındığı zaman hayvan beslenmes rasyonuna % 0,5'lik bir konsantrasyonda fruktooligosakkaritlerin dahil edilmesi rumen metabolik profilinin modülasyonuna önemli ölçüde fayda sağlamıştır (Samanta ve ark., 2012).Ruminantlarda prebiyotik tüketiminin etkisine ilişkin şematik diyagramyapısı Şekil 1.19'da gösterilmiştir.



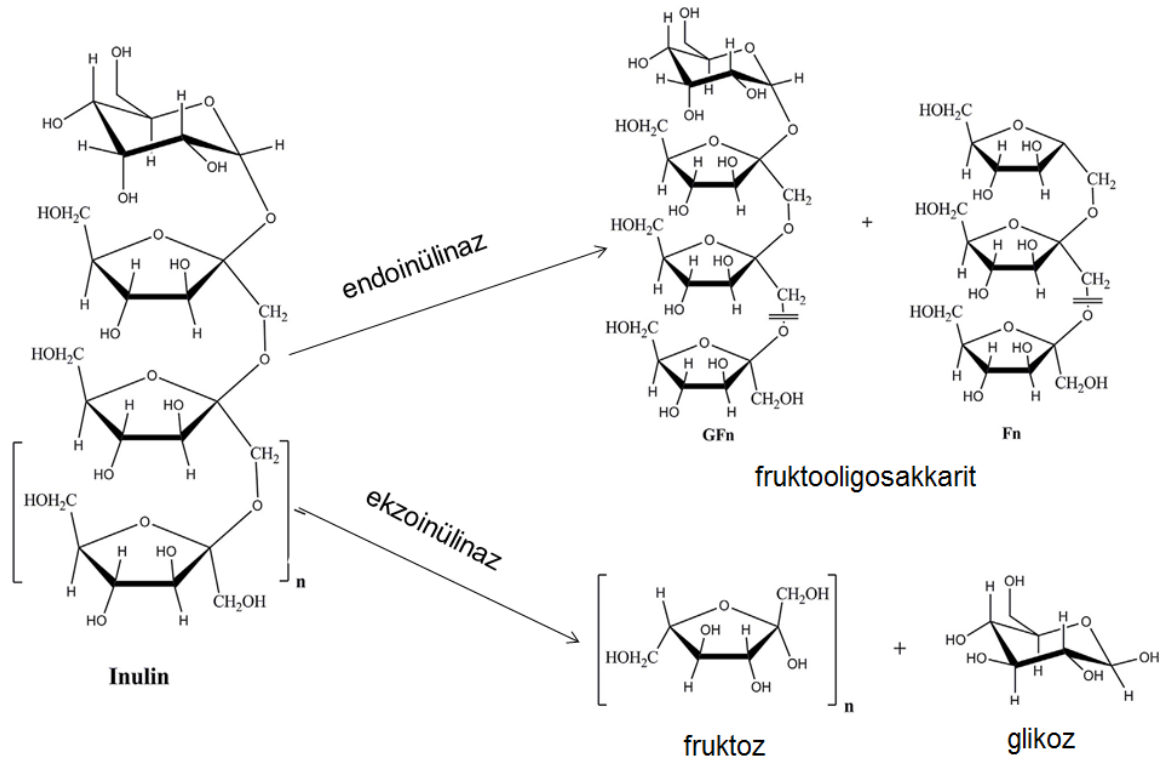
Şekil 1.19. Ruminantlarda prebiyotik tüketiminin etkisine ilişkin şematik diyagram (Samanta ve ark., 2013)

1.13.2. İnülinaz

Lignoselülotik enzimler dışında inülin kökenli substratların hidrolizini sağlayan mikrobiyal inülinaz enzim grupları da ön plana çıkmaya başlamıştır. Mikrobiyal inülinaz yardımıyla inülin substratı yapı taşları olan fruktoz, glukoz ve fruktooligosakkaritlere kadar hidrolize olabilmektedir (Mohan ve ark.,2018). İnülin etkili enzimler, glikozit hidrolaz (GH32 ve 91) ailesine ait önemli bir endüstriyel enzim sınıfıdır. GH32 ve 91 ailesine ait inulinazlar, invertaz, 1-ksohidrolaz, inulin liyaz, levanazlar, β -fruktofuranosidaz, fruktan-fruktosiltransferazlar ve sakkaroz-fruktosiltransferazları içeren binlerce glikozit hidrolaz enzimini temsil eder (Ma ve ark., 2020; Germec ve ark., 2020;

He ve ark., 2022). GH32 enzimleri çeşitli organizmalarda çok çeşitli substrat spesifikliği ve farklı işlevler gösterir (Bujacz ve ark., 2011).

İnülinazlar inülin içerisinde bulunan β -2,1 glikozit bağları üzerinde etkinlik göstermektedirler (Hoshida ve ark., 2018; Kusmiyati ve ark., 2020). İnülinazlar hem uzun zincirin hidrolizini sağlayan endoinülinaz (EC 3.2.1.7) (β -2-1-d-fruktan fruktanohidrolaz) hem de terminal uçta bulunan glikozit bağının hidrolizini sağlayan ekzoinülinaz (EC 3.2.1.80) (fruktan β -fruktosidaz) aktivitesine sahip iki enzim grubundan oluşmaktadır (Chi ve ark., 2011). İnülinin inülinazlar tarafından parçalanma modeli Şekil 1.20’de verilmiştir.



Şekil 1.20. İnülinin inülinazlar tarafından parçalanma modeli (Singh ve ark.,2017)

Ekzoinulinazın aynı zamanda invertaz (EC3.2.1.26, - β -fruktofuranosidaz) aktivitesine de sahip olduğu bilinmektedir. Çünkü enzimin sahip olduğu aktif bölge fruktanların yanı sıra sakkarozun hidrolizinden sorumludur (Fleming ve ark., 1979).İnvertaz, sakkarozun β (2-1) glikozidik bağının hidrolizini katalize ederek, glikoz ve fruktozun bir karışımı olan invert şekeri serbest bırakır. *Bifidobacterium* cinslerinde bulunan β -fruktofuranosidaz aktiviteleri üzerine yapılan araştırmalar da fruktofuranosidaz enzimlerini sadece sakkarozu değil aynı zamanda fruktooligosakkaritleri parçaladığını göstermesiyle ispatlanmıştır (Imamura ve ark., 1994; Warchol ve ark., 2002; Ehrmann ve ark., 2003). Benzer substrat spesifikliği nedeniyle inülinaz ve invertaz (S) aktivitesini ayırt

etmek oldukça zordur. Ancak inulinaz/invertaz aktivite oranı (I/S oranı) bu iki enzimi ayırt etmek için ağırlıklı olarak kullanılmaktadır. Bu oran 10^{-2} 'den büyük ise inulinaz, 10^{-4} 'den düşük ise invertaz (S) aktivitesi olarak kabul edilmektedir (Ettalibi, ve Baratti,1987; Naidoo ve ark., 2009; Germec ve Turhan, 2021). Ancak inulinaz aktivitesinin tespiti için her zaman enzimatik hesaplama ihtiyacı duyulmamaktadır. Çünkü lugol iyodin plak testleri (Li ve ark., 2011; Ojwach ve ark., 2020), ince tabaka kromatografik yöntemler (Temkov ve ark., 2018; Das ve ark., 2020; Ojwach ve ark., 2020) ve HPLC (Huang ve ark., 2021; Stojanović ve ark., 2022) gibi farklı analizler yardımıyla da enzim etkinliği tespit edilebilmektedir.

1.13.3. Bakteriyel inulinazlar

Bakteriyel inulinaz üretiminde aksaklıklar olmasına rağmen (Singh ve ark., 2017) *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Xanthomonas* sp., *Clostridium* sp. gibi bazı bakteri suşlarının inulinaz enzimi ürettiği rapor edilmiştir (Mazutti ve ark., 2010). Ancak en önemli bakteri grubu olan *Bifidobacterium* sp. cinsleri, güçlü inulinaz üreticisi olarak ortaya çıkmış ve inülin tipi fruktanları fermente edebilen hücre içi β -fruktofuranosidaz aktivitesi göstermiştir (Warchol ve ark., 2002; Flint ve ark., 2012; Gu ve ark., 2022). Ayrıca rumen içerisinde yayılmış gösteren *Pseudobutyrvibrio ruminis* bakterisine ait 3 farklı suşun da β -fruktofuranosidaz aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir (Kasperowicz ve ark., 2012). Ek olarak *Pseudobutyrvibrio ruminis*'in, inülin tipi fruktanlarının sindirimini ve kullanımını sağlayan endo-levanaz ve β -fruktofuranosidaz sentezlediğini (Kasperowicz ve ark., 2010b) ve fruktanolitik özelliklerin ayrıca *Streptococcus bovis* (Thomas, 1960) ve *Treponema zioleckii*' gibi türlerde de olduğu rapor edilmiştir (Kasperowicz ve ark., 2010a). İnülin tipi fruktanların hidrolizinde görevli olan β -fruktofuranosidaz enzim aktivitesine sahip *Butyrvibrio fibrisolvens* 3071 suşunda bu enzimin optimum düzeyde çalıştığı pH 6.0 sıcaklığın ise 40°C olduğu tespit edilmiştir (Kasperowicz ve ark., 2016).

Rumendeki bazı bakterilere ait β -fruktofuranosidaz enzim aktivitesinin optimum çalıştığı pH ve sıcaklık düzeylerinin birbirine yakın olduğu gözlemlenmiş ve *Pseudobutyrvibrio ruminis*'in optimum pH aralığı 5.5-6.5 sıcaklık ise $40-50^{\circ}\text{C}$ (Kasperowicz ve ark., 2010b), *Treponema zioleckii* pH 6.0 sıcaklık ise 40°C (Kasperowicz ve ark., 2010a) olduğu rapor edilmiştir. Fontana ve ark. (1994) farklı bakteriyel kökenli bu enzimin optimum düzeyde çalıştığı pH aralığının 4.8-7.0 sıcaklığın ise $30-60^{\circ}\text{C}$ arasında olduğunu göstermişlerdir. Enzimin çalışması üzerinde etkili olan bazı iyonlardan Mn^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} (Byun ve Nahm, 1978; Singh ve ark.,2007) Mg^{+2} , Fe^{+2} ve K^{+} (Vandamme ve

Derycke 1983; Singh ve ark., 2019) iyonların enzimin çalışması üzerinde aktivatör etkiye sahiptir. Hg^{+2} , Cu^{+2} (Kaur ve ark.,1992) ve Ag^{+2} (Sheng ve ark., 2008) gibi iyonlarda inhibitör etkiye sahiptir. Ancak ekstrem koşullarda gelişim gösteren bakterilerin de inülinaz aktivitesine sahip olduğu ve bu mikroorganizmalardan salınan enzimin yüksek sıcaklık ve pH gibi ortamlarda etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. *Marinimicrobium* sp.'nin alkali (pH 9.0) koşullarında (Li ve ark., 2012), *Bacillus stearrowthermophilus* (Keto ve ark., 1999) ve *Bacillus smithii* (Gao ve ark., 2009) gibi türlerden salgılanan enzimin ise 75°C'de aktivite gösterdiği bilinmektedir. Ekstrem koşullarda çalışabilme özelliğinden dolayı inülinaz gen bölgesinin klonlanması sayesinde enzimin deterjan, tuz, proteaz ve tripsin gibi bileşiklere toleranslı rekombinant inulinaz üretimi de gerçekleştirilmektedir (Zhou ve ark., 2015). *In vitro* koşullarda inülinaz enzim üretiminde basal besiyeri koşullarıoldukça önemli faktörlerdir. Bundan dolayı çeşitli bakteriyel inülinaz üreticilerinin, inülinaz biyosentezi için tek karbon kaynağı olarak inülin/inülininden zengin bitki özleri, sakaroz ve nişastayı kullandıkları rapor edilmiştir (Franck, 2002).

1.13.4. Endüstriyel inülinaz ve kullanım alanları

Endüstriyel dünyada 'enzim endüstrisi' oldukça hızlı büyümekte ve endüstriyel boyutta oldukça önemli bir yer almaya başlamıştır (Fifendy ve ark., 2021). İnülinaz enzimi de bu sektörde gerek gıda gerekse gıda dışı alanlarda aktif olarak görev almaktadır (Singh ve ark., 2018). Özellikle yüksek fruktoz şurubu olarak bilinen doğal bir tatlandırıcı olan fruktoz üretimini artırmaktadır (Neeraj ve ark., 2018). Fruktoz düşük kalorili en tatlı doğal şeker olmakla birlikte eşit miktarlarda geleneksel şeker olan sakkarozdan 1,5 ila 2,0 kat daha tatlıdır. Ayrıca insan vücudunda önemli fizyolojik rollerinden bazıları, glikozun metabolik yolunu atlamayı, düşük glisemik indeksi, demir-şelat kompleksi oluşturarak demirin biyoyararlanımını arttırması, etanol metabolizmasını hızlandırması gibi etkileri mevcuttur (Singh ve Chauhan, 2018). Buna ek olarak inülinaz enziminin inülin hidrolizini gerçekleştirmesi ile fruktooligosakkarit (FOS) üretimi de gerçekleşmektedir. FOS'ler günümüzde prebiyotik kategoriye hakim olan ve fonksiyonel gıda etkileri ile tanınan kısa zincirli karbonhidratlardır (Ruiz-Aceituno ve ark.,2018). İnsan sağlığı üzerindeki etkileri dışında biyoetanol (Milek, 2020; Huang ve ark., 2021), bütandiol (Dai ve ark., 2020; Guo ve ark., 2022) ve laktik asit (Das ve ark., 2019) gibi endüstriyel alanın farklı dallarında aktif olarak kullanılmaktadır.

1.14. Çalışmanın Kapsamı ve Önemi

Biyoteknolojik araştırmalar genellikle uygun biyolojik materyalin optimum düzeyde bir araya getirilmesi ve pozitif anlamda net bir sonuç alınması ile birlikte gelişimini devam ettirmektedir (Bull ve ark., 1992). Bundan dolayı biyolojik katalizör olarak görev yapan enzimler modern endüstrinin teknolojisinde aktif olarak rol alan organik bileşiklerdir (Bull ve ark., 2000). Mevcut endüstrinin farklı alanlarında görev alan enzimlerin etkin katalitik özelliklerinden dolayı kullanımı her geçen gün giderek kullanım alanı artmaktadır (Kirk ve ark., 2002). Bundan dolayı çalışmamızda biyoteknolojik potansiyeli olan ksilanaz, selüloz ve inülinaz enzimlerin rumende yayılım gösteren rumen bakteri ve rumen funguslarında taranması ve mikroorganizmalarda taranması sağlanmıştır. İlgili enzimlerin ve bu enzimi sentezleyen mikroorganizmaların endüstriyel ve biyoteknolojik alanlarda alternatif bir kaynak olarak kullanılması çalışmanın önemine büyük bir katkı sağlamıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Anaerobik gut fungusların sahip olduğu fibrolitik enzim aktiviteleri ve günümüzde halen devam eden yeni rumen fungus keşifleri sayesinde bu mikroorganizmaların sahip olduğu enzimatik yapı endüstriyel alanlarda kullanıma başlamıştır. Biyoteknolojik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalara alternatif aday mikroorganizma arayışının da sürmesi rumen fungusları için yeni bir çalışma alanı ortaya çıkarmaya başlamıştır.

Orla-Jensen (1919)'nın izole ettiği rumen bakterisi sayesinde bu prokaryot canlıların herbivor hayvanların sindirim kanalındaki görevi ve sahip oldukları enzim aktiviteleri üzerinde çalışmalar başlamıştır. Enzim çalışmaları sayesinde endüstriyel alanlarda kullanılan enzimlerden bazılarına sahip olduğu ve bu enzimlerin saflaştırılmasının önemli olduğu bilinmektedir.

Bu bölümde endüstriyel alanda tercih edilen bazı enzimlerin ve bu enzimleri sentezleyen bazı rumen fungusları ile rumen bakterinin enzimoloji üzerinde yapılan çalışmalara değinilmiştir.

2.1. Anaerobik Gut Fungus ve Enzimleri

Mountfort ve ark. (1985), *Neocallimastix frontalis*'e ait olan PN-1 suşunu küçük baş rumeninden, PN-2 suşunu ise sığır rumeninden izole ederek hidroliz enzimlerinin aktivitelerini incelemişlerdir. Karboksimetil selüloz (KMSaz) enziminin her iki suş için optimum pH'ını 6.0 ve optimal sıcaklığın 50°C olduğu rapor etmişlerdir.

Lowe ve ark. (1987), *Neocallimastix* sp.'ye benzeyen bir rumen fungusuna ait selülotik ve ksilanotik enzimlerin aktivitelerini araştırmışlardır. Substrat olarak kullanılan Karboksimetil selüloz, sellobiyoz ve filtre kağıdı üzerindeki enzimatik aktivitelerinin optimum pH koşulunu sırasıyla 6.0, 5.5 ve 6.0 şeklinde tespit etmişlerdir. Ksilanaz aktivitesi için optimum pH'ın 6.0 ve sıcaklığın ise 50°C olduğunu da rapor etmişlerdir.

Hébraud ve ark. (1988), *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* ve *Piromonas communis*'i selülotik substrat kullanarak *in vitro* koşullarda gelişimini sağlamışlardır. İnkübasyon sonrası bu üç mikroorganizmanın sahip olduğu polisakkarit hidrolaz ile glikosidaz enzim etkinliğini tespit etmişlerdir. β -D-glikosidaz (EC 3.2.1.21), β -D-fukosidaz (EC 3.2.1.38), β -D-galaktozidaz (EC 3.2.1.23), β -1,3-glukanaz (EC 3.2.1.6) β -1,4-glukanaz (EC 3.2.1.4) ve β -ksilanaz (EC 3.2.1.8) enzimlerinin optimum *in vitro* sıcaklık

aralığını 50-55°C ve pH'ın 6.0 olduğunu rapor etmişlerdir. Ancak β -ksilosidaz (EC3.2.1.37) için optimal sıcaklık 39 °C ve pH'ın ise 6.5 olduğunu gözlemlemişlerdir.

Mountfort ve Asher (1989), *N.frontalis*'e ait olan ksilanaz (1,4- β -D-ksilan-ksilanohidrolaz, EC3.2.1.8) enziminin üretimi üzerine yaptıkları çalışmada, bu enzimin optimum pH (5.5) ve sıcaklığı (55°C) hakkında net bilgi vermişlerdir. Ek olarak substratın konsantrasyonunda meydana gelen azalma sonucu enzimin optimal sıcaklığının 50°C stabilize olduğu görülmüştür.

Hebraud ve Fevre (1990), *N.frontalis*'e ait olan β -glukosidaz (EC 3.2.1.21) ve β -fukosidaz (EC 3.2.1.38) enzimlerinin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmasında β -glukosidaz için optimum pH'ın 6.0 ve sıcaklığın ise 50°C olduğunu bulmuşlardır. Ek olarak bu enzim için Hg^{+2} iyonunun inhibitör karakterde olduğunu tespit etmişlerdir.

Gilbert ve ark.(1992), *N.patriciarum*'un cDNA kütüphanesinde bulunan ksilanazı kodlayan *xynA* gen bölgesini izole etmişlerdir. Bölgenin *E.coli*'ye klonlanması sonucu elde edilen enzimin herhangi bir selülotik substratı hidrolize etmediği görülmüştür. İzole edilen *xynA* gen bölgesinin 1821 baz çiftlik bölgesinin tek yönlü okuması gerçekleştirilerek bölgenin primer yapısı olarak N-terminal sinyal peptidi ve ardından 225 aminoasit tekrar bölgesi içerdiği rapor etmişlerdir. Ek olarak elde edilen ksilanaz enziminin rumenin doğal florasında bulunan *Ruminococcus flavefaciens* tarafından salgılanan ksilanaz enzimi ile yüksek oranda homolojiye sahip olduğunu da gözlemlemişlerdir.

Tsai ve Calza (1993), *N.frontalis* EB188 suşuna ait selüloz enziminin segrasyon optimizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. EB188 suşuna ait olan zoosporları (2000tfu/ml) pamuk selüloz yapıları karbon kaynağı bulunan besi ortamı ile herhangi bir karbon kaynağı içermeyen besi ortamında geliştirmişlerdir. Karbon kaynağı içeren besi ortamında gelişen EB188 suşunun glukanaaz ve β -glukosidaz aktivitelerinin yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Chen ve ark. (1994), *Orpinomyces* sp.'ye ait olan PC-2 suşuna ait β -glukosidaz (EC 3.2.1.21) enziminin saflaştırılmasını gerçekleştirmişlerdir. Enzimin izolasyon ve saflaştırılmasında iyon değişim kromatografi yöntemini tercih etmişlerdir. Enzimin 84 kDa ağırlığında, 6.0 pH ve 40°C'de optimum düzeyde çalıştığını rapor etmişlerdir. Aynı zamanda bu enzimin çalışmasında Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} ve Ni^{+2} iyonlarının aktivatör, Ag^{+} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+2} gibi iyonların ise inhibitör etkiye sahip olduğunu da tespit etmişlerdir.

Li ve ark. (1997), *Orpinomyces* sp.'ye ait olan *celA* ve *celC* gen bölgelerinin *E.coli*'ye klonlanması sonucu oluşan PC-2 suşu yardımıyla bu iki selülaı kodlayan bölgelerin karakterizasyonu ve enzimlerin optimizasyon işlemini gerçekleştirmişlerdir. *celA* gen bölgesi için 1558 baz çifti uzunluğunda, 459 aminoasitlik bir protein sentezlediğini, *celC*'nin ise 1628 baz çiftlik bir bölge olduğu ve segrasyon sonucu oluşan proteinin 449 aminoasitten meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca *celA* için optimum pH aralığının 4.3 ile 6.8 arasında, sıcaklığın 50°C olduğunu, *celC* için 6.6 ile 7.0 arasında optimal bir pH ile 40°C sıcaklık optimizasyonu olduğunu da bulmuşlardır.

Hodrova ve ark. (1998), *Orpinomyces joyonii* A4 suşu ile *Caecomycetes communis* JB1 suşuna ait olan selülaı enzimlerinin hücre içi, hücre dışı ve periplazmik boşluktaki aktivitelerini kıyaslamışlardır. Sonuç olarak her iki rumen fungusunun hücre dışı enzim etkinliğinin yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir.

Qui ve ark. (2000), *Orpinomyces joyonii* suşuna ait olan SG4'e ait olan *celB29* ve *celB2* gen bölgelerinin segrasyonu sonucu oluşan selülaı enziminin karakterizasyon işlemini gerçekleştirmişlerdir. *celB29* gen bölgesinin 1966 baz çifti uzunluğunda, üretilen protein yapının moleküler ağırlığının 54kDa ve 477 aminoasitten meydana geldiğini, *celB2*'nin ise sırasıyla 1164 baz çifti uzunluğu, 44kDa ağırlığı ve 388 aminoasitten meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Her iki proteinin katalitik domainlerinin yüksek oranda benzerlik gösterdiğini ve kısa zincirli β -1,4-glukanlar için geniş substrat özgüllüğüne sahip olduğunu da bulmuşlardır.

Ye ve ark. (2001), *Orpinomyces joyonii*'den izole edilen *celB* geni ile elde edilen rekombinant *E. coli*'den HighQ ve hidroksipatit kromatografi yöntemiyle 88 kat saflaştırma işlemini gerçekleştirmişlerdir. Saflaştırma işlemi sonucu elde edilen enzim β -glukan, liken, karboksimetil selüloz (KMS) ve ksilan substratlarının hidrolizinde yüksek bir aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ek olarak elde ettikleri enzimi poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) tek bir bant olarak gözlemleyip, optimum pH (5,5) ve sıcaklığını (40°C) rapor etmişlerdir.

Ekinci ve ark. (2002), *N. patriciarum*'a ait olan *celA* (selülaı) geninin kodlama bölgesini *Ruminococcus flavefaciens* *synD* ve *S.bovis* glukanaz gen bölgelerine ait promotor bölgelerini PTRW10 taşıyıcı vektöre ligasyonu sonucu *celA* geninin ekspresyon hızının yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak *celA* için gerekli olan promotor bölgenin

S.bovis'e ait olduğunu göstererek bu enzim için gerekli olan promotor bölge hakkında bilgi vermişlerdir.

Lee ve ark. (2004), rumende bulunan anaerobik gut funguslar ile rumen mikrobiyal floranın *in vitro* koşullarda fermentasyon hızı, gaz üretimi, enzim etkinliği ve kuru madde miktarındaki etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak rumende yayılış gösteren *Neocallimastix* sp. suşları ve *Piromyces* sp. suşlarının yüksek oranda ksilanaz ve selülaz enzim etkinliğine sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Huang ve ark. (2005), *Neocallimastix frontalis*'e ait olan *Xyn11A* ve *Xyn11B* gen bölgelerini klonlanmışlardır. *Xyn11A* gen bölgesinin iki katalitik domain bölgesi ve iki dockerin bölgesine sahip olduğu, *Xyn11B*'in ise bir katalitik domain ile iki dockerin bölgesi olduğunu tespit etmişlerdir. Dockerin alanlarının delesyonu sonucu elde ettikleri ksilanaz enziminin optimal pH aralığında fazla bir değişme olmadığını, sıcaklık olarak *Xyn11A*'dan sentezlenen enzimin optimal sıcaklık değerinin 55°C'den 60°C'ye *Xyn11B*'in ise sentezlediği enzimde de optimal çalışma sıcaklığının 60°C'den 65°C'ye yükseldiğini rapor etmişlerdir.

Li ve ark. (2007), *Orpinomyces* sp.'ye ait olan adenin-timin (A-T) açısından zengin olan ksilanaz (*XynA*) gen bölgesindeki katalitik alanı ve *cel7A* promotor bölgesini *Hypocrea jecorina*'ya aktarımını gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen dizi *Hypocrea jecorina*'nın *cel5A* bölgesine ligasyon yapıldığı için her hangi bir ksilanaz üretiminin olmadığı tespit edilmiş. Ancak bu bölge arasına yerleştirilen RDKR kodlama dizisi sayesinde ksilanaz sentezinin başladığını gözlemlemişlerdir.

Akyol ve ark. (2009), yaptığı çalışmada *Neocallimastix* sp.'ye ait olan ksilanaz gen bölgesini (*Xyn2A*) *E.coli* 'ye transforme ederek bu bölgenin ekspresyon hızı tespit edilmiştir. Buna göre ksilanaz gen bölgesi doğal olarak bulunan *Neocallimastix* sp.'nin hücre dışı (süpernatant) enzim aktivitesinin yüksek olduğu rekombinant bireyde ise enzim etkinliğinin hücrede daha yüksek oranda olduğunu rapor etmişlerdir.

Özköse ve ark. (2009), *Neocallimastix* sp.'ye ait olan selülaz gen bölgesini fakültatif anaerobik yapılı *Lactococcus lactis* bakterisine elektroporasyon yöntemi yardımıyla aktarmışlardır. Rekombinant bireyin sekresyonu sonucu enzim aktivitesinin düşük olduğu ancak bu bölgenin klonlama işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermişlerdir. Aynı zamanda elde ettikleri rekombinant canlıyı silaj yapımı sırasında

kullanarak asit deterjan lifi (ADF) ve nötr deterjan lifi (NDF) üzerindeki etkisini de rapor etmişlerdir.

Wang ve ark. (2011), rumen fungusların sahip olduğu glikozit hidrolaz (GH) enzim ailesi hakkında yeterli düzeyde veri tabanının bulunmamasının getirdiği zorlukları tespit ederek *Neocallimastix patriciarum*'a transkriptomik ve proteomik yaklaşımlar geliştirmişlerdir. Çalışmalarında β -glukozidaz, endo-1,4- β -ksilanaz, ksilanaz B ve Cel48A ekzogluksanaz enzimlerinin özelliklerini, gen bölgelerinin karakterizasyonunu ve GH ailesine etkilerini rapor etmişlerdir.

Jin ve ark. (2011), *Orpinomyces* sp.'ye ait olan endo- β -1,4-glukanaz genini pPIC9K taşıyıcı vektöre AOX1 alkol oksidaz promotörü ile birlikte klonlamışlardır. Rekombinat DNA *P.pastoris* GS115 suşuna elektroporasyon yöntemi ile entegre edilmiş ve enzim segrasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığını 45°C, pH'ını ise 6.0 olarak tespit etmişlerdir.

Trevizano ve ark. (2012), *Orpinomyces* sp. PC-2 suşundan endo- β -1,4-ksilanaz gen bölgesinin izolasyonu sonucu bu bölgenin error-prone PCR (EP-PCR) yöntemi ile mutasyona uğratılması ile ksilanaz enzim etkinliğini değerlendirmişlerdir. Mutant ve normal segrasyona uğrayan ksilanaz enzimlerinin optimum düzeyde etkinlik gösterdiği sıcaklık 60°C ve pH'ın ise 5-7 aralığında olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak enzimlerin yarılanma ömürlerinde farklılık olduğunu, bu farklılıkta mutant bölgeden sentezlenen enzimlerin daha uzun süre dayanabildiğini rapor etmişlerdir.

Chen ve ark. (2014), *Bos taurus*'dan izole edilen yeni *Orpinomyces* sp.Y102 suşunun sahip olduğu yüksek düzeyde β -glukanaz enzim aktivitesinin tespitini sağlamışlardır. Y102 suşuna ait celC7 gen bölgesinde bir sinyal peptidi (Kalıntı 1-17), bir N-terminali dockerin içeren bir alan ve bir C-terminal selobiyohidrolaz katalitik bölge içeren bir proteini kodlama alanına sahip olduğunu öngörmüşlerdir. *E.coli*'ye transforme olan bu gen bölgesinden 17 inci veya 105 inci nükleotitlerin restriksiyona uğratılması sonucu elde edilen enzimin etkinliğini daha yüksek düzeyde etkinliğinin bulunduğunu, ek olarak elde edilen bu enzimin pH aralığını 5.0 ile 11.0 arasında optimal düzeyde çalıştığını da gözlemlemişlerdir.

Wang ve ark. (2015), *Neocallimastix frontalis*'e ait olan Xyn11B kodon bölgesinin optimizasyon işlemi sonucu bu bölgeyi metilotropik bir maya türü olan *Pichia pastoris*'e aktarmışlardır. Rekombinat klon eldesi için pPIC9K vektör plazmitini kullanmışlardır.

Klonlama sonucu elde edilen pPIC9K-Xyn11Bm rekombinant bölgeden sekresyona uğrayan ksilanaz ekspirasyon seviyesinin 4874.8 U/mL düzeyine kadar çıktığını aynı zamanda reaksiyon süresinin 96 saati sonunda bu oranın 5139.7 u/mL' seviyesinde olduğunu rapor etmişlerdir.

Han ve ark. (2017), *Neocallimastix* sp.'ye ait olan ve glikozit hidrolaz ailesine üye ksilanaz enziminin termostabilitesinin mutajenez yoluyla iyileştirmeye yönelik çalışma gerçekleştirmişlerdir. Endüstriyel alanda çok fazla tercih edilen ksilanaz enziminin kodlandığı XynCDBFV gen bölgesinin C-terminal kısmında bulunan nükleotit dizilerinden 207-NGGA-220 bölgesindeki nükleotit bölgesi mutasyona uğratılarak 207-SSGS-220 şeklinde yeni mutant dizileme elde edilmişlerdir. Mutant bölgeye sahip olan ksilanaz gen bölgesinin (Xyn-MUT rekombinant) daha yüksek oranda termostabiliteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Bu ve ark. (2018), ksilanaz enziminin gıda katkı maddesinde, hayvan yeminde ve hamur ağartma gibi işlemlerde yaygın olarak kullanıldığını ve endüstriyel alanda bu enzimin stabilize edilmesinin oldukça önemli olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmalarında enzimin etkililiğine etki eden sıcaklık değerini 14°C daha yüksek seviyeye çıkarmış ve ksilooligosakkarit hidrolizilasyon işlemini gerçekleştirmişlerdir.

Passarinho ve ark. (2019), ksilanaz enziminin endüstriyel sektörde kullanım oranının artması sonucu bu enzimin ekmek hamuru üzerindeki tekno-fonksiyonel özelliğinin geliştirilmesi için yaptıkları çalışmada *Orpinomyces* sp.'ye ait olan PC-2 suşunda (*xynA*) ksilanaz enziminin spesifik aktivite oranının yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Aktivitenin yüksek olması sonucu *xynA* gen bölgesi *E.coli* 'ye klonlayarak elde ettikleri SM2 mutant ksilanaz enziminin saflaştırılmasını ve karakterizasyonun gerçekleştirmişlerdir. Saflaştırma işlemini gerçekleştirirken *Orpinomyces* sp.'ye ait olan yabani form (SWT) ile rekombinant yapılı SM2 ksilanaz enzim aktivitelerinin kıyaslamasını da göstermişlerdir. Hem SWT hem de SM2 ksilanazlarının hamur hacmini %60 oranında arttırdığını, doku sertliğinin %50 oranında azaldığını ve ekmeğin çiğnenme durumunda ise yaklaşık olarak %40 oranında daha kolay gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.

Zhu ve ark. (2020), fungal ksilanazlar üzerinde inhibitör etkiye sahip olan XIP-1 protein yapının bazı mikroorganizmalara ait olan ksilanaz üretimi sırasında inhibitör karakterde olmadığını, bu mikroorganizmalar arasında *N. patriciarum*'un da bulunduğunu

ifade ederek bu özelliği gösteren gen bölgesinin *Xyn1B* olduğunu ve bu bölgenin endüstriyel kökenli *Tricoderma* sp.'deki varlığını homoloji etmişlerdir.

Wen ve ark. (2021), glikozit hidrolaz ailesinin üyesi olan ksilanaz enzimini *Anaeromyces* sp.'den izolasyonunu gerçekleştirerek biyokimyasal karakterizasyonu ve endüstriyel anlamda ekmek yapımında kullanılması için yaptıkları çalışmada *Anaeromyces robustus* ait olan *xylAr10* gen bölgesi klonlanarak elde edilen rekombinant *Pichia pastoris* GS115 suşundan protein izolasyonu, saflaştırılması ve optiminasyon işlemi gerçekleştirmişlerdir. Ksilanın hidrolizi sonucu elde edilen ksilobiyoz ve ksilotrioz moleküllerini ince tabaka kromatografi (TLC) yöntemiyle tespit etmişlerdir. Saflaştırdıkları enzim ile yapmış oldukları ekmekte sertliğinin azaldığı ve hamurun kalitesinin arttığını da rapor etmişlerdir.

Jaichakan ve ark. (2021), yağı alınmış pirinç kepeği kullanarak *Neocallimastix patricium*'dan elde edilen endoksilanaz enzim aktivitesi yardımıyla likör üretimi gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları bu çalışma ile hem ksilanaz enziminin ticari boyutunu hemde yağı alınmış pirinç kepeğinden endüstriyel boyutta kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Karaman ve ark.(2022), *Neocallimastix* sp.'ye ait olan bazı selülotik enzimlerin aktivitelerini *in vitro* koşullar altında iki farklı besi ortamında kıyaslamasını gerçekleştirmişlerdir. Rumen funguslarının optimum düzeyde gelişim gösterdiği ve enzim aktivitelerinin hesaplanması için kullanılan ve Orpin (1975) tarafından geliştirilen besi ortamı ile genellikle fermantasyon sonucu oluşan gazların değerlendirilmesini sağlayan ve Menke tarafından geliştirilen yapay tükürük olarak kullanılan besi ortamının modifikasyonu sonucu elde edilen iki farklı ortamın ilk kez enzim aktivitelerinin kıyaslanmasını sağlamışlardır. Ksilanaz enzim aktivitesinin değerlendirmesi sonucu Menke'ye ait olan besi ortamındaki enzim etkinliğinin daha iyi sonuç verdiğini rapor etmişlerdir.

2.2. Rumen Bakterileri ve Enzimleri

Cotto ve Zektwanger (1995), ksilanotik bakteri olan *Butrivibrio fibrisolvens* H17C suçu ve ksilooligosakkarit fermente eden *Selenomonas ruminantium* GA192 suşu kullanılarak ksilanın hidrolizini gerçekleştirmişlerdir. *B.fibrisolvens* suşu ile oluşturdukları monokültür çalışmasında ksilanın ksilooligosakkarite kadar hidrolize olduğu, oluşan bu

son ürünün *S.ruminantium* tarafından monomerlerine kadar hidrolize uğradığını tespit etmişlerdir. *S.ruminantium*'un monokültür denemesinde ksilanın hidrolizinitam olarak gerçekleştiremediğini ve yapılan kokültür çalışmalarında oluşan ürünlerin de *B.fibrisolvens* monokültüründen farklı olduğu da rapor edilmiştir.

Ekinci ve ark. (1997),*Streptococcus bovis* JB suşuna ait β -(1,3-1,4)-glukanlara karşı aktif 25-kDa büyüklüğünde hücre dışı enzim etkinliğini tespitini gerçekleştirmişlerdir.. Bu enzimin glikozit hidrolaz familyası 16'ya ait olan spesifik bir β -(1,3-1,4)-glukanazı kodlayan bir gen olduğunu rapor ederek izolasyonunu sağlamışlardır.

Cotta ve Whitehead (1998),*Selenomonas ruminantium*'a ait olan GA192, GA31, H18, HD4, HD1, D, 20-21a, H6a, W-21, S23 ve 5-1 suşlarından ksilooligosakkarit fermantasyon yeteneklerini araştırmışlardır.GA192, GA31, H18 ve D suşlarının arabinoz, ksiloz ve ksilopentoz yoluyla ksilobiyoz oligosakkaritlerini hidroliz ettiğini, diğer suşları sadece monomer bulunan ortamda geliştiklerinin gözlemlemişlerdir. Oligosakkaritleri hidroliz eden suşların bu işlemini ksilosidaz ve arabinosidaz enzimlerinin etkinliği ile gerçekleştirdiklerini rapor etmişlerdir.

Whitehead ve Cotto (2001), *Selenomonas ruminantium*'a ait olan farklı suşların ksilooligosakkarit fermantasyon kapasitesi üzerine yaptıkları çalışmada suşlar arası farklılık tespit etmişlerdir.GA192 suşunun ksilooligosakkarit kullanma yeteneğinin ksilosidaz ve arabinosidaz aktivitelerinin varlığı ile ilişkilendirmişlerdir.GA192'ye ait olan bu enzimlerin gen bölgelerini *E.coli*'ye klon yaparak elde edilen rekombinant yapıdan segrasyona uğrayan enzimlerin ksilanı hidroliz edebildiğini rapor etmişlerdir.

Miyazaki ve ark. (2005), ksilanaz aktivitesinin tespiti için ksilan türevli induksiyon sinyallerinin *Prevotella bryanti*'de bulunan üç farklı ksilanaz genleri (*xynA*,*xynB*,*xynC*) üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir.Karbon kaynağı olarak glikoz bulunan besi ortamında geliştirilen *P.bryanti* üstsel büyüme sonrası bulunduğu ortama suda çözünen ksilan (WS-X) ilavesi yapıldıktan sonra ksilanazın sentezlenmesi için indükleyici göndermişler ve enzim aktivitesinin varlığını tespit etmişlerdir.WS-X'in asit etanol ile çözünmesi sonucu oluşan diğer fraksiyonların ilavesi sonrasında enzim aktivitesinin arttığını gözlemlemişlerdir.

Sawanan ve Kobayashi (2006), Selülitik *Ruminococcus flavefaciens* ile selülitik olmayan *Selenomonas ruminantium* arasında sinerjit fibroliz etkinliğini tespit etmişlerdir.Her bir rumen bakterisi için monokültür çalışması yapılarak *Ruminococcus*

flavefaciens'in lif kaynaklarını ortalama olarak %21-32 arasında hidrolize ettiği,*Selenomonas ruminantium*'un lifi herhangi bir şekilde katabolize edemediğini göstermişlerdir. Ancak *S. Ruminantium* S137 suşu ile birlikte *R. flavefaciens* kokültür çalışmasında lif sindiriminin oldukça yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak *Ruminococcus flavefaciens*'in fibroliz etkinliği sonucu oluşan ürünlerin *Selenomonas ruminantium* suşları tarafından substrat olarak kullanabildiği ve gelişimini sürdürdüğünü gözlemlemişlerdir.

Bruzelle ve ark. (2008), *Selenomonas ruminantium*'un β -D-ksilosidaz gen bölgesine ait olan iki alt bölge üzerine 1,3-bis[tris(hidroksimetil)metiamino] propan'ın inhibitör etkisini araştırmışlardır. Rekabetçi inhibitör olarak bilinen bu kimyasal yapı genellikle katalitik bölge ile hidrojen bağı kurduğunu ve enzimin optimum pKa (asit ayrışma sabiti)'sını 6.8-7.8 arasında olduğu, inhibitörün bağlanması sonucu bu sabitin 9.9'a çıktığını rapor ederek enzim aktivitesinde azalma olduğunu göstermişlerdir.

Kasperowiczve ark. (2010), *Treponema zioleckii* suşuna ait endolevanaz ve β -fruktofuranosidaz enzim etkinliğini tespiti için fruktan, inülin ve sakkaroz içeriği yüksek olduğu düşünülen Timothy otu kullanılarak enzim aktivitelerini tespit etmişlerdir. Endolevanazspesifik enziminin dış zar ile ilişkilendirilirken, β -fruktofuranosidaz enzimi periplazma veya sitozol ile ilişkilendirilmişlerdir.

Dodd ve ark. (2010), *Prevotella bryanti* B14 suşunun glikozit hidrolaz ailesine (GH) ait olan üç farklı enzimin karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışan genlerin her biri bağımsız olarak *E.coli*'ye transfer edilmiştir. Segrasyona uğrayan enzimlerin sellodextrinaz (*CdxA*) ve β -ksilosidaz (*Xyl3A*,*Xyl3B*,*Xyl3C*) enzimleri olduğu rapor etmişlerdir. Özellikle ksilosidaz için katalize ve özgünlüğü arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir.*Xyl3B* bölgesinde bulunan aspartik asit mutasyonu sonucu kcat/km oranının 14 kat azaldığını gözlemlemişlerdir.

Özköse ve ark. (2011), rumen hayvanların beslenme kültüründe bulunan tanik asitin rumen bakterilerinden *Streptococcus bovis* (ES1), *Ruminococcus albus* (SY3), *Prevotella bryanti* (B14), *Fibrobacter succinogenes* (S85) ve *Butyrivibrio fibrisolvens* (JW11)'in sahip olduğu selülaz, ksilanaz ve karboksimetil selülaz enzim segrasyonuna olan etkisi araştırmışlardır. Sonuç olarak ortamda %0.3'lük tannik asit yoğunluğu selülaz, ksilanaz ve karboksimetil selülaz enziminin etkinliği üzerinde negatif bir etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Kasperowicz ve ark. (2012), *Pseudobutyrvibrio ruminis*'e ait 3 farklı suşun inülin üzerinde büyüyen bakterilerden elde edilen hücre ekstraktının β -fruktofuranosidaz (EC 3.2.1.80 ve/veya EC 3.2.1.26) aktivitesini rapor etmişlerdir. Çalışmalarında kısmen saflaştırılmış β -fruktofuranosidaz enziminin inulooligosakkaritleri monomerlerine kadar hidrolize ettiğini gözlemlemişlerdir.

Hall ve ark. (2016), bazı rumen bakterilerinin karbonhidratları fermente edebilmesi üzerine yaptıkları çalışmada özellikle inülin (fuktan) başta olmak üzere farklı karbonhidratları substrat olarak kullanmışlardır. *Selenomonas ruminantium* ve *Streptococcus bovis*'in diğer bakterilere oranla inülin substratını hidrolize edebildiğini rapor etmişlerdir.

Terrasa ve ark. (2016), *Selenomonas ruminantium*'un sahip olduğu β -ksilosidaz enziminin stabilizasyonu, immobilizasyonu ve ksilooligosakkaritin hidrolizindeki etkinliğini tespit etmişlerdir. *S. ruminantium*'dan elde edilen tetramerik β -ksilosidaz enziminin optimal pH ve sıcaklık etkinliğini tespit ederek saflaştırma sonucu elde edilen enzimlerin aldehit-dekstran veya polietilenimin ile kaplanması sonucu oluşan biyokatalizör kapsülün pH 5.0 ve 50°C'de 10 günden fazla yarılanma ömrü gösterdiği ve serbest enzime göre yaklaşık 240 kat daha fazla etkinliği sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Kasperowicz ve ark. (2016), *Butyrvibrio fibrisolvens* 3071 suşunun gelişmesi ve fruktoz polimerleri kullanıp kullanamayacağını belirlemek amacıyla optimum *in vitro* koşulları hazırlamışlardır. 3071 suşu, büyüme ortamında sırasıyla süktroz, timothy otu fuktan, inülin oligosakkaritler ve inülinin %97, 89, 85 ve %60'ını kullandığını ve Timothy otu fuktanla yetiştirilen bakterilerden anyon değiştirme kromatografisi, jel filtrasyonu, zimografi ve ince tabaka kromatografisi ile fruktanolitik enzimlerin tanımlanması gerçekleştirmişlerdir.

Dehnavi ve ark. (2019), *Selenomonas ruminantium*'un sahip olduğu β -D-ksilosidaz (SXA) enziminin yapısı, işlevi ve stabilitesi üzerinde sistein kalıntılarının etkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Çalışmalarında mutasyona uğratılmamış normal suş ile sistein eksikliği ile oluşturulan suşlardan elde edilen SXA proteinlerinin karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Mutant bireylerin enzimlerinde km (enzimin sahip olduğu aktif merkezin yarısını doldurmak için gerekli olan substrat miktarı) değeri normal suşa göre aynı kalmıştır. Birim zamanda bir enzimin tek bir aktif bölgesi tarafından ürüne dönüştürülebilen substrat miktarının (kcat değeri) azaldığını rapor etmişlerdir.

Yücel ve ark. (2022), endüstriyel potansiyeli olan *Selenomonas ruminatium*'un iki farklı *in vitro* besi ortamındaki enzim aktivitelerini kıyaslamışlardır. Çalışmalarında optimum gelişim gösterdikleri ve Orpin tarafından hazırlanan *in vitro* besi ortamı ile Menke tarafından geliştirilen ve yapay tükürük olarak bilen besi ortamının modifikasyonu sonucu oluşturdukları *in vitro* besiyerini kullanmışlardır. Sonuç olarak her iki besiyerinde de *S.ruminantium*'un β -1,4 ksilosidaz (EC 3.2.1.37) enzim etkinliğinin benzer düzeyde olduğunu rapor etmişlerdir.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (KSÜ), Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği (BİGEM) Laboratuvarında gerçekleştirilen bu çalışmada kullanılan kimyasallar aksi belirtilmediği sürece Merck (Almanya) ve Sigma (Almanya) firmalarından temin edilmiştir. Aynı şekilde moleküler basamaklarda kullanılan kimyasallar ise aksi belirtilmedikçe Promega (UK) ve Favorgen'den (Tayvan) temin edilmiştir.

3.1.2. Kimyasal ve çözelti miktarları

Çalışma sırasında kullanılan kimyasal ve çözeltilerin özellikleri ile kullanım miktarları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal ve çözeltiler ile kullanım miktarları

Solüsyonlar	Kimyasal	Miktar/Birimi	Son konsantrasyon
*Mineral Solüsyon A	K ₂ HPO ₄ Saf Su	3.0 g 1000 mL	0.003 g/mL -
*Mineral Solüsyon B	KH ₂ PO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ NaCl MgSO ₄ .7H ₂ O CaCl ₂ Saf Su	3.0 g 6.0 g 6.0 g 0.6 g 0.6 g 1000 mL	0.003 g/mL 0.006 g/mL 0.006 g/mL 0.0006 g/mL 0.00006 g/mL -
*T.E. tampon	Tris EDTA (0.5M) Saf su	10 g 5 g 1000 mL	0.01 g/mL 0.005 g/mL -
*T.B.E. (10X)	Tris Borik asi EDTA Saf su	108 g 55 g 40 mL 1000 mL	0.108 g/mL 0.055 g/mL % 4 (v/v) -
CTAB	Tris-HCl NaCl EDTA CTAB Saf su	1 g 8 g 0.5 M 2 g 100 mL	0.01 g/mL 0.08 g/mL 0.5 mol/L 0.02 g/mL -
X-Gal	X-gal Dimetilformamid	400 µg 10 mL	40 µg/mL -

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal ve çözeltiler ile kullanım miktarları (devam)

Solüsyonlar	Kimyasal	Miktar / Birimi	Son konsantrasyon
TLC Mobil faz	Kloroform	30 mL	% 42.86 (v/v)
	Asetik asit	35 mL	% 50 (v/v)
	Saf su	5 mL	-
TLC Boyoma çözeltisi	Metanol	19 mL	% 9.5 (v/v)
	Sülfirik asit	1 mL	% 5 (v/v)
Amfisilin	Amfisilin	0.5 g	0.005 g/mL
	Saf su	100 mL	-
Kloramfenikol	Kloramfenikol	0.5 g	0.005 g/mL
	Etil alkol (%25)	100 mL	-
Eritromisin	Eritromisin	1 g	0.01 g/mL
	Saf su	100 mL	-
Streptomisin	Streptomisin	0.7 g	0.007 g/mL
	Etil alkol (%25)	100 mL	-

*: Toplam hacimleri g/1000 mL

3.1.3. Alet ve ekipmalar

Çalışmada kullanılan teknik alet ve ekipmaların listesi Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan alet ve ekipmanlar

Cihaz	Firma
Santrifüj	JP Selectra
Otoklav	Nüve
Su banyosu	JP Selectra
İnkübat.ör	Nüve
Hassas terazi	Vibra
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	Velp
Otomatik dispenser	Ismotec-MCP
Vortex	Velp
Hücre duvarı kırıcı	Retsch
pH metre	JP Selectra
Işık mikroskobu	Olympus
Dijital fotoğraf makinası	Canon
Soğutmalı santrifüj	JP Selectra
Elektroforez tankı	ATTO Corporation
Spektrofotometre	Spectra Max
Nanodrop	Thermo
Sıvı azot tankı	International Cryogenios
Hungate tüpü	Bellco Glass Inc., Vineland, NJ. U.S.A.

3.1.4. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve plazmitler

BİGEM Laboratuvarı sıvı azot tankı içerisinde anaerobik koşullar bozulmaksızın stok kültür olarak muhafaza edilen ve cins düzeyinde tanımlanmış anaerobik gut funguslardan *Neocallimastix* sp. (GMLF1 kültür koleksiyon kodu) ve *Orpinomyces* sp. İzolatları (GMLF19 kültür koleksiyon kodu ile kodlanmış) ile *Selenomonas ruminantium* bakteri suşu kullanılmıştır. Ek olarak çalışmada elde edilen rekombinant plazmitler ve bakteri suşlarının özellikleri Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Rekombinant plazmit ve bakteri suşlarının özellikleri

Bakteri suşu	Özellik	Antibiyotik dirençlilik
pNeoXyl	Ksilanaz enziminin üretiminde görevli olan gen bölgesini içeren rekombinant plazmit	Amp
pOrpCel	Selülaz enziminin üretiminde görevli olan gen bölgesini içeren rekombinant plazmit	Amp
<i>E.coli</i> /Xyn	pNeoXyl rekombinant plazmiti içeren <i>E.coli</i> DH5α suşu	Amp
<i>E.coli</i> /Cel	pOrpCel rekombinant plazmiti içeren <i>E.coli</i> DH5α suşu	Amp

(Amp:Amfisilin)

Rekombinant plazmitler ve bakteri suşlarının isimlendirilmesinde, *Neocallimastix* sp.’ye ait olan yaklaşık 1 kb uzunluğundaki ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesi *E.coli* plazmiti olan pUC18’e *Bam*H1 kesme enzimi kullanılarak klonlanmıştır. Elde edilen yeni rekombinant plazmid pNeoXyl, rekombinant bakteri suşu da *E.coli*/Xyn olarak isimlendirilmiştir. Selülaz enzimini kodlayan gen bölgesi için, *Orpinomyces* sp.’ye ait olan yaklaşık olarak 1.6 kb uzunluğundaki selülaz enzimini kodlayan gen bölgesi *E.coli* plazmiti olan pUC18’e *Bam*H1 kesme enzimi kullanılarak klonlanmıştır. Elde edilen yeni rekombinant plazmid pOrpCel, rekombinant bakteri suşu da *E.coli*/Cel olarak isimlendirilmiştir.

3.1.5. Anaerobik basal besiyeri içeriği

Rumen mikroorganizmaların *in vitro* koşullar altında optimum düzeyde gelişimini gösterebilmesi için Orpin (1976) temelli basal besiyeri kullanılmıştır. Mineral Solüsyon A’da bulunan K₂HPO₄ ile Mineral Solüsyon B’de bulunan KH₂PO₄ bileşikleri birlikte çözünemediği için iki farklı solüsyon şeklinde hazırlanmıştır. Besiyeri içeriği ve özellikleri Çizelge 3.4’de verilmiştir.

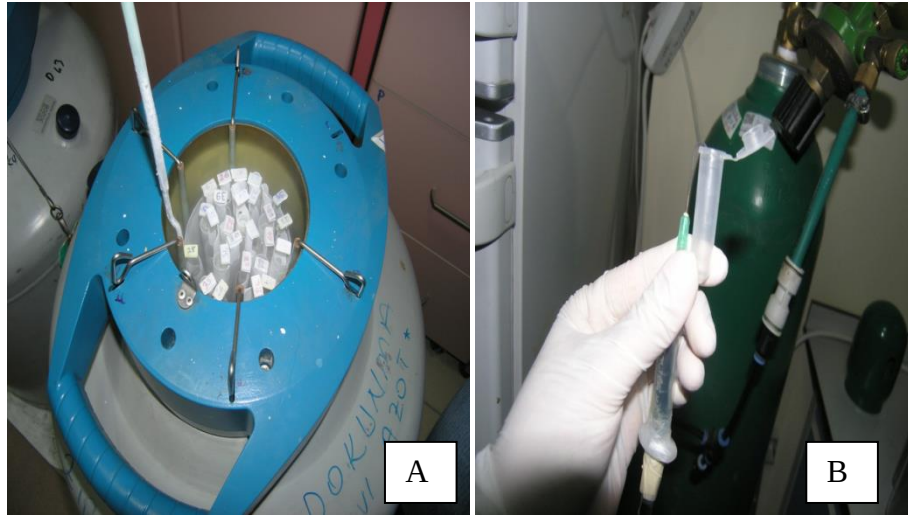
Çizelge.3.4. Rumen mikroorganizmaların in vitro koşullar altında optimum düzeyde gelişimini gösterebilmesi için gerekli olan basal besiyeri (Orpin,1976)

KİMYASALLAR	BİRİMİ	MİKTAR (100ml)
Mineral Solusyon A	mL	15.0
Mineral Solusyon B	mL	15.0
Rumen Sıvısı	mL	15.0
NaHCO ₃	Gr	0.60
Pepton	Gr	0.10
Maya Özütü	Gr	0.25
Enerji Kaynağı	Gr	0.50
Resazurin (% 0,1)	mL	1.0
L-Sistein HCl	Gr	0.10
Saf Su	mL	55.0

3.2. Metot

3.2.1. Anaerobik gut fungus izolatlarının ve rumen bakteri suşununaktifleştirilmesi

Kültür koleksiyonunda bulunan fungus izolatları ve bakteri suşu anaerobik koşullar bozulmaksızın oda sıcaklığında çözülmeye bırakılmıştır. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra karyoviyal tüpte bulunan örnekler steril koşullar altındakarbondiyoksit (CO₂) gazı verilerek basal besi ortamına ekimleri yapılmış ve alınan stok mikroorganizmalarınaktifleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir (Balch ve Wolfe, 1976). Anaerobik gut funguslara ait aktifleştirme işlemiŞekil 3.1’de gösterilmiştir.



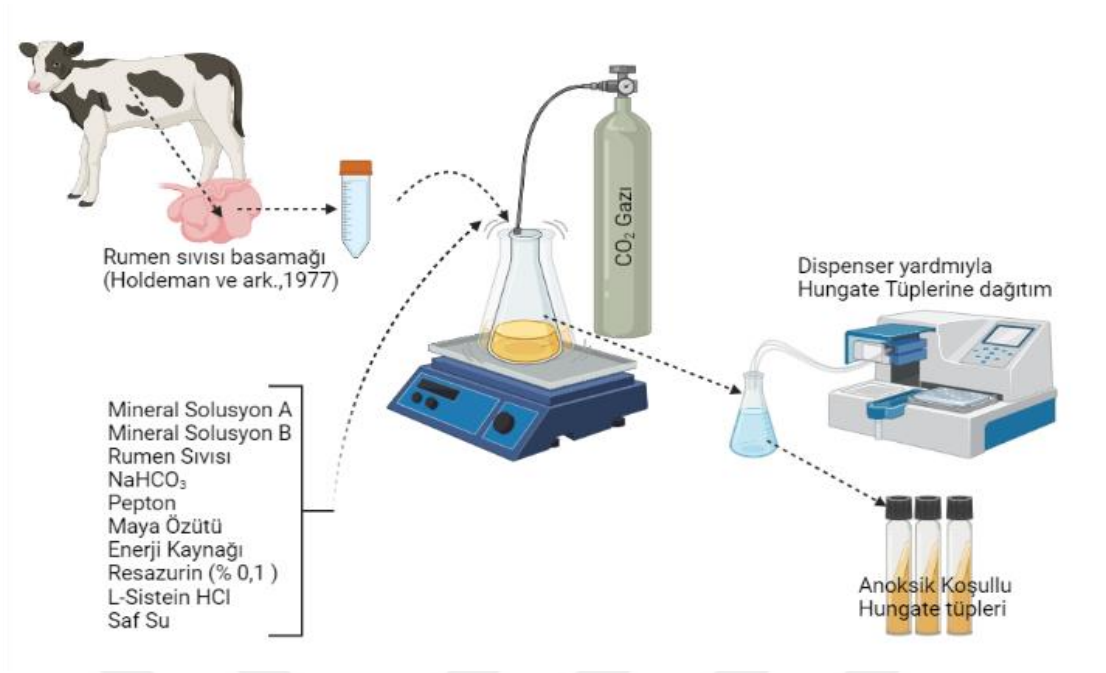
Şekil 3.1. Rumen fungus kültür koleksiyonu sıvı azot yardımı ile muhafazası (A), kültür koleksiyonundan alınan gmlf kodu ile muhafaza edilen anarobik gut fungusun CO₂ gazı ile aktifleştirme basamağı (B)

3.2.2. Rumen sıvısının hazırlanması

Anaerobik basal besiyerinin hazırlanmasında kullanılan rumen sıvısı için mezbahaneden (Kahramanmaraş) tedarik edilen inek rumeni kullanılmıştır. Alınan rumen sıvısı içerisinde bulunan saman benzeri büyük partiküllerin ortamdan uzaklaştırılması için tülbent bir bez ile filtrasyon işlemi gerçekleştirilmiş (Holdeman ve ark.,1977), filtrasyon işlemi sonrası elde edilen sıvı kısım 50 ml hacme sahip olan plastik falkon tüplerine dağıtılmıştır. Falkon tüpleri daha sonra 10 dk boyunca 3500 g'de santrifüj (3 tekerrür şeklinde) edildikten sonra elde edilen üst sıvı alınarak eşit hacimli olacak şekilde dağıtılmış ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Anaerobik basal besiyerinin hazırlanması

Anaerobik basal besiyerinin hazırlanması sırasında kullanılacak olan kimyasallar (L-Sistein HCl ve Resazurin hariç) Çizelge 3.5'de belirtildiği miktarlarda hassas terazi yardımıyla tartılarak erlen içerisine konulmuştur. Erlen içerisine uygun oranlarda toplanan kimyasalların çözünmesi ve ortamdaki oksijen miktarının azaltılabilmesi için ısıtıcı manyetik karıştırıcı kullanılmıştır. Isıl işlem sonunda kaynamaya başlayan basal besiyerine oksijen bağlayıcı L-Sistein HCl ilavesi yapılmıştır. Ortamdaki oksijenin uzaklaştırılması ve anoksik koşulların devamlılığı için basal besiyeri içerisine sürekli olarak CO₂ gazı ile doyurulmaya devam edilmiştir. L-sistein ilavesinden sonra ortama resazurin indikatörünün eklenmesi sonucu besiyerinde mavi-mor renkten sarı renge bir dönüşüm oluncaya kadar hem ısıl işlem hem de CO₂ gazı uygulanması devam etmiştir. Besi yerinin anoksik koşulları sağlaması sonucu (ortamın sarı renge dönüşmesi) dispenser yardımıyla 8ml olacak şekilde besiyeri Hungate tüplerine (CO₂ gazı uygulanarak) aktarılmıştır. Çalışmada enerji kaynağı olarak son konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde glikoz ve inülin kullanılmıştır. Hazırlanan basal besiyeri 110°C'de 10 dk (glikoz ve inülin yapısının bozulmaması için) otoklav edilmiştir. Anaerobik basal besiyerinin hazırlanma basamağı Şekil 3.2'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.2. Rumen mikroorganizmalarının *in vitro* koşullarda yetiştirildiği basal besiyerinin şematik hazırlanışı

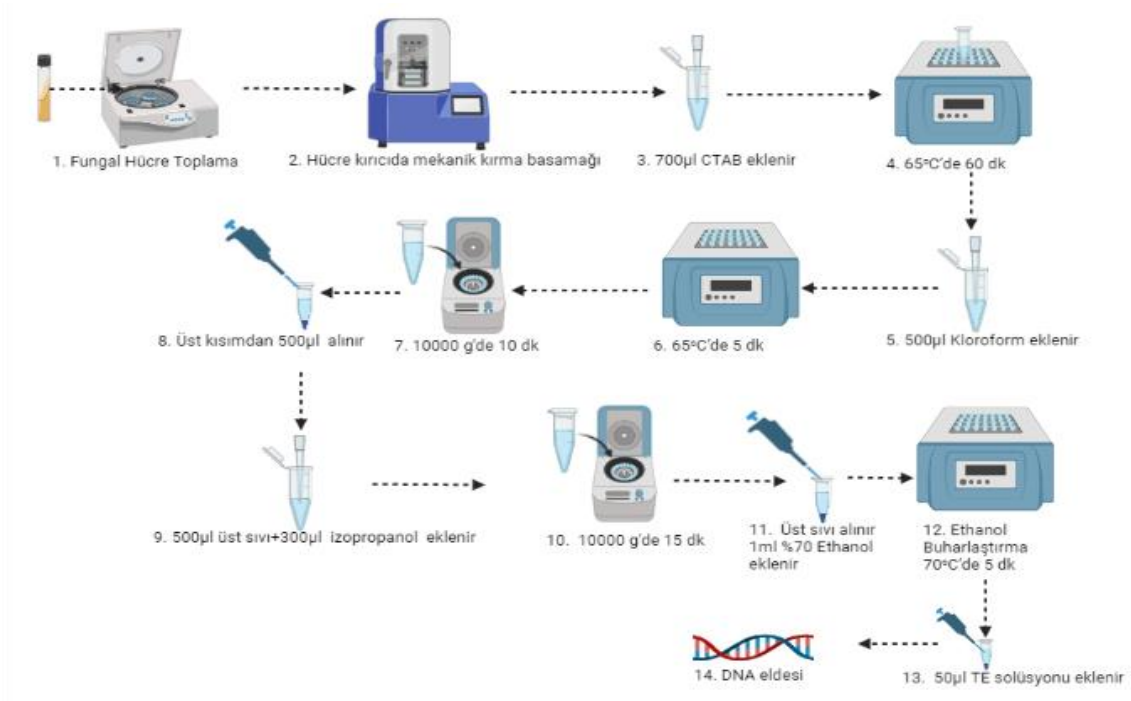
3.2.4. Antibiyotikler

Anaerobik gut fungus (AGF) izolatlarının *in vitro* ortamda gelişimini olumsuz yönde etkileyecek bakteriyel kontaminasyon riskini ortadan kaldırılmak için hazırlanan basal besi yerine antibiyotik karışımı (0.1ml) eklenmiştir. Bunun için Çizelge 3.1’de verilen amfisilin, eritromisin, streptomisin ve kloromfenikol antibiyotikleri son konsatrasyonları 100µg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Antibiyotiklerin sterilizasyon işlemi için 0.22µm gözenek çapına sahip enjektör filtresi kullanılmıştır.

3.2.5. Anaerobik gut funguslardan kromozomal DNA izolasyonu

Anaerobik gut fungus (AGF)’lardan kromozomal DNA izolasyonu için Doyle ve Doyle (1987) tarafından geliştirilen CTAB (hexa-decyltrimethylammonium bromide) metodu kullanılmıştır. DNA izolasyon basamağı başlamadan önce AGF’lar enerji kaynağı olarak glikoz içeren anaerobik basal besi ortamında yaklaşık olarak 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası AGF hücreleri 400g’de 10 dk santrifüj (Nüve; NF800) edilerek hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant kısım uzaklaştırılmış ve çökme sonrası pelet içerisinde bulunan hücreler 2 defa saf su ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra hücreler steril 2ml’lik ependorf tüplerine alınarak sıvı azot yardımıyla dondurulmuştur. Dondurulan ependorflar mixer mills (Retsch; MM301) adı verilen hücre kırıcıda mekanik

parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Mekanik katabolizma sonrası ependorf tüpüne yüksek düzeyde polisakkarit içeren hücrelerden DNA izolasyonu için kullanılan CTAB(0.1M TrisHCl, pH 8.0; 1.4 M NaCl; 0.02 M EDTA; % 2 CTAB) solüsyonundan 700µl eklenerek 30sn vorteks yapılmıştır. CTAB solüsyonunun homojen bir şekilde dağılmasından sonra 65°C’de 60 dk boyunca sıcak su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası DNA’nın üzerinde bulunan histon proteini gibi yapıların uzaklaştırılması için 500µl kloroform veya izoamil alkol (24:1 v/v) eklenerek 10 sn vorteks yapılarak 65°C’de 5dk süre boyunca inkübasyona tabii tutulmuş ve inkübasyon sonrası 10.000g’de 10dk santrifüj (Hettich; Micro200) edildikten sonra üst sıvıdan 500µl alınarak başka bir ependorf tüpüne aktarılır. Bu işlemden sonra ortamda bulunan tuz ile kimyasalların yıkınması ve DNA molekülünün T.E. gibi solüsyon içerisinde çözünmemesi için 300µl izopropanol eklenerek 20 sn vorteks yapılmıştır. Homojenizasyon gerçekleştirildikten sonra 10.000g’de 15dk santrifüj işlemi sonrası üst sıvı dökülmüş ve üzerine DNA çözünürlüğünü minimize etmek ve ortamda kalan tuzların yıkanması için 1ml %70 etanol ilavesi sağlanmıştır. Etanol eklendikten sonra 70°C’de 20dk boyunca inkübasyona bırakılmış ve etanolün uzaklaşması beklenmiştir. Buharlaştırma sonunda ependorf tüplerine 50µl TE solüsyonu(1 mM TrisHCl, pH 8.0; 0.1 mM EDTA) ilave edilerek -20°C’de muhafaza edilmiştir. DNA izolasyon basamağı Şekil 3.3’de şematize edilerek verilmiştir.



Şekil 3.3.AGF’larda kromozomal DNA izolasyonu için Doyle ve Doyle (1987) tarafından geliştirilen CTAB (hexa-decyltrimethylammonium bromide) metodunun şematik gösterimi

3.2.6. Oligonükleotid primerler

Rumen funguslarına ait ve biyoteknolojik potansiye sahip olduğu düşünülen ksilanaz ile selüloz enzimlerini kodlayan gen bölgelerinin tespiti ile bu bölgelerin polimeraz zincir reaksiyon (PZR) ile amplifikasyonu için uygun oligonükleotitler tasarlanmıştır. Bu tasarım sırasında güncel veri tabanları ve yazılım programlarından yardım alınmıştır. Gen bölgelerinin tespiti NCBI (National Center of Biotechnology Institute, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) kullanılarak güncel nükleotit veri tabanı ile günümüze kadar kayıtlı olan fungal ksilanaz ve selüloz gen bölgeleri üzerinde tarama yapılmıştır. Nükleotit veri tabanından elde edilen gen bölgeleri CloneManager 5 yazılım programı ile analizi gerçekleştirilmiştir. Uygun oligonükleotid primerlerin tasarlanması için analiz sonucu elde edilen genlerin benzerlik oranının başka bir ifade ile gen bölgelerinin homolojisi Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/clustalo>) veri tabanından faydalanılmıştır. Elde edilen oligonükleotid primer dizilerinin optimum PZR koşullarını sağlaması için ‘OligoEvaluator’ (<http://www.oligoevaluator.com>) veri tabanı kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler Molgentek firmasından temin edilmiş ve protoküle uygun bir şekilde steril dH₂O ile son konsantrasyonu 20pmol/ul olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.6.1. Ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesine ait oligonükleotid primerler

Fungal Ksilanaz gen bölgesinin tespiti için gerekli olan oligonükleotid yapıları primerin tasarlanması sırasında NCBI (National Center of Biotechnology Institute, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) veri tabanına kayıtlı olan *Neocallimastix frontalis*’e ait olan (X82266.1) ksilanaz bölgesi, *Neocallimastix frontalis*’e ait ksilanaz (xyn11A) (AY601669.1) ve *N.patriciarum*’a ait olan ksilanaz A (X65526.1) gen bölgelerinin nükleotid dizilerinin homolojileri yapılarak uygun primerler tasarlanmıştır (Şekil 3.4).

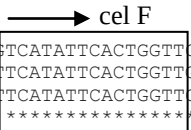
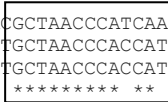
Anerobik gut fungusların ksilanaz katalitik domain bölgesi içerdiği (Mesta ve ark., 2001) ve bu bölgenin enzimatik reaksiyonun başlaması için substrat ile etkileşime geçmesi gerektiği bilinmektedir. Bu bilgilerde dikkate alınarak ksilanaz enzimi sentezleyen gen bölgesi için tasarlanan primerler Çizelge 3.5’de verilmiş ve yaklaşık olarak 1 kb uzunluğundaki gen bölgesinin kapsayan xynAF-xynAR primer çiftlerinin nükleotit dizilimi (5’den 3’e doğru) ile erime sıcaklığı verilmiştir.

Çizelge 3.5. *Neocalimastix* sp.’ye ait ksilanaz gen bölgesinin tespiti için tasarlanan oligonükleotit primerler

Oligonükleotitler	5’-3’	Uzunluk	Erime Sıcaklığı (T _m ,°C)
xynA F	CGCAGTAGCTATTGCAACTG	20	54
xynA R	ATCCAATGTAGTCGTAATCG	20	56

3.2.6.2. Selüloz enzimini kodlayan gen bölgesine ait oligonükleotit primerler

Anaerobik gut fungusu ait selüloz gen bölgesinin tespiti için oligonükleotit yapılı primerin tasarlanması sırasında NCBI (National Center of Biotechnology Institute, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) veri tabanına kayıtlı olan *Orpinomyces* sp. (KF 682138.1), *Anaeromyces* sp.(AF 529294.1) ve *Orpinomyces* sp. (U63838.1) suşlarına ait ilgili gen bölgelerinin yüksek nükleotit homolojilerine uygun primer tasarımı gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5).

AF529294.1	GGGGATTAAAAATCTTTTTTCTTTATACTATTTTAATTCAGCATAAAAAATTAAGGCTC	60
KF682138.1	-----GGGGATAACTATTTTATCCAGAATTAATTAATAGGCT	39
U63838.1	-----	0
		
AF529294.1	TGATTTAAATAGTATAATATATTATTCATATTCAGTGAATTGTTATAATATTAA	120
KF682138.1	CTGATTTAAATAGCTTAAATATTATTCATATTCAGTGAATTGTTATAATATTAT	99
U63838.1	---ATTAAATAGCTTAAATATTATTCATATTCAGTGAATTGTTATAATATTAT	57
** ** * * * *****		
//		
AF529294.1	GGGTATTGAAAACCATGAATGGTGTGGTATCGATTACTCAAGATGTAATGGCCACCACCC	540
KF682138.1	GGGTGTTGAAAATCAACAATGGTGTGGTATTAGAGATAACTGTACTCCAAACGTTCCAGT	501
U63838.1	GGGTGTTGAAAACCAACAATGGTGTGGTATTAGAGATAACTGTACTCCAAATGTTCCAGC	467
**** ***** ** ***** * * *		
AF529294.1	ACAAAGAACTACTACTACCCTACCAGAACTACCCTACCCTACCCTCCAGCTCAATC	600
KF682138.1	CACAGTGTCTAGAACCACTACCAGAACCACTACTACTACTAGAACTACTACTGTTAACCC	561
U63838.1	CACAGTGTCTAGAACCACTACCAGAACCACTACTACTACTAGAACTACTACTGTTAACCT	527
** ** ** ** ** * * ***** ***** ** ** * *		
AF529294.1	TAGACCAACTAGTGACAACTCTTTGAAAACACTCTTTACAGTAAGTACAAGTCCAAACA	660
KF682138.1	ACTTCCAAGTACGCAACTCTTTGAAAATGAAGTTACAGTAAGTACAAGTCCAAAGG	621
U63838.1	TCTTCCAAGTACGCAACTCTTTGAAAATGAAGTTACAGTAAGTACAAGTCCAAAGG	587
***** ***** *****		
AF529294.1	AGAAGTTGATACTTCTATTGCCAAATTAAGTGGTCAATTACAAGAAAAGGCTAAGAAGGT	720
KF682138.1	TGAAGTTGACCAATCTATTCAAAGATTAAGTGGTCTTTACAAGAAAAGGCTAAGAAGGT	681
U63838.1	TGAAGTTGACCAATCTATTCAAAGATTAAGTGGTCTTTACAAGAAAAGGCTAAGAAGGT	647
***** ***** * ***** *****		
//		
AF529294.1	TTCATTCCAAATGCTCCAGCTGCTGGTTCATGGTCCACGATTACTTTGTTATGTTATT	1548
KF682138.1	TTCTTTACAAGGTGCTCCAGCCGCTGGTTCATGGTCCACGATTACTTTGTTATGTTATT	1512
U63838.1	CTCTTTACAAGGTGCTCCAGCTGCTGGTTCATGGTCCACGATTACTTTGTTATGTTATT	1478
** ** *** *****		
		
AF529294.1	ACAAAGTCTAACCCTCAATTTAAGCTAAATATAAATCTATTATATAGTTAGTAT	1608
KF682138.1	AGAAAAATGCTAACCCTCAATTTAAGCAATTAATAATACCTTTATATTTAACATAATTA	1572
U63838.1	AGAAAAATGCTAACCCTCAATTTAAGCAATTAATAATACCTTTATATTTAAGATAATTA	1538
* **** ***** **		

Şekil 3.5. *Orpinomyces* spp. ve *Anaeromyces* sp. rumen funguslarına ait selülaaz enzimini kodlayan *celA* gen bölgesi sekans bilgileri ve oligonükleotit primerler

NCBI veri tabanında rumen funguslarına ait farklı büyüklükte selülaaz enzimini sentezleyen gen bölgeleri mevcut olup, ilgili bölgenin PZR ile çoğaltılması tasarlanan oligonükleotit yapılı primerlerin nükleotit dizisi Çizelge 3.6’da verilmiştir.

Çizelge 3.6. *Orpinomyces* sp.’ye ait olan selülaaz enzimini kodlayan gen bölgesinin tespiti için tasarlanan oligonükleotit primerler

Oligonükleotitler	5’-3’	Uzunluk	Erime Sıcaklığı (T _m , °C)
celA F	TCATATTCAGTGAATTG	21	53
celA R	GCTAACCCTCAATTTAAGCT	21	55

3.2.7. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

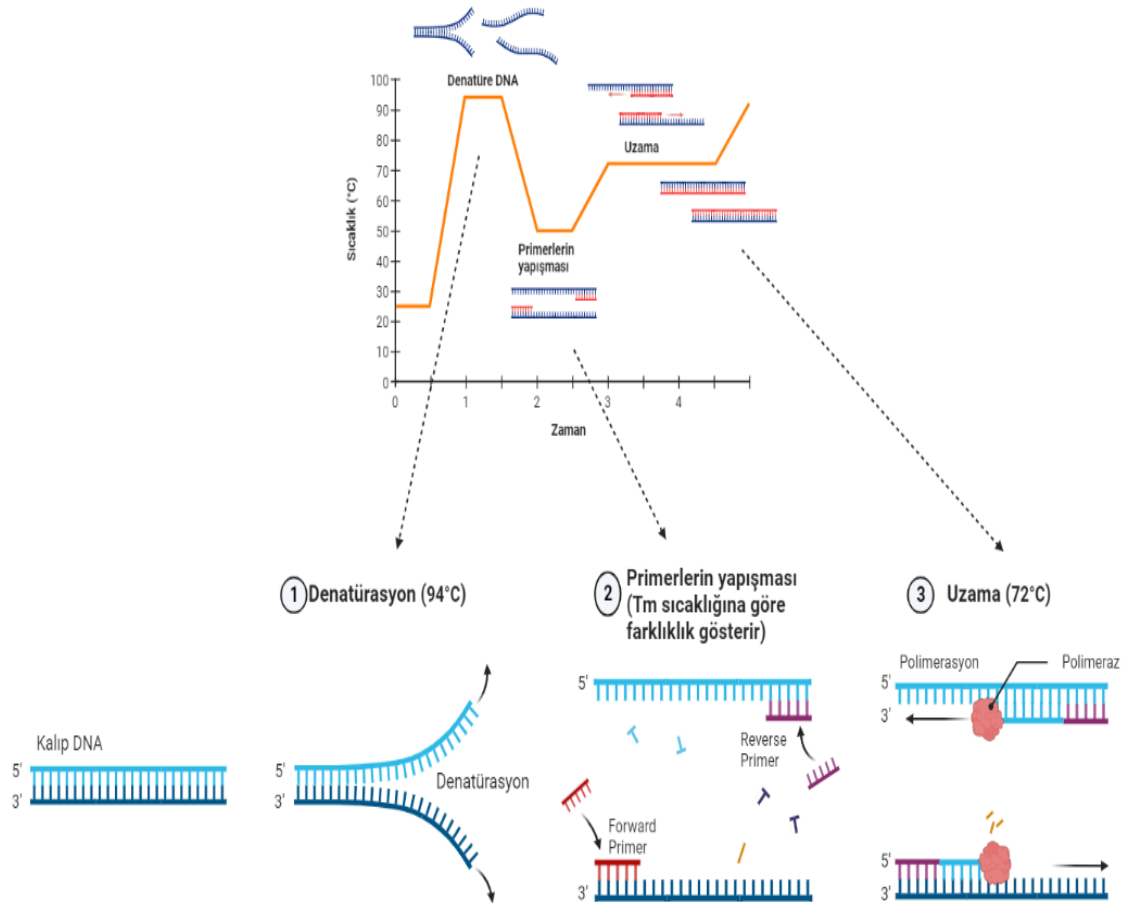
Çalışmada amplifikasyon işlemine tabi olan gen bölgeleri için PZR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve oranları Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Çalışmada kullanılan gen bölgelerinin PZR ile amplifikasyonunda kullanılan kimyasallar ve miktarları

Kimyasal	Miktar	Konsantrasyon Oranı
Kalıp DNA	1 µl	≥450 ng/ml
Primer Forward	1 µl	20 pmol
Primer Revers	1 µl	20 pmol
dNTP	1 µl	1 mM
Buffer	4 µl	10X
DNA polimeraz	0.5 µl	5 u/ µl
dH ₂ O	32 µl	-
Toplam	40 µl	-

Buffer: 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT ve 500 mM Tris-HCl (pH 8.0)

Hazırlanan örnekler 94°C 4 dk'lık ilk denatürasyon basamağı sonrası 35 döngü olmak koşuluyla 94°C 1 dk denatürasyon, primerlerin T_m sıcaklığına göre 1 dk yapışma, 72°C'de 2 dk uzama işlemi gerçekleştirildikten sonra 72°C'de 5 dk'lık (1 döngü) son uzama işlemine tabi tutulmuştur (McPherson ve Möller,2000). PZR işlemi Şekil 3.6'da şematize edilmiştir.



Şekil 3.6. PZR basamaklarının gösterimi

3.2.7.1. Ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesi için PZR koşulları

Neocallimastix sp. izolatlarına ait olan ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesinin tespiti için PZR çalışma koşulları Çizelge 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.8. *Neocallimastix* sp.’ait ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesinin tespiti için PZR koşulları

	İlk Denatürasyon	Denatürasyon	Yapışma	Uzama	Son Uzama
Sıcaklık (°C)	95 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C
Süre (dk)	4	1	1	2	5
Döngü	1		35		1

3.2.7.2. Selüloz enzimini kodlayan gen bölgesi için PZR koşulları

Orpinomyces sp. izolatlarına ait selüloz enzimi kodlayan gen bölgesinin tespiti için PZR çalışma koşulları Çizelge 3.9’da verilmiştir.

Çizelge 3.9. *Orpinomyces* sp. izolatlarına ait selüloz enzimi kodlayan gen bölgesinin tespiti için PZR koşulları

	İlk Denatürasyon	Denatürasyon	Yapışma	Uzama	Son Uzama
Sıcaklık (°C)	95 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C
Süre (dk)	4	1	1	2	5
Döngü	1		37		1

3.2.8. Agaroz Jel elektroforez

Fungal DNA izolasyon basamağı sonucu elde edilen ökaryotik DNA molekülü ile PZR işlemi sonucu oluşan gen bölgelerin 360 nm’lik dalga boyuna sahip olan UV ışık altında gözlemlenmesi için %1 (w/v) oranında agaroz jel hazırlanmıştır. Agaroz jel için optimum miktarda agaroz tartılarak 1X’lik TBE tampon içerisinde homojen olacak şekilde çözülerek ısıtılma işlemine tabi tutulmuş ve yaklaşık olarak agaroz jel sıcaklığının 60°C’ye gelmesi sonrasında jel tankında bulunan elektroforez tabağına dökülmüştür (Voytas,1992).

Görüntülenmesi planlanan DNA ve/veya PZR ürünüden 5µl alınarak üzerine 1µl’lik yükleme tamponu (Ek.1) eklenip homojen bir yapı oluşuncaya kadar pipetasyon işlemine tabi tutulmuştur. Örneklerin jele yüklemesi yapılırken DNA ve/veya PZR ürünlerin sahip olduğu baz uzunluklarının tespiti için 100 bp’lik ve 1kb’lik marker (Favorgen) yüklemesi de gerçekleştirilmiştir (Çömlekçioğlu,2009).

Örneklerden 6µl alınarak elektroforez jel kutucuklarına yüklemesi yapıldıktan sonra DNA ve/veya PZR ürünü 500mA ve 100V’ta (Biolab; PS 503) ortalama olarak 30 – 60

dakika boyunca elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden sonra agaroz jel 25 dakikalık süre boyunca 0.5 µg/ml (w/v)'lik Etidyum bromür (Et-Br) içerisinde beklenmiştir (Lee ve ark.,2012). Boyama işleminin gerçekleşmesi sonrası UV ışık altında görüntüleme yapılmıştır (Canon S31S).

3.2.9. Restriksiyon endonükleazlar

Rumen funguslarına ait selülaaz ve ksilanaz enziminin sentezinde görevli olan gen bölgeleri pUC18 vektör (plazmit) DNA'ya ligasyon işleminin gerçekleşmesi için tasarlanan oligonükleotit yapılı primerlerin 5' ucuna *Bam*HI restriksiyon endonükleazına ait tanıma dizileri eklenmiş (5'-**GGATCC**-3')ve oluşan primerler Çizelge 3.10'da verilmiştir. İlgili gen bölgeleri içerisinde *Bam*HI'a ait tanıma dizisinin bulunmaması ve pUC18 plazmit DNA'sına ait çoklu klonlama bölgesinde restriksiyon işlemini gerçekleştirmesinden dolayı tercih edilmiştir. Restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesi içeren gen bölgelerinin amplifikasyon işlemi 3.3.3'de anlatılan PZR basamağına uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.10. Rumen funguslarına ait selülaaz ve ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgelerinin klonması için *Bam*HI tanıma bölgeleri (5'-GGATCC-3') eklenerek tasarlanmışoligonükleotit primerler

Oligonükleotitler	5'-3'	Uzunluk	Erime Sıcaklığı (T _m °C)
celA F+ <i>Bam</i> HI	A AGGATCC TCATATTCAGTGGTTG	24	62
celA R+ <i>Bam</i> HI	A AGGATCC GCTAACCCATCAATTT	24	62
xynA F+ <i>Bam</i> HI	A AGGATCC CGCAGTAGCTATTGC	23	64
xynA R+ <i>Bam</i> HI	A AGGATCC ATCCAATGTAGTCGT	23	61

Vektör DNA ve/veya PCR ürünleri çizelge 3.11'de verilen kimyasallar ile 37°C'de 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyonda görevli olan restriksiyon endonükleazın inhibibasyonu için15 dakika boyunca 60°C ısıtılma tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.11. Vektör DNA ve/veya PZR ürünününrestriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi için gerekli olan kimyasal ve miktarları

Kimyasal	Miktar
Vektör DNA/PZR ürünü	2 ng/µl
Restriksiyon Endonükleaz	2 U/µl
Buffer (1X)	2 µl
BSA (10X)	2 µl
dH ₂ O	12 µl

3.2.10. Ligasyon

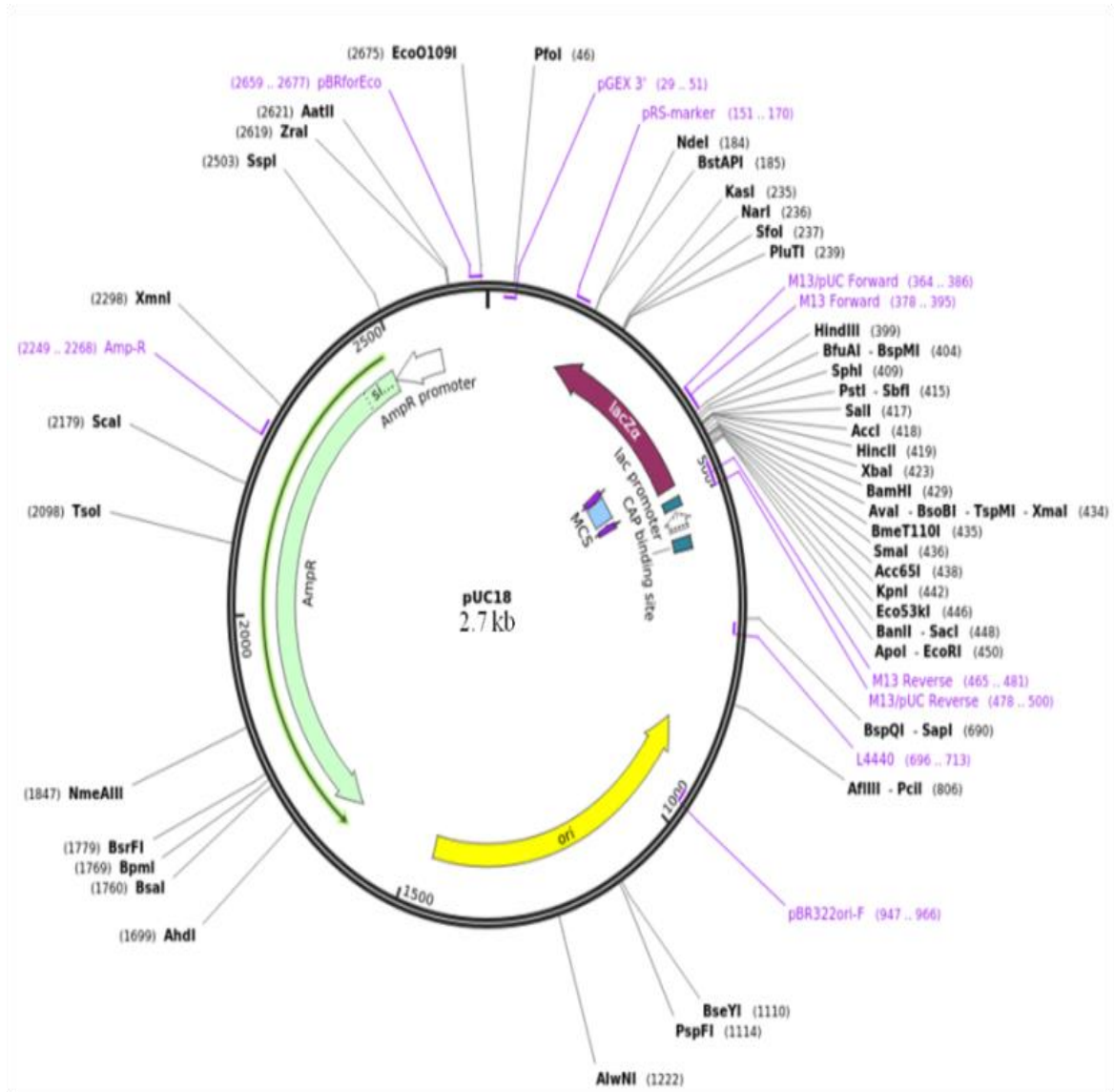
Restriksiyon endonükleaz enzimine tabi olan vektör DNA ve PZR ürünlerinin ligasyon işlemi için Çizelge 3.12’de verilen kimyasallar homojen olarak karıştırılarak 16°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra reaksiyonun sonlandırılması için 10 dakika 70°C ısıtma işlemine tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.12. Vektör DNA ile PCR ürününün ligasyon işlemi için gerekli olan kimyasal ve miktarları

Kimyasal	Miktar
PCR ürünü	5 ng/μl
Vektör Plazmit	5 ng/μl
T ₄ Ligaz tamponu (1X)	2 μl
BSA 10X	2 μl
T ₄ DNA Ligaz	1U/μl
dH ₂ O	5 μl

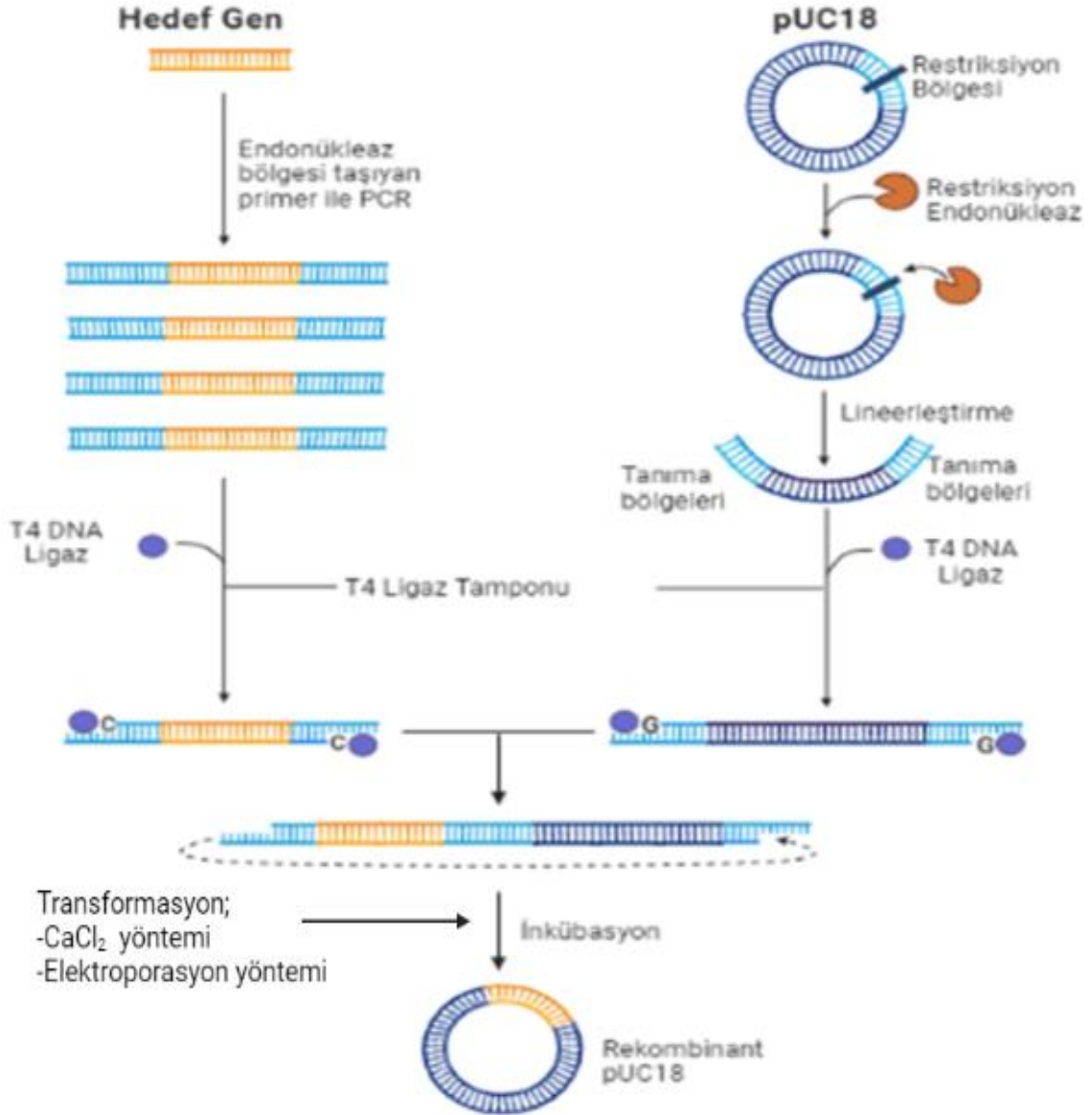
3.2.11. pUC18 klonlama vektörü ve ligasyon

Ligasyon işleminde kullanılan pUC18 vektör (plazmit) DNA yaklaşık olarak 2.7kb büyüklüğüne sahiptir. Genetik yapısında β-galaktosidaz (*lacZ*) geninin N-terminal ucu, çoklu klonlama bölgesinde (MCS) restriksiyon endonükleaz alanları ve ampisilinin hidrolizinde görevli olan enzimin (beta-laktamaz) segrasyonunu sağlayan *ampR* gen bölgesi mevcuttur (Şekil 3.7). *E.coli* DH5α suşu transformasyonu kolay olup replikasyonu oldukça hızlı olmasından dolayı tercih edilmiştir (Schweizer,1991).



Şekil 3.7. pUC 18 plazmit DNA gen haritası (Martinez ve ark.,1988)

Rekombinant DNA oluşumu başka bir ifade ile 3.3.6'da verilen uygulama basamakları sayesinde plazmit DNA'ya aktarılan genlerin ligasyonu işlemi Şekil 3.8'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.8. pUC18 vektör (plazmit) DNA ile hedef gen bölgesinin ligasyon basamağı

3.2.12. Plazmit DNA izolasyonu

Plazmit DNA izolasyonu işlemi GenElute Miniprep Kiti (Sigma) kullanılarak firmanın protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Plazmit DNA izolasyonu genel olarak dört ana basamaktan meydana gelmiştir. Bunlar sırası ile bakteri kültürünün antibiyotik içeren sıvı besi ortamında inkübasyonu, hücrelerin santrifüj yardımı ile toplanması, toplanan bakteri kültürünün sahip olduğu çeperinin hidrolizi ve plazmitin saflaştırılması şeklinde olmaktadır. Bundan dolayı ampiciline dirençlilik geni içeren plazmiti taşıyan bakteri kültürü gece boyunca sıvı besi ortamında gelişimini tamamladıktan sonra 10 dakika 1200 g'de santrifüj yapılarak hücrelerin toplanması sağlanmış ve diğer

basamaklar üretici firmanın protokülüne uygun bir biçimde gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma işlemi tamamlanan plazmit DNA -20°C’de saklanmıştır (Pronobis ve ark., 2016).

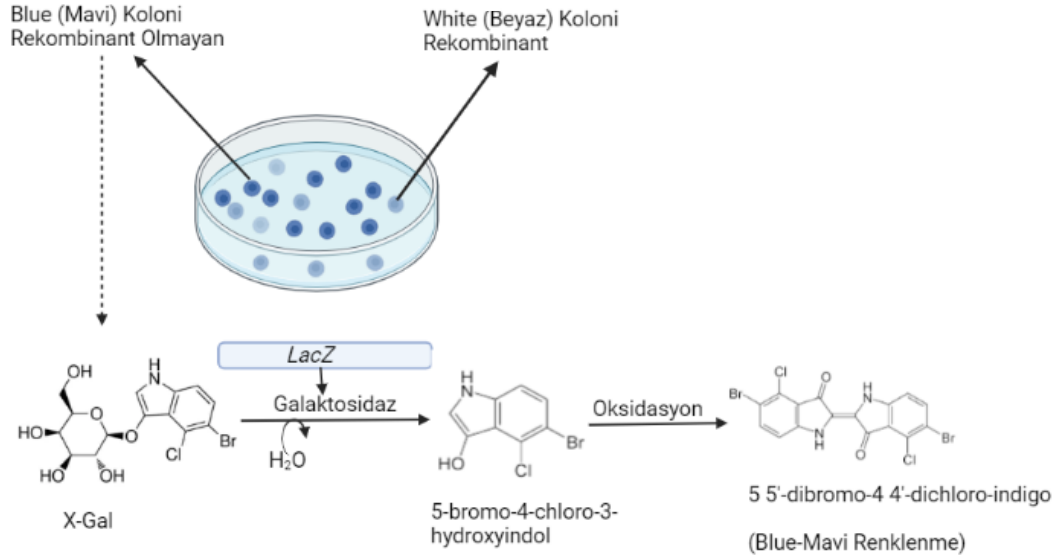
3.2.13. Kalsiyum klorür metodu ve transformasyon

CaCl₂ yöntemi ile genetik materyalin transformasyon işlemi Mandel ve Higa (1970) metodna göre gerçekleştirilmiştir. 1 gece 37°C’de LB basal besi ortamında inkübasyona bırakılan *E.coli* DH5α suşundan 1 ml alınarak başka bir LB (100mL) basal besi ortamına inoküle edilerek çalkalamalı inkübatörde yaklaşık 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bakteriler OD₆₀₀=0.4 absorbans değerine ulaştığı zaman 10 dk buz üzerinde bekletirlererek büyümeleri durudurulmuştur. Büyümesi durdurulan bakteriler 1200 g’de +4°C’de 10 dk boyunca santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj sonrası süpernatant kısım uzaklaştırılmıştır. Elde kalan pelet üzerine 100mM’lık CaCl₂ (Buzda bekletilmiş)’den 10 ml eklenerek peletin çözündürülmesi sağlanmış ve yarım saat buz üzerinde bekletilmiştir. Çözülmüş peletler tekrar 1200 g’de +4°C’de 10 dk santrifüj yapılmış ve süpernatant kısım uzaklaştırılmıştır. Elde kalan pelete 100mM’lık CaCl₂ (Buzda bekletilmiş)’den 1 ml eklenerek 10 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Komponent hale gelen *E.coli* DH5α hücreleri 200µl’lik steril tüplere ayrılmıştır. Bu işlem sonrası tüplere ligasyon ürünü ilave edilerek yarım saat buzda bekletildikten sonra 42°C’de 3 dk ısı şokuna maruz bırakılmıştır. İşlem sonrası örnekler tekrar 10 dk buzda bekletilmiştir. Hücrelere 800µl’lik LB basal besiyeri ilave edilerek 37°C’de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası santrifüj edilerek süpernatant kısım uzaklaştırılmış ve pelet üzerine 200µl LB basal besi yeri ilavesi yapılarak seçici antibiyotik içeren katı LB besi yerine ekimi yapılarak 16 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.14. Rekombinant DNA içeren koloni seçimi

Rekombinant plazmit DNA’nın 3.3.9’da anlatılan CaCl₂ yöntemi ile *E.coli* DH5α suşuna transforme olduğunu tespit etmek için hem ‘Beyaz/Mavi Seçilim’ hem de ‘Kongo Red Boyama’ yöntemleri kullanılmıştır. Beyaz/Mavi Seçilim yöntemi ile *E.coli* DH5α suşunun LB/Amp/X-gal/Agar’lı katı besi ortamına ekilmesi sonucu rekombinant (Beyaz) ve rekombinant olmayan (Mavi) kolonilerin seleksiyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.9’da şematize olarak verilen yöntemde rekombinant olmayan koloniler *lacZ* bölgesi tarafından sentezlenen β-Galaktosidaz enzim etkinliğinin varlığı ile X-gal’li hidrolize ederek mavi renk oluşumuna sebep olmuştur. Ancak Rekombinant bireylerde ise beyaz renkli koloni oluşturması X-Gal’in hidrolize olmadığını *lacZ* bölgesi aktarılan geni aldığını ifade

etmektedir (Heuermann ve Cosgrove, 2001). Favorgen'den temin edilen Favor X-Gal firmanın protokülüne uygun bir şekilde hazırlanarak +4°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.9. Beyaz/Mavi Seçim yöntemine göre rekombinant olmayan kolonilerin X-Gal hidroliz sonucu mavi renk vermesi şematize edilmiştir

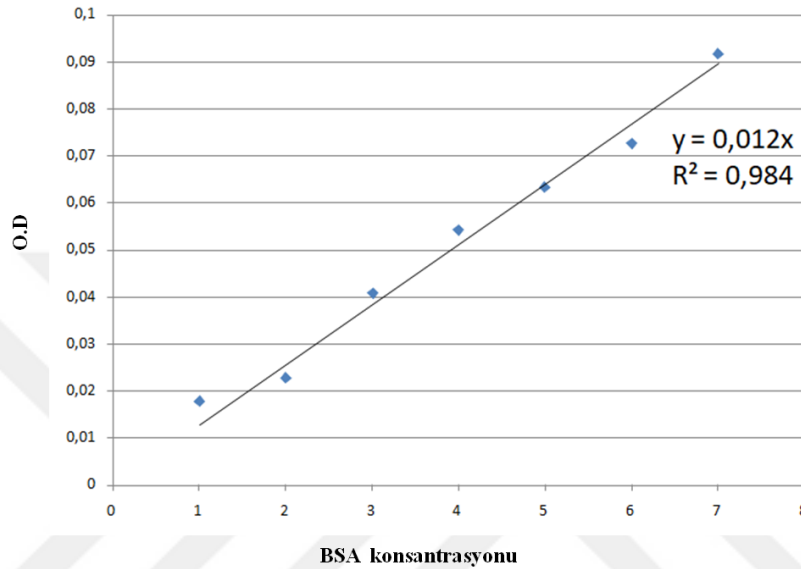
Rekombinant bireylerin Kongo Red Boyama yöntemi ile seleksiyonu için inkübasyon sonunda petri üzerineselülaaz enzim aktivitesinin tespiti için ise 25 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.5), %0,4 selüloz ve %0,4 agaroz (w/v) içeren ortam ayrı petri plakalarının üzerine dökülerek 37 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi dolduktan sonra her bir petri üzerine %0,5 (w/v)'lık Kongo Kırmızısı döküldükten 25 dakika sonra boyanın fazlasının alınması için 1 M'lık NaCl çözeltisi ile yıkanmıştır (Teather ve Wood, 1982).

3.3. Enzim Analizleri

Ksilanaz ile selülaaz enzimleri için hem AGF'lar tarafından hem de klonlama işlemi sonucu elde edilen rekombinant bireyden sentezlenen enzimsel aktivitelerin değerlendirilmesi ve kıyaslanması oldukça önemlidir. Rumen funguslarına ait rekombinant DNA çalışmasına ek olarak rumen bakterisinin sahip olduğu inülinaz enziminin de hücresel ve süpernatant aktivitesinin kantitatif analizleri yapılmıştır.

3.3.1. Protein analizi

Toplam protein konsantrasyonunun tespiti için Bradford (1976) tarafından geliştirilen yöntem ile ‘Sigma-Aldrich BSA Protein Standart’ hazır kiti kullanılmıştır. Protein standart grafiği Bovim Serum Albumin (BSA)’nın farklı konsantrasyonları (1-8 mg/ml) kullanılarak firmanın protokülüne uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen BSA kalibrasyon denklemi Şekil 3.10’de verilmiştir.



Şekil 3.10. Farklı BSA konsantrasyonu sonucu elde edilen protein standardı kalibrasyon denklemi ve grafiği

3.3.2. Anaerobik gut fungus izolatlarında ksilanaz üretimi

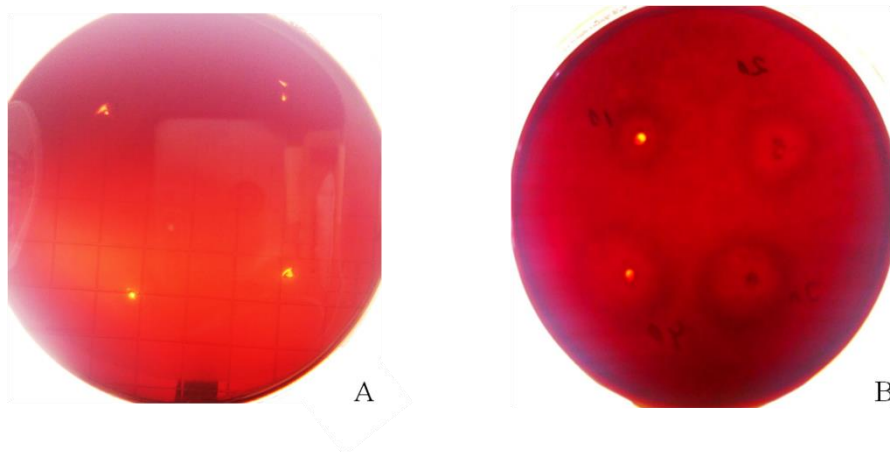
Ksilanaz enzimi üretimi ve ilgili enzimi kodlayan gen bölgesinin tespiti için iki farklı basamakta değerlendirme yapılmıştır. İlk olarak *in vitro* ortamda gelişimi en net gözlemlenen izolat ve bu izolatlar için ksilanaz enzimi üretiminin değerlendirilmesi, ikinci basamakta ise ilgili gen bölgesinin klonlanması için izole edilen fungal kromozomal DNA nanodrop sonucu ve DNA konsantrasyon miktarları değerlendirilmiştir. Buna göre GMLF 1-2-3-4-7-8-9-10 kültür koleksiyonu kodu ile numaralandırılmış olan *Neocallimastix* sp. izolatlarından GMLF 1 izolatının hem enzim üretiminin diğerlerine oranla daha yüksek olması hem de NanoDrop (260/280) O.D. değerinin (1.79 nm)ve DNA konsantrasyon miktarının (41ng/μl) diğer izolatlara oranla optimum bir değere sahip olmasından dolayı ilgili izolat tercih edilmiştir.

3.3.3. Anaerobik gut fungus izolatlarında selüloz üretimi

Selüloz enzimi üretimi ve ilgili enzimi kodlayan gen bölgesinin tespiti için 343.2’de verilen kriterler kullanılmıştır. Buna göre GMLF 5-6-16-17-19-21 kültür koleksiyonu kodu ile numaralandırılmış olan *Orpinomyces* sp. izolatlarından GMLF 19 izolatının hem enzim üretiminin diğerlerine oranla daha yüksek olması hem de NanoDrop (260/280) O.D. değerinin (1.78 nm) ve DNA konsantrasyon miktarının (53 ng/μl) diğer izolatlara oranla optimum bir değere sahip olmasından dolayı ilgili izolat tercih edilmiştir.

3.3.4. Rumen bakteriyel suşlarında inülinaz üretimi

Rumen bakterilerin sahip olduğu inülinaz enzim aktivitesinin tespiti için Lugol-İyot solüsyon metodu kullanılmıştır (Li ve ark.,2011). BİGEM kültür koleksiyonunda bulunan rumen bakterileri optimum *in vitro* koşullar altında gelişimleri tamamlandıktan sonra inülin içeren agarlı plakalara ekimi yapılmıştır. Rumen bakterileri 10-20-30-40 μl’lik farklı konsantrasyonlarda inokulasyonları gerçekleştirilmiştir. İnkübasyondan (37°C’de 36-72 saat) sonra inülin hidrolizinin tespiti için Lugol-İyot solüsyonu (%1.5KI, %1 I₂) plakalara dökülmüş ilk olarak 60 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra dH₂O ile iki defa yıkanmıştır. Yıkama işlemi tamamlanan plakalar bir gece +4°C bekletilmiş ve süre sonunda Şekil 3.11’de gösterildiği gibi zon oluşumuna bağlı olarak inülinaz + veya – şeklinde değerlendirme yapılmıştır.



Şekil 3.11. Lugol-İyot solüsyon metodu ile inülinaz aktivitesi tespiti. Zon oluşumuna bağlı olarak inülinaz – (A) ve inülinaz + (B)

3.3.5. Enzim ekstraktlarının hazırlanması

Ksilanaz ve selüloz enzim aktivite için AGF ile rekombinant *E.coli* DH5 α suşları ile inülinaz enzim aktivitesini için rumenbakteri suşuna ait ekstraktlar süpernatant (hücre dışı) ve hücreli (hücre içi) olmak üzere iki farklı şekilde değerlendirilmiştir. Süpernatant aktivitenin değerlendirilmesi için *in vitro* gelişimi sağlanan örnekler 10 dakika 1200g'de santrifüje tabi tutularak üst kısım süpernatant aktivite için ayrılmıştır. Hücreli aktivitenin değerlendirilmesi için santrifüj sonrası elde kalan pelet iki tekerrür olacak şekilde saf su ile yıkanıp steril bir ependorfa aktarılmış ve sıvı azot yardımı ile mekanik parçalanması gerçekleştirilmiştir.

Hücreli örnek üzerine pH 6.5 olacak şekilde hazırlanan 25mM'lık potasyum fosfat tamponu ilave edilerek 2 dk 10000g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası üst kısım steril bir ependorfa aktarılarak -20°C'de muhafaza edilmiştir (Yazdıcı,2011).

3.3.6. Enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Örneklerin sahip olduğu süpernatant ve hücreli enzim aktivitelerinin belirlenmesi Miller (1959) tarafından geliştirilen DNS (Dinitrosalisilik asit) metodu ile tespit edilmiştir. Çalışma düzeneği deney ve kontrol grubu olarak iki farklı şekilde ayarlanmış ve 3 tekrar olacak şekilde analiz işlemi gerçekleştirilmiştir. Deney grubu için 225 μ l substrat ile 25 μ l örnek (süpernatant ve hücre için ayrı ayrı olacak şekilde) homojen bir şekilde karıştırılarak 50°C'de 45 dk sıcak su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası karışım içerisine 250 μ l DNS ilave edildi ve 5 dk boyunca kaynar su banyosunda enzimin denatürasyon işlemi gerçekleştirildi. Kontrol grubunda ise 225 μ l substrat üzerine 250 μ l DNS ilavesi yapıldıktan sonra 25 μ l hücre solüsyonu eklendi. Pipetasyon ile homojen hale gelen karışım daha sonra 5dk kaynar su banyosuna aktarıldı. Hem deney hem de kontrol grubu kaynar su banyosundan çıkarıldıktan sonra 600 μ l dH₂O eklenerek 540nm dalga boyunda spektrofometrik analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sırasında kullanılacak standartlar ksilanaz için ksiloz, selüloz için glikoz ve inülinaz için fruktoz ile glikoz kullanılmıştır. Bir ünite enzim aktivitesi 60 sn süre boyunca salınan 1 μ mol indirgenen şeker miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.3.7. Optimum pH değerinin belirlenmesi

AGF ile rekombinant *E.coli* DH5 α suşlarından sentezlenen ksilanaz ve selüloz enzimleri ile rumen bakterisinden sentezlenen inülinaz enziminin aktivite gösterdiği optimum pH değerini tespit etmek için farklı pH (2.0-12.0) aralıklarında hazırlanmış

substrat solüsyonları kullanılmıştır. Bunun için de pH 2.0-5.5 aralığı asetik asit-sodyum asetat tamponu, pH 6.0-8.0 aralığı sodyum fosfat tamponu, pH 8.5-9.0 aralığı tris tamponu ve son olarak pH 9.0-12.0 aralığı ise sodyum borat tamponu ile hazırlanmıştır. Farklı pH'da hazırlanan tampon çözeltiler %0.5'lik substrat solüsyonu olacak şekilde ayrı ayrı (son konsantrasyon 25mM) hazırlanarak enzimatik aktivite değerleri (DNS metodu ile) tespit edilmiştir (Kelleci ve Çömlekçioğlu, 2016).

3.3.8. Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

Çalışılan enzimlerin sahip olduğu optimum sıcaklık değerinin belirlenmesinde 3.4.6'da verilen metodoloji olduğu gibi hazırlanmış ve inkübasyon sıcaklıkları ise 30°C, 40°C, 50°C 60°C, 70°C, 80°C ve 90°C olacak şekilde ayarlanmıştır (Çömlekçioğlu, 2009).

3.3.9. pH stabilitesinin belirlenmesi

Çalışılan enzimlerin pH stabilitesinin belirlenmesi için 3.4.7'de verilen yönteme göre farklı pH (3.5-9.0) aralıklarında tampon çözeltiler hazırlanarak enzimlerin her bir tampon solüsyon içerisinde çözünmesi gerçekleştirilmiştir. Her bir enzimin (ksilanaz, selüloz ve inülinaz) termal stabilitesi yüksek olduğu sıcaklıkta 15 dk ön inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresini tamamlayan enzimler buz üzerine alınmış ve optimum koşullarda hazırlanmış substratlar ilave edilerek 3.4.6'da verilen protokol uygulanmıştır. En yüksek (O.D.) pH değerine bağlı olarak rölatif aktiviteleri hesaplanmıştır (Kelleci ve Çömlekçioğlu, 2016).

3.3.10. Termal stabilitenin belirlenmesi

Çalışılan enzimlerin termal stabilitesi belirlenirken enzimler 40, 50, 60 ve 70°C'lik dört farklı sıcaklıkta ön inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem sırasında belirtilen her sıcaklıkta 5, 10, 15 ve 20dk'lık farklı sürelerdeki durumları da değerlendirilmiştir. Farklı sıcaklık ve süreler altında gerçekleşen ön inkübasyon sonrası örnekler buz üzerine alınıp substrat ilavesi yapılarak 3.4.6'da verilen prosedür uygulanmıştır (Çömlekçioğlu, 2009).

3.3.11. Çeşitli kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi

MnCl₂, CoCl₂, CaCl₂, MgCl₂ ve ZnCl₂ bileşiklerinin çalışılan enzimler üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla son konsantrasyonları 1mM ve 10mM olacak şekilde hazırlanan solüsyonlar enzimlerin üzerine eklenerek 15 dk optimum koşullar altında ön inkübasyona uğratılmasından sonra substratlar eklenerek başlık 3.4.6'da verilen işlem

basamakları tekrarlanmıştır. Enzim aktivitesinin değerlendirilmesi için kontrol grubuna herhangi bir kimyasal eklenmemiştir. Bundan dolayı kontrol grubu aktivitesi 100 olarak kabul edilmiştir.

3.3.12. Enzim aktivitesi sonucu oluşan ürünlerin ince tabaka kromatografisi ile belirlenmesi

Enzim aktivitesi sonucunda tepkimeye giren substrat (reaktant)'ın hidrolizi ile oluşan son ürünlerin tespiti için ince tabaka kromatografisi (TLC) kullanılmıştır (Poole,2003). Bir gece boyunca inkübasyona bırakılan örnekler 1 ml'lik steril ependorf tüplerine aktarıldıktan sonra kaynar su banyosunda 15 dk bekletilmiştir. Kaynar su banyosundan çıkarılan örnekler oda sıcaklığına gelince kadar dışarıda soğumaya alınmıştır. Soğuma işlemi sonrası üzerine 1.7µl % 85'lik TCA solüsyonu ilave edilerek 10000 g'de 25 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı ayrı bir ependorfa alınarak üzerine -20°C' de bekletilmiş saf etanolden 1 ml eklenerek 10000g'de 25 dk santrifüj yapılmıştır. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine -20°C' de bekletilmiş saf etanolden 1 ml eklenmiş ve 10000g'de 25 dk santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde kalan pelet 1 ml dH₂O'da çözülerek +4°C altında muhazafa edilmiştir (Bunja ve ark.,2022).

Yükleme örnekleri hazırlandıktan sonra standart grupları olarak 1mg/ml olacak şekilde glikoz, fruktoz, ksiloz, ksilobioz, selüloz, inülin ve ksilan molekülleri dH₂O'da çözülmüştür. Örnek ve standart gruplarından 2µl alınarak Silika tabak (Merck, Silica gel60, 20x20) üzerine yüklemeler yapıldıktan sonra Silika plakalar Mobil faz içerisine yerleştirilmiştir. Mobil Faz (MF) olarak Bunja ve ark.(2022) tarafından tercih edilen Kloroform: Asetik Asit: dH₂O (30V:35V:5V) kullanılmıştır.

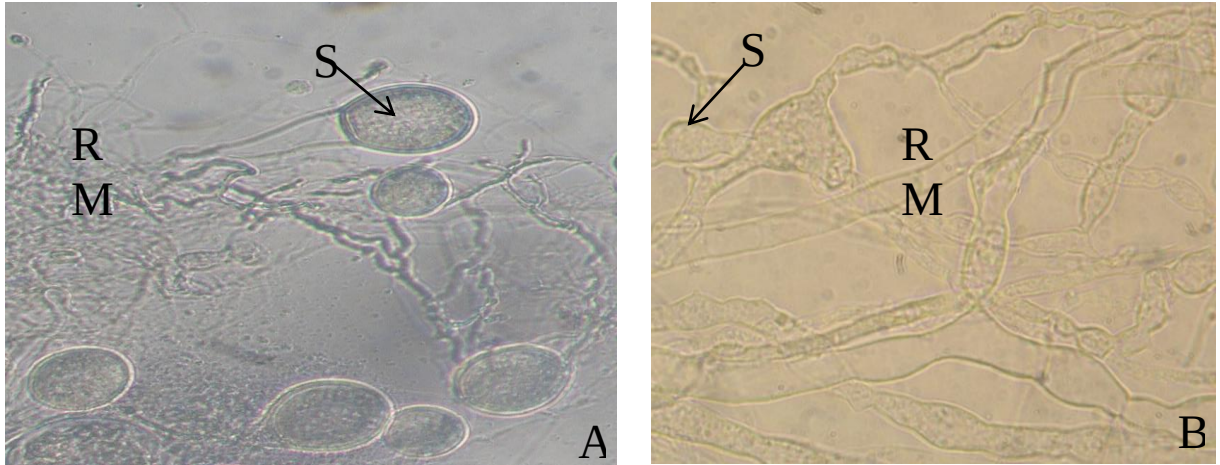
MF'de koşturma işlemi tamamlandıktan sonra Silika tabak üzerine karbonhidratların görüntülenmesi için Methanol : Sülfirik Asit : N-(1-Naftil) Etilendiamin Dihidroklörür (19V:1V:0.06W) püskürtülmüştür (Bunja ve ark.,2022). Bu işlemten hemen sonra 110°C'lik etüv içerisinde 15 dk bekletilmiştir. Bantların ortaya çıkmasından sonra standart grup ile örneklerin aldıkları mesafe karşılaştırılarak 'Retention Factor'leri (R_f: Çözünen madde mesafe /çözücü madde mesafe) tespit edilmiştir (Meyers ve Meyers,2008).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Biyoteknolojik potansiyeli olan ksilanaz ve selüloz enzimleri için AGF ve rekombinant suşlardan (*E.coli*DH5α) sentezlenen enzimlerin karakterizasyon ve moleküler çalışmaları gerçekleştirilerek kıyaslanmışlardır. Probiyotik kökenli inülinaz enziminin ise ilk defa rumen kaynaklı *Selenomonas ruminantium* suşundan tespiti gerçekleştirilmiş ve bu enzime ait karakterizasyon işlemleri yapılmıştır.

4.1. Anaerobik gut fungusların aktifleştirilmesi ve kültüre alınması

AGF kültür koleksiyonunda bulunan fungal izolatlardan başlık 3.2.1’de verilen kriterler esas alınarak izolatların aktifleştirmeleri gerçekleştirilmiştir. Ksilanaz enzim aktivitesi için GMLF 1-2-3-4-7-8-9-10 (*Neocallimastix* sp.) izolatları ve selüloz enzim aktivitesi için GMLF 5-6-16-17-19-21 (*Orpinomyces* sp.) izolatları sıvı azot (-196°C) tankından alınarak oda sıcaklığında çözünmeleri sağlanmıştır. Çözünme işlemi sonrası 39°C sıcaklıkta bekletilen basal besi ortamına anoksik koşullar bozulmaksızın aktarımları gerçekleştirilmiş ve izolatların aktifleşmeleri (yaklaşık 48 saat) sonrası düzenli olarak alt kültür çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada kullanılan monosentrik tallus morfolojisine sahip *Neocallimastix* sp. (GMLF 1) ile polisentrik tallus morfolojisine sahip *Orpinomyces* sp. (GMLF 19) izolatlarına ait mikrografi görüntüleri Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan *Neocallimastix* sp. (A) ve *Orpinomyces* sp. (B) izolatlarına ait mikrografik görüntü (S:Spor kesesi, RM: Rizomiselyum)

Rumen funguslarının *in vitro* ortam koşullarında besin gereksinimleri ve aseksüel büyüme hızı gibi durumlarından dolayı belli zaman aralıklarında alt kültüre alınmaları gerekmektedir (Çömlekçi ve ark., 2008). Rumen funguslarının ilk alt kültür uygulaması

samanlı besi ortamında gerçekleştirildikten sonra (inkübasyon sonrası üç günde bir olacak şekilde), optimum gelişim gösterdiği glikozlu besi yerinde ortalama olarak iki günde bir olmak üzere alt kültür uygulaması gerçekleştirilmiştir (Lowe ve ark., 1987).

4.2. *Neocallimastix* sp.'ye ait Ksilanaz Enzimi Üretimi ve Karakterizasyonu

Anaerobik gut fungusların sahip oldukları glikozit hidrolaz enzim etkinliği *in vitro* koşullar altında gözlemlenebilmektedir (Thajera ve ark., 2006; Karaman ve ark., 2022). Özellikle Karbonhidrat-Aktif Enzim (CAZyme) etkinliğine sahip ve glikozit hidrolaz ailesine üye olan ksilanaz enziminin aktivitesi oldukça önemlidir (Yücel ve ark., 2022). Bu enzim mikroorganizmanın simbiyotik yaşam sürdüğü konakçısı dışında endüstriyel sektörde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Cheng ve ark., 2015). Bu nedenle 3.4.2'deki kriterlere göre *Neocallimastix* sp. (GMLF1) saf izolatlarına ait olan hücresel ve süpernatant enzim aktiviteleri incelenmiştir (Çizelge 4.1).

AGF'lar optimum koşulların (enerji kaynağı, ortam sıcaklığı vb.) sağlanması sonucu basal besiyeri içerisinde 5-15 gün boyunca alt kültüre alınmadan canlı kalabilmektedirler (Lowe ve ark., 1987). Bu nedenle öncelikli olarak *Neocallimastix* sp.'ye ait saf kültür oluşturulmuş ve buna bağlı olarak dokuz gün boyunca 39°C'da anaerobik koşullar bozulmaksızın başlık 3.2.3'de belirtilen basal besiyerine inokule edilmek suretiyle inkübasyona bırakılmıştır. *Neocallimastix* sp. izolatından ksilanaz enzim sentezini desteklemek için basal besiyerine enerji kaynağı olarak ksilan kullanılmıştır. Inkübasyon işlemi üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve her bir gün için inokülasyon yapılmış farklı tüpler kullanılmıştır. Inkübasyon süreleri boyunca en yüksek ksilanaz aktivitesinin beşinci günde olduğu gözlemlenmiştir. Rumen fungusunun hücresel spesifik aktivitesi 197.3 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein ve süpernatant spesifik aktivitesinin ise 412.01 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olduğu tespit edilmiştir. Rumen funguslarının düzenli olarak alt kültüre alınma (Ekinci ve ark., 2006) ve ticari boyutta yapılan enzim çalışmaları (Djkerman ve ark., 1996) dışında genel olarak en yüksek ksilanaz enzim aktivitesinin inokülasyonun beşinci gününde tespit edildiği bilinmektedir. Bununla birlikte *Neocallimastix* sp.'in *in vitro* koşullar altındaki en yüksek ksilanaz enzim aktivitesi de inokülasyonun beşinci gününde tespit edilmiştir (Karaman ve ark., 2022).

Çizelge 4.1. *Neocallimastix* sp.'ye ait ksilanaz enziminin hücresel ve süpernatant spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) ve toplam enzim ($\mu\text{mol/dk/ml}$) aktiviteleri

GÜN	SÜPERNATANT		HÜCRESEL	
	Toplam Aktivite ($\mu\text{mol/dk/ml}$)	Spesifik Aktivite ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)	Toplam Aktivite ($\mu\text{mol/dk/ml}$)	Spesifik Aktivite ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)
1	12,4	76,01	1,7	15,5
2	34,8	192,03	16,1	90,08
3	59,1	281,7	36,01	98,7
4	79,14	314,14	42,08	121,1
5	132,01	412,01	97,12	197,3
6	126,7	305,1	87,72	141,42
7	109,1	297,4	64,44	109,08
8	98,1	205,17	59,35	105,01
9	70,4	197,14	55,01	96,08

Neocallimastix sp. izolatından sentezlenen ksilanaz enziminin hücre içi (hücresel) ve hücre dışı (süpernatant) aktivite gösterdiği bununla birlikte enzimin, çalışmanın yapıldığı farklı zaman dilimlerinde hücre dışında daha aktif olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1). *In vitro* koşullar altında AGF'lar tarafından sentezlenen ksilanaz enzimlerinin aktiviteleri incelendiğinde enzim aktivitelerinin hazırlanan *in vitro* koşullara bağlı olarak hücre içi ve hücre dışında farklılık gösterebildiği bilinmektedir (Mountfort, 1994).

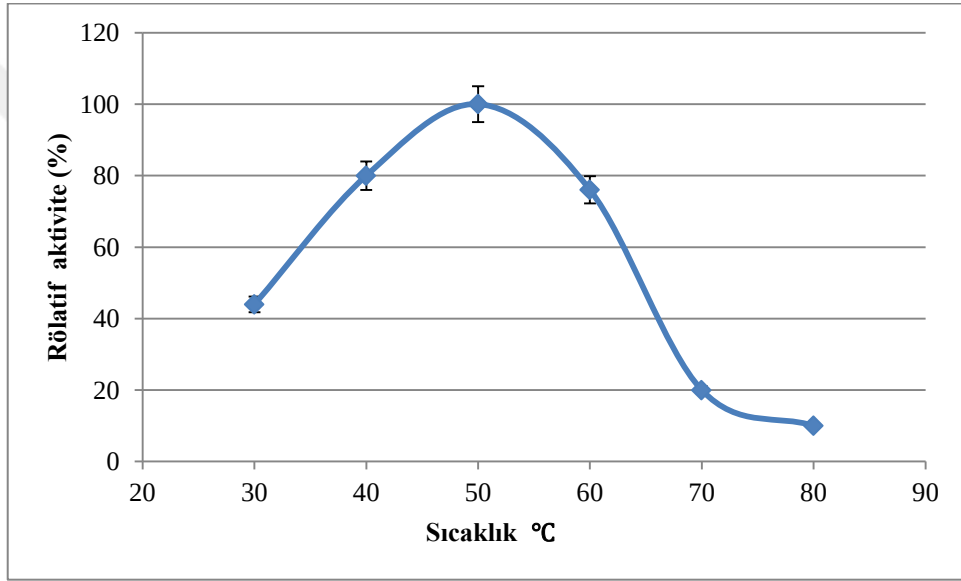
Nitekim Gomez de Segura ve ark. (1998), *N. frontalis*'e ait ksilanaz enzimlerinin hücre içi aktiviteye sahip olmasına rağmen hücre dışında daha fazla aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Kar ve Torcan (2022), *Neocallimastix* sp. (MGFL1, MGLF2 ve MGLF3) izolatlarından salgılanan ksilanaz enzim aktivitesinin de çoğunlukla hücre dışında olduğunu belirtmişlerdir.

4.2.1. *Neocallimastix* sp.'ye ait ksilanaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi

Herbivor canlıların optimum rumen sıcaklığının 39°C olmasına rağmen ksilanaz enziminin maksimum seviyede aktive olduğu sıcaklık değerinin 40-60°C arasında olduğu bilinmektedir (Hebraud ve Febre, 1990; Huang ve ark., 2005; Bu ve ark., 2018).

Çalışmamızda *Neocallimastix* sp. izolatına ait ksilanaz enzim aktivitesinde ortam sıcaklığının 30°C olması ile %40 oranında rölatif aktivite tespit edilmiştir. Ortam sıcaklığının 40°C olması ile bu aktivite yaklaşık olarak iki katına çıkmış ve %80'lik bir

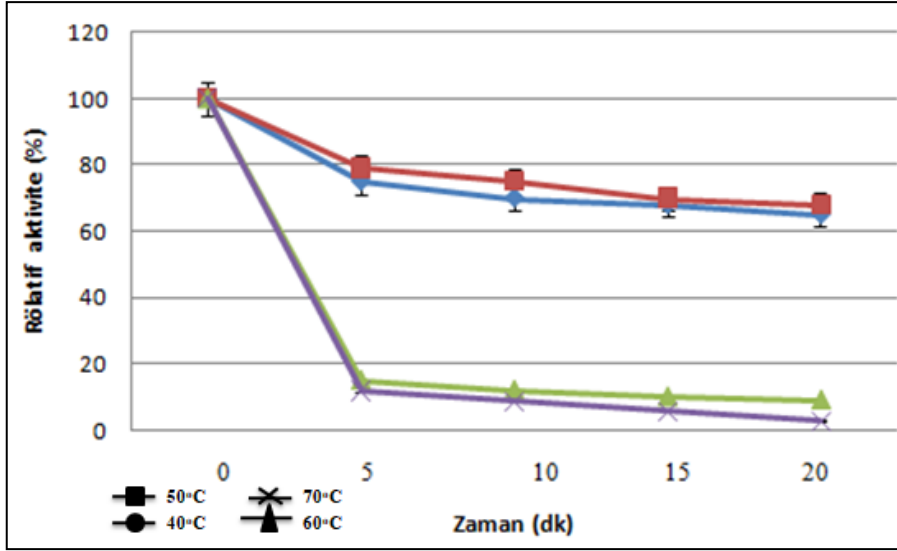
rölatif aktivite belirlenmiştir. Enzimin maksimum etkinlik gösterdiği sıcaklık değerinin ise 50°C olduğu ve sonraki 10°C'lik artış ile enzim aktivitesinde yaklaşık olarak %24 oranında azalma tespit edilmiştir. Bununla birlikte ortam sıcaklığının 70°C ve üzerinde olması enzimin aktivesinde %80 ve daha fazla azalmaya neden olmuştur. Yüksek sıcaklıkta aktif veya kararlı enzimlerin substrat viskozitesini azalttığı ve enzim substrat kompleksinin etkinliğinde azalmaya neden olduğu bilinmektedir (Turner ve ark., 2007). *Neocallimastix* sp. izolatu tarafından sentezlenen ksilanaz enziminin de optimum çalışma sıcaklığı değeri üzerindeki bir sıcaklıkta substrat viskozitesini azalttığı ve bu nedenle enzim aktivite kaybının gerçekleştiği tespit edilmiştir. *Neocallimastix* sp.'ye ait olan ksilanaz enziminin farklı sıcaklıklarda gösterdiği rölatif aktive değerleri Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. *Neocallimastix* sp.'ye ait olan ksilanaz enziminin farklı sıcaklıklarda gösterdiği rölatif aktive

4.2.2. *Neocallimastix* sp.'ye ait ksilanaz enziminin termal stabilitesinin belirlenmesi

Termoistabil enzimler genellikle, bir organizmanın büyümesi için gerekli olan maksimum sıcaklığın üzerinde bir optimum sıcaklığa sahip veya uzun bir süre boyunca 50°C'nin üzerinde olağanüstü kararlılık gösteren enzimler olarak tanımlanır (Gupta ve ark., 1999). Bu nedenle izolata ait ksilanaz enzimi sahip olduğu termal kararlılığın tespiti için, farklı sıcaklık (40-50-60-70°C) ve sürelerde (5-10-15-20 dk) substrat ilave edilmeden ön inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon süreleri tamamlandıktan sonra substrat (Ksilan-10mg/ml) ilavesi yapılarak enzimin sıcaklık toleransı, başlangıç aktivitesinin korunması veya kalan aktivitenin değerlendirilmesi yapılmıştır (Şekil 4.3).



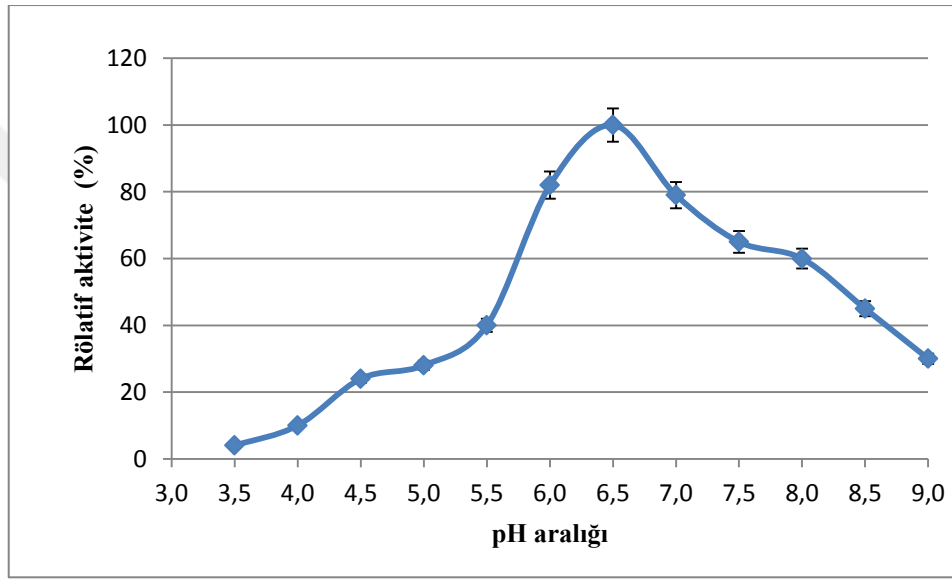
Şekil 4.3. *Neocallimastix* sp.’ye ait olan ksilanaz enziminin termal stabilitesi

Ksilanaz enzimi maksimum 50°C sıcaklıkta çalışmasına (Bkz. 4.2.1) rağmen yüksek sıcaklıklarda termal stabilitesinin olmadığı gözlemlenmiştir. *Neocallimastix* sp. tarafından sentezlenen ve ksilanın hidrolizinde görevli olan bu enzim grubunun (Bkz. 1.9.2) *in vitro* kültür ortamında 60°C’de yaklaşık olarak %70’e yakın aktivite göstermesine rağmen (Şekil 4.2) kısa süreli ön inkübasyona (5, 10, 15 ve 20 dk) tabi tutulduktan sonra termal stabilitesindeki dramatik düşüşün (yaklaşık %15) ksilanaz enzimlerinin sahip olduğu katalitik domain bölgesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Akyol ve ark. (2009), *Neocallimastix* sp. izolatına ait ve ksilanaz sentezleyen *xyl2A* gen bölgesinin termal stabilite çalışmalarında ilgili bölgeye ait enzimin 5, 10, 15 ve 20 dk’lık ön inkübasyon sonrası 60°C’deki enzimsel aktivitenin yaklaşık olarak %90 oranında azaldığını rapor etmişlerdir. Cheng ve ark. (2014) *Neocallimastix patriciarum*’un ksilanaz enzimi sentezleyen *xynC* genine ait katalitik domain bölgesindeki çalışmalar sonrası enzimin aynı sıcaklıkta farklı aktivitelere sahip olduğunu göstermişlerdir. *Neocallimastix* sp. tarafından sentezlenen ksilanaz enziminin özellikle farklı zaman dilimlerindeki rölatif aktivite yüzdesinin azalması ksilanın hidrolizinde görevli olan enzimin yüksek termal kararlılığa sahip olmadığını göstermiştir.

4.2.3. *Neocallimastix* sp.’ye ait ksilanaz enziminin optimum pH’sının belirlenmesi

Enzimlerin sahip olduğu konformasyon yapısı ve katalitik domain bölgesinde bulunan aminoasitlerin aktivite göstermesi ortamın pH’ı ile doğrudan ilgili olmakla birlikte, bir enzimin optimum pH değeri tespit edilirken pH-aktivite eğrisinin maksimum

değeri o enzim için optimum olarak kabul edilmektedir (Bisswanger, 2014). Buna ek olarak herbivor canlıların sindirim kanalının en önemli parçası olan rumen içi pH aralığının 5.5-7.0 arasında değişebildiği (Kamra, 2005) ve rumen funguslarına ait ksilanaz enzimin bu pH aralıklarında optimum düzeyde çalıştığı bilinmektedir (Lowe ve ark., 1987; Borneman ve ark., 1989). *Neocallimastix* sp.'den sentezlenen ksilanaz enziminin optimum pH değerinin tespiti için farklı pH aralıklarında enzim aktivite değerleri ölçülmüş ve en yüksek aktivite değeri pH 6.5 olarak tespit edilmiştir. *Neocallimastix* sp.'ye ait olan ksilanaz enziminin farklı pH aralığında gösterdiği rölatif aktive Şekil 4.4'de verilmiştir.



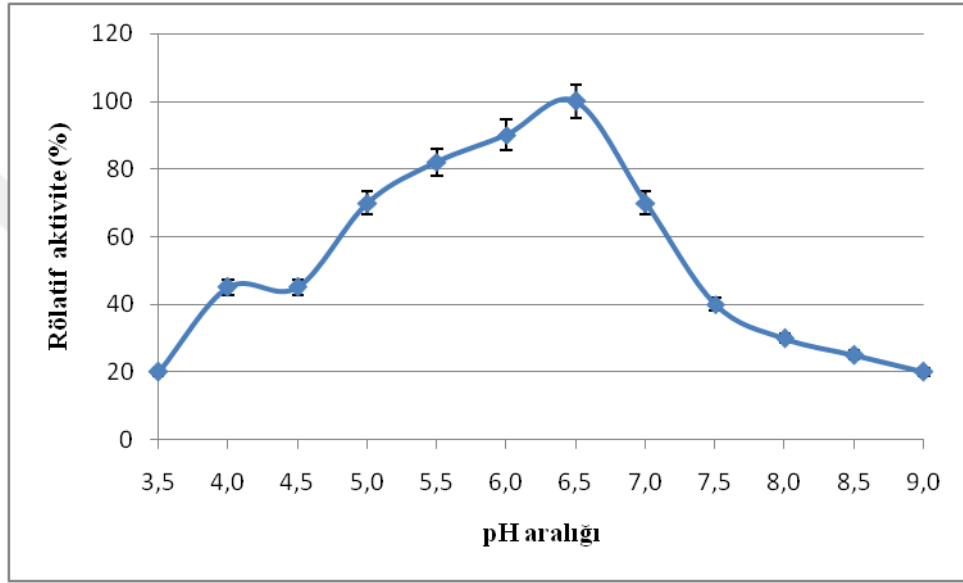
Şekil 4.4. *Neocallimastix* sp.'ye ait olan ksilanaz enziminin farklı pH aralığında gösterdiği rölatif aktive

4.2.4. *Neocallimastix* sp.'ye ait ksilanaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi

Bir enzimin pH stabilitesi, enzimi sentezleyen gen bölgesindeki katalitik domain alanında mevcut olarak kodlanan aminoasitlerin asidik veya bazik özelliği ile ilgilidir (Paes ve ark., 2011). Bununla birlikte bir enzimin endüstriyel alanda yüksek bir stabiliteye sahip olması kullanılacak enzim için de büyük bir avantajdır (Eijsink ve ark., 2004).

Bu nedenle *Neocallimastix* sp. izolatına ait ksilanaz enziminin endüstriyel stabilite bakımından önemli bir parametre olan pH stabilitesi belirlenmiştir. Çalışmamızda *Neocallimastix* sp. izolatına ait fungal ksilanaz enzimi optimum çalışma sıcaklığı olan 50°C'da 20 dk boyunca farklı pH değerlerinde (pH 3.5-8.0) ön inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda uygun pH'da (Bkz.3.4.5) hazırlanan substrat ile enzim aktivite tayinleri gerçekleştirilmiş ve Şekil 4.5 verilen rölatif aktiviteler bulunmuştur.

Neocallimastix sp. izolatından sentezlenen ksilanaz enziminin pH 4.5'den sonra enzimaktivitesinin %50'nin üzerine çıkmaya başladığı görülmüştür. Bu ve ark. (2018), *Neocallimastix patriciarum*'a ait ksilanaz enziminin pH stabilitesini belirlemek için enzimi farklı pH'larda 10 dk boyunca inkübasyon işlemine tabi tutmuş ve pH 5.0'dan itibaren aktivitesinin %50'ye ulaştığını rapor etmişlerdir. Ayrıca *Neocallimastix* sp.'ye ait olan farklı izolatlardan sentezlenen ksilanaz enziminin pH kararlılığının yaklaşık olarak 5.0 ile 7.5 arasında olduğu rapor edilmiştir (Zhu ve ark.,2020).



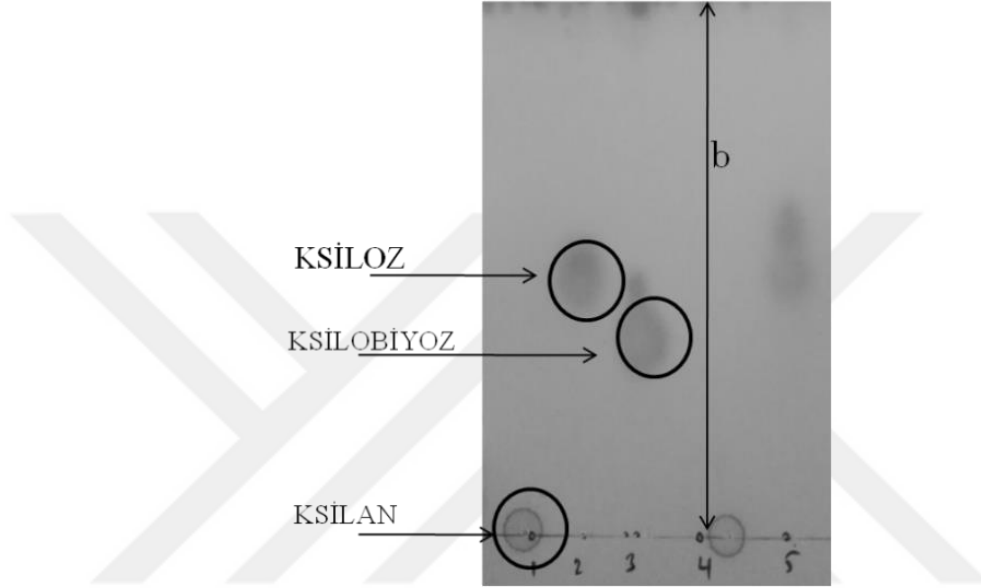
Şekil 4.5. *Neocallimastix* sp.'ye ait olan ksilanaz enziminin pH stabilitesi

Neocallimastix sp.'ye ait ksilanaz enziminin optimum çalıştığı pH aralığı tespit edilirken (Bkz. 4.2.3) ortam pH'nın 3.5 olduğu zaman diliminde rölatif aktivitenin % 1-5 arasında olduğu ancak pH stabilitesi tespit edilirken aynı pH değerinde enzimin %20'lik rölatif bir aktivitesi olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun enzimin yapısında bulunan aminoasitlerin optimum etkinlik gösterdiği pH değeri ve enzime uygulanan ön inkübasyon işleminden kaynaklandığı düşünülmüştür.

4.2.5. *Neocallimastix* sp.'ye ait ksilanaz enzim aktivitesi sonucu oluşan ürünlerin ince tabaka kromatografi ile tespiti

Neocallimastix sp.'ye ait ksilanaz enzimin inkübasyonun beşinci günündeki süpernatant aktivitesinin en yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle beşinci güne ait olan kültürlerden elde edilen enzim ekstraktı ile 10 mg/ml ksilanın 10 dk. inkübe edilmesi sonucu elde edilen hidroliz ürünlerine ait ince tabaka kromatografi

bulguları Şekil 4.6’da verilmiştir. *Neocallimastix* sp. izolatına ait ksilanaz enziminin ksilan substratını hidroliz etmesi sonucu büyük miktarda ksilozun açığa çıktığı gözlemlenmiştir. Rumen fungal ksilanaz aktivitesinin son ürün tespiti için yaygın olarak ince tabaka kromatografisi (TLC) kullanılmaktadır (Wen ve ark., 2021; Liu ve ark., 2022). Gomez ve Fevre (1993) *Neocallimastix frontalis* tarafından sentezlenen ksilanaz enzimin hidroliz reaksiyonu sonucu oluşan ksilozun tespitini ince tabaka kromatografisi (TLC) yardımıyla gerçekleştirmişlerdir.



Şekil 4.6. *Neocallimastix* sp. izolatına ait ince tabaka kromagram (TLC) görüntüsü

1-4:Ksilan standart çözeltisi, 2.Ksiloz standart çözeltisi, 3:Ksilobiyoz standart çözeltisi, 4:Enzim ektrat çözeltisi, b:Çözünün aldığı mesafe,5: *Neocallimastix* sp. (GMLF1) süpernatant

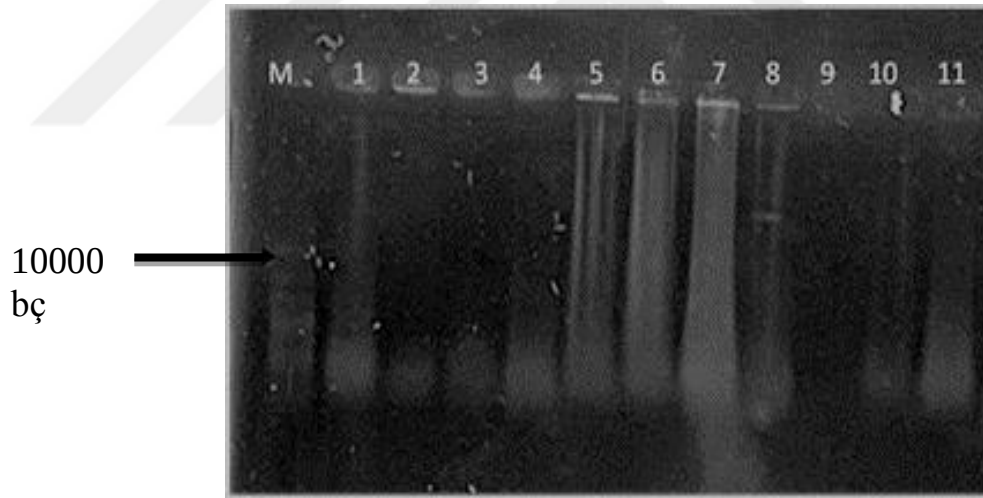
TLC’ de elde edilen ürünün saflık derecesinin kantitatif olarak yorumlanmasında R_f (Retention factor) değeri kullanılmaktadır. R_f değeri, 0 ila 1 değerleri arasında değişen ve ürünün yürüme mesafesi olarak bilinen bir değerdir (Komsta ve ark., 2010; Ciura ve ark., 2017).

Neocallimastix sp. izolatının enzimsel aktivite sonrası TLC görüntülemesinde oluşan bantlaşmada ksilozun R_f değeri hesaplanmış (Bkz.3.4.12) ve $R_f=0.5$ olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç Antosch ve ark. (2010) tarafından belirlenen ksiloz R_f değeri ile de benzerlik göstermiştir.

4.3. Anaerobik Gut Funguslardan Kromozomal DNA İzolasyonu

Klonlama çalışmalarının temelinde kromozomal DNA izolasyon basamağı bulunmaktadır. Fungal kromozomal DNA izolasyonu için oldukça farklı yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerden sadece birkaç tanesi rumen fungal kromozomal DNA izolasyonu için uygun kabul edilmektedir. Çalışmada rumen fungal kromozomal DNA izolasyonu için klasik CTAB metodu tercih edilmiştir. Elde edilecek olan DNA' nın saflık derecesi, DNA miktarı ve kimyasal kalıntıların ortamdaki uzaklaştırılması gibi sebeplerden dolayı bu metod kullanılmıştır.

Kromozomal DNA izolasyonu için maksimum seviyede zoospor salınımının gerçekleştiği samanlı besi ortamından enjektör yardımı ile glikozlu besi ortamına inokülasyonlar gerçekleştirilmiştir. İzolatların gelişim basamakları mikroskop yardımı ile takip edilmiş, ortalama 2-3 gün inkübe edildikten sonra fungal hücreler santrifüj yöntemi ile toplanmış ve hücre duvarları fiziksel olarak sıvı azot ve hücre kırıcısı (mixer miller) yardımıyla yıkılmıştır. CTAB metod protokolüne (Bkz.3.3.1) uygun şekilde izole edilen fungal kromozomal DNA' ların agaroz jel (%1) görüntüsü Şekil 4.7' de verilmiştir.



Şekil 4.7. CTAB metodu sonucu elde edilen fungal kromozomal DNA' larına ait agaroz jel görüntüsü. *Neocallimastix* sp.'ye ait genomik DNA' lar 1' den 5' a kadar sırası ile GMLF 7-4-3-2-1. *Orpinomyces* sp.'ye ait genomik DNA' lar ise 6' dan 11' e kadar sırası ile GMLF 16-19-21-17-6-5.

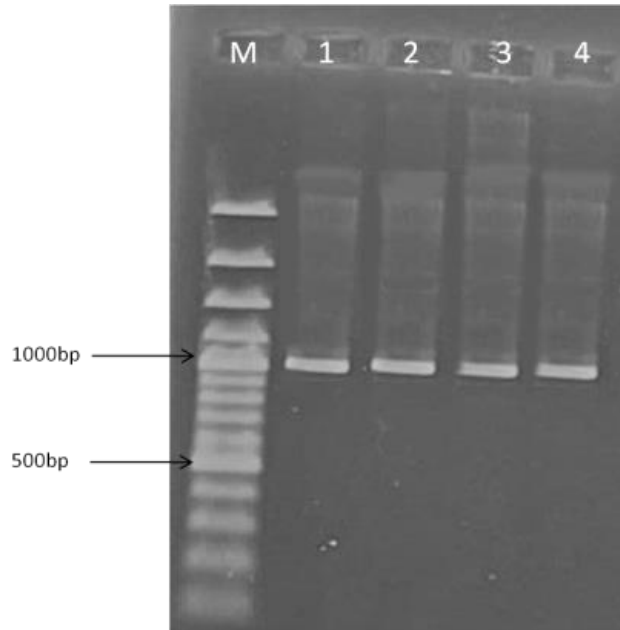
Şekil 4.7' de verilen fungal kromozomal DNA' larına ait agaroz jel görüntüsünde kimyasal kirlilikler görülmesine rağmen 2,5,6,7,8 numaralı örneklerin bulunduğu kuyucuğa yakın yerlerde görüntülenene parlaklıklar kromozomal DNA varlığını göstermektedir.

4.4. *Neocallimastix* sp.'ye ait Ksilanazenzimini Kodlayan Gen Bölgesinin Klonlanması ve Karakterizasyonu

AGF'lar ksilanın hidrolizi için gerekli olan enzim aktivitesine sahip olmakla birlikte *Neocallimastix* izolatlarına ait ksilanaz enziminin *in vitro* koşullarda diğer fungal endo hidrolitik enzim grupları içerisinde daha aktif bir yapıya sahip olduğu bilinmektedir (Mountfort ve Asher, 1989; Çömlekçioğlu, 2009). Bu nedenle çalışmamızda *Neocallimastix* sp.'ye ait ksilanaz enzim aktivitesinin hem kantitatif hem de moleküler düzeyde incelenmesi gerçekleştirilmiştir.

4.4.1. *Neocallimastix* sp. İzolatlarında ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesinin tespiti

AGF'lara ait olan ksilanaz enzimi gen bölgesinin tanımlanması ve bu bölgeler için uygun primerlerin tasarlanması çeşitli (NCBI, Primer3Plus vb.) veri tabanları kullanılarak tespit edilmiştir. Ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesinin GMLF 1-2-3-4-7 AGF izolatlarından PZR yardımıyla tespiti için başlık 3.2.7.1'de verilen kriterler kullanılmış ve amplifikasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. PZR işlemi sonucu *Neocallimastix* sp. izolatlarının ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesine ait olduğu tahmin edilen yaklaşık 1 kb uzunluğundaki PZR ürünlerinin %0.8'lik agaroz jel (w/v) görüntüsü Şekil 4.8'de verilmiştir.



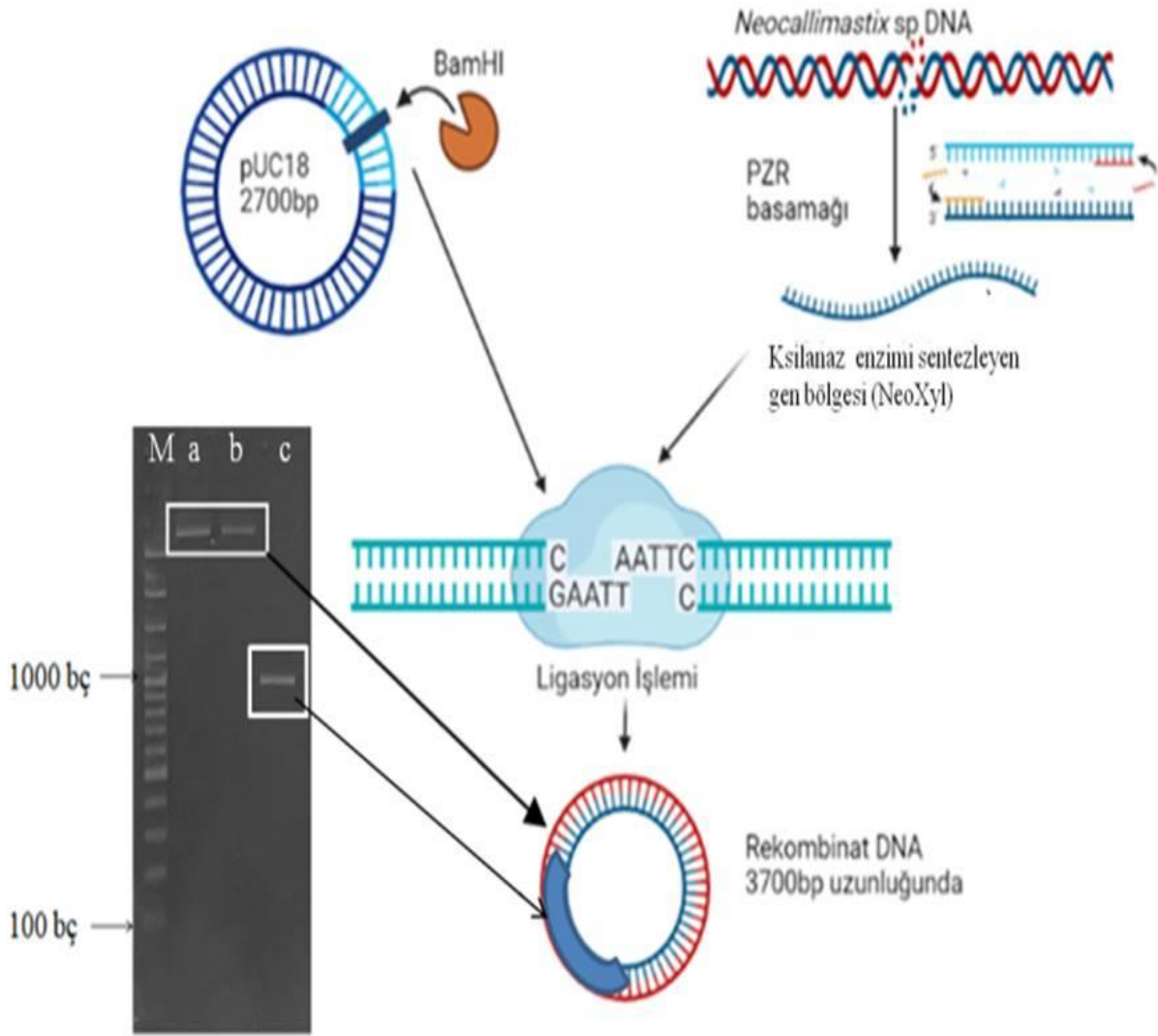
Şekil 4.8. *Neocallimastix* sp. izolatlarında xynA primerleri ile gerçekleştirilen PZR.
M:100bp 1:GMLF1 2:GMLF2, 3:GMLF3, 4: GMLF:4

Şekil 4.8’ de AGFGMLF-7 izolatına aitksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesinin PZR işleminde çalışmaması üzerine agaroz jelde yer verilmemiştir. Bununla birlikte GMLF 1 izolatının seçimindebaşlık 3.4.2.’de belirtildiğiüzere fungal DNA’ya ait NanoDrop (260/280) sonucu, DNA konsantrasyon miktarı ve optimum koşulların oluşturulması sonrası ksilanaz enzim üretimin fazlalığı etkili olmuştur. Aynı zamanda ilgili izolata ait BİGEM laboratuvarında ksilanaz enzimini kodlayan farklı gen bölgelerinin çalışmasına ek olarak enzimin kodlayan diğer gen bölgesinin de taranması izolat tercihine katkı sağlamıştır.

4.4.2. *Neocallimastix* sp. izolatına ait ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesinin *E.coli*’ye klonlanması

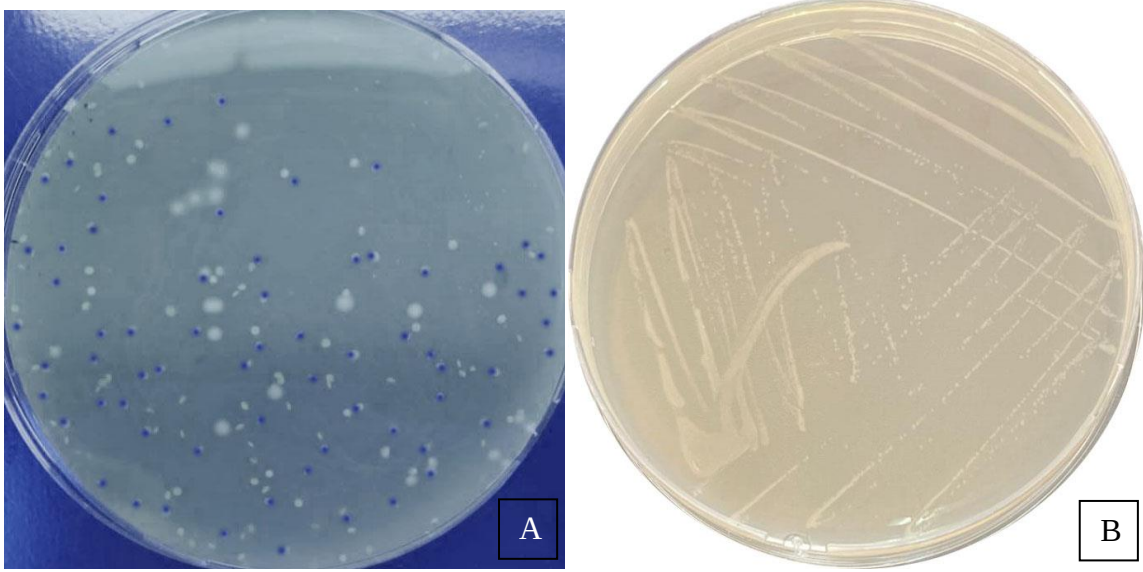
Neocallimasix sp.’ye ait ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesinin tespiti gerçekleştirildikten sonra bu bölgenin pUC18 plazmit DNA’ya klonlanması ve *E.coli* DH5 α ’ya transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen rekombinat suş *E.coli*/Xyn olarak isimlendirilmiştir. Ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesinin vektör plazmite ligasyonu için *Bam*HI restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesi içeren primerler yardımıyla PZR işlemine tabi tutulmuştur. Restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesi bulunduran ksilanaz enzim gen bölgesi pUC18 plazmit DNA’ya T4 DNA ligaz enzimi yardımıyla başlık 3.2.10’daki işlem basamakları uygulanarak ligasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.9). pUC18 plazmit DNA’sı 3.2.10’da verilen plazmit özellikleri dışında *Neocallimastix patriciarum*’a ait ksilanaz enziminin eksprerasyon hızında pozitif bir artışa sebep olması (Thamblyn ve ark.,1993) bu plazmitin kullanılmasını desteklemiştir. Ksilanaz enzimi gen bölgesinine ait enzim eksprasyon işlemi için *lacZ*’nin yapısında bulunan promotor bölgesi kullanılmıştır.

Rumen fungal gen bölgelerinin ökaryotik karaktere sahip olmasına rağmen promotor bölgeleri prokaryot promotor bölgeleri ile oldukça yüksek oranda homolojiye sahip olduğu ve prokaryotik promotor bölgelerin bu genleri aktive ettiği bilinmektedir (Fischer ve ark., 1995; Denman ve ark., 1996; Durand ve ark., 1997).



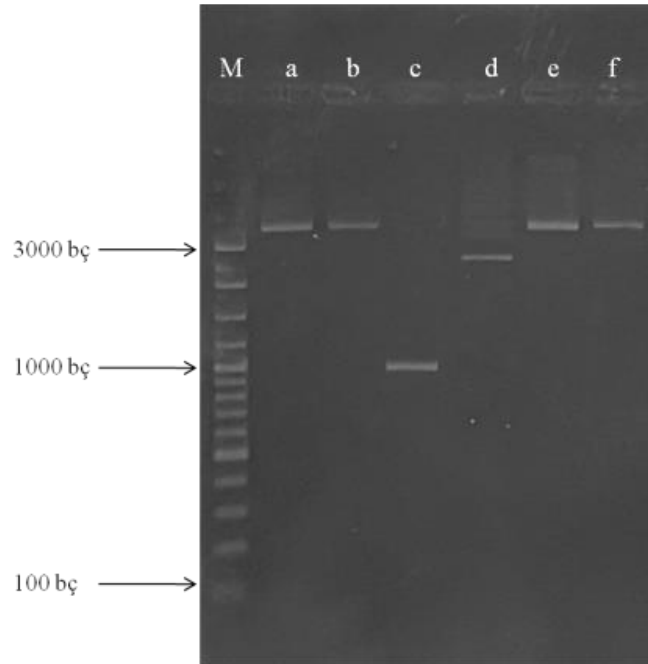
Şekil 4.9. PZR işlemi sonucu elde edilen ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesinin pUC18 plazmit DNA'ya ligasyonu (M:100bç, a-b:pNeoXyl, c-d:PZR ile amplifiye edilen ksilanaz enzimi kodlayan DNA parçası)

Rekombinant plazmitin *E.coli* DH5 α 'ya CaCl₂ metodu ile transformasyonundan sonra transforme işleminin gerçekleştiğini tespit etmek için, 'Beyaz/Mavi Seçilim' yöntemi kullanılmıştır. Beyaz/Mavi Seçilim yöntemi ile *E.coli* DH5 α suşunun LB/Amp/X-gal/Agar'lı katı besiy ortamına ekimleri yapılmış ve bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda rekombinant bireylerde (*E.coli*/Xyn suşu) ise beyaz koloni oluşumu gözlemlenmiştir. Rekombinant bireyler alınarak saflaştırma işleminden sonra uygun koşullar altında muhafaza edilmiştir (Şekil 4.10).



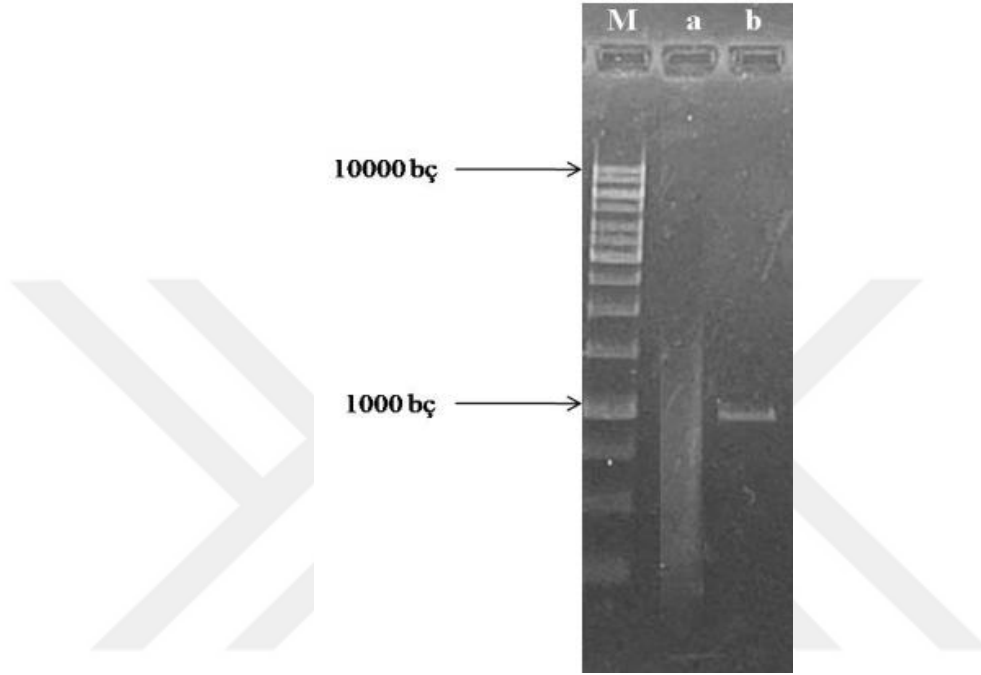
Şekil 4.10. ‘Beyaz/Mavi Seçilim’ yöntemi sonucu rekombinant bireylerin seleksiyonu. Beyaz ve Mavi renkli kolonilerin oluşturduğu petride mavi renkli koloniler rekombinat olmayan, beyaz renkli koloniler ise rekombinat suşları göstermektedir (A), rekombinant beyaz kolonilerin çizme yöntemi ile gösterimi (B)

pNeoXyl plazmitinin konak hücreye aktarıldığının tespiti gerçekleştirilmek için plazmit izolasyon kiti kullanılarak (sigma-plasmid miniprep Kit) pNeoXyl rekombinant plazmit izolasyonu yapılmıştır. Ksilanaz enzimi sentezleyen gen bölgesi ve pUC18 plazmiti ile birlikte agaroz jel elektroforez sonucu jel görüntüsü alınmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Klonlama işlemi sonunda elde edilen rekombinant plazmit (a-b-e-f), Ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesi (c), pUC18 plazmit vektörü(d). M:100bp

Rekominant *E.coli*/Xyn suşuna aktarılmış olan pNeoXyl plazmitinde ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesinin tespiti için xynA primerleriyardımla başlık 3.2.7.1’de verilen PZR protokolü uygulanmıştır. Aynı işlem negatif kontrol amaçlı pUC18 plazmiti için’de uygulanmıştır.PZR işlemi sonrası pNeoXyl plazmitinden yaklaşık olarak 1 kb’lık PZR ürünü elde edilmiştir. pUC18 plazmitinden herhangi bir ürün eldesi olmamıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. XynA primerleri ile gerçekleştirilen PZR agaroz jel görüntüsü. pUC18 plazmiti (a), *E.coli*/Xyn’den izole edilen pNeoXyl plazmiti (b). M:1kb

4.4.3. Klonlanan ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesineait nükleotit ve aminoasit dizisi

pNeoXylrekombinant plazmit izolasyonu sonucu ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesinin sekans dizilimi elde edilmiştir. BioEdit yazılım programı yardımı ile aminoasit dizilimi ve özellikleri tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.13’de verilmiştir.

```

ttgcaactggt gct aag gcc caa tgg ggt gga ggt gct tct gct ggt caa aga tta tcc gtc
ggt ggt ggt caa aac caa cat aag ggt gtc tcc gat ggt ttc agt tat gaa atc tgg tta
gat aac acc ggt ggt agc ggt tct atg act ctc aaa agt ggt gca acc ttc aag gct gaa
M T L K S G A T F K A E
tgg aat gca gct gtt aat cgt ggt aac ttc ctt gcc cgt cgt ggt ctt gac ttc ggt tct
W N A A V N R G N F L A R R G L D F G S
caa aag aag gca acc gat tac gat tac atc gga ttg gat tat gct gca act tac aga caa
Q K K A T D YD Y I G L D Y A A T Y R Q
act gcc agt gca agt ggt aac tcc cgt ctc tgt gta tac gga tgg ttc caa aac cgt gga
T A S A S G N S R L C V Y G W F Q N R G
gtt aac gcc gtt cct tta gta gaa tac tac atc att gaa gat tgg gtt gac tgg gtt cca
V N G V P L V E Y Y I I E D W V D W V P
gat gca caa gga aaa atg gta acc atc gat gga gct caa tat aag att ttc caa atg gat
D A Q G K M V T I D G A Q Y K I F Q M D
cac act ggt cca act atc aat ggt ggt agt gaa acc ttt aag caa tac ttc agt gtc cgt
H T G P T I N G G S E T F K Q Y F S V R
caa caa aag aga act tct ggt cat att act gtc tca gat cac ttt aag gaa tgg gcc aaa
Q Q K R T S G H I T V S D H F K E W A K
caa ggt tgg ggt att ggt aac ctt tat gaa gtt gct ttg aac gcc gaa ggt tgg caa agt
Q G W G I G N L Y E V A L N A E G W Q S
agt ggt ata gct gat gtc acc aag tta gat gtt tac aca acc cca aaa ggt tct aa
S G I A D V T K L D V Y T T P K G S

```

Şekil 4.13. *Neocallimastix* sp. izolatından klonlanan ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesi sekans ve aminoasit dizilimi

Ksilanaz enzimi kodlayan gen bölgesine ait yaklaşık 900 baz çiftlik kısmın nükleotit dizisi tespit edilmiştir. Bu kısım içerisinde 190 aminoasitlik kodlama bölgesi mevcuttur. Bu bölgenin teorik olarak izoelektrik nokta (pI) değeri 7.78 moleküler ağırlığı ise 21.2kDa olarak belirlenmiştir. Bu bölgede aynı zamanda bir açık okuma çerçevesi (ORF)'nin bulunduğu da görülmüş ve bu bölgede %45 oranında G-C içeriği tespit edilmiştir. İlgili gen bölgesinden sentezlenen enzimin 'Glikozit hidrolaz 11' ailesine üye olduğu ExPasy veri tabanı sayesinde tespit edilmiş ve Sanger veri tabanı yardımıyla bir adet korunmuş domain (31 nükleotit-227 nükleotit arası) bölgesine sahip olduğu gözlemlenmiş ve domain ile ilgili özellik çizelge 4.2'de verilmiştir.

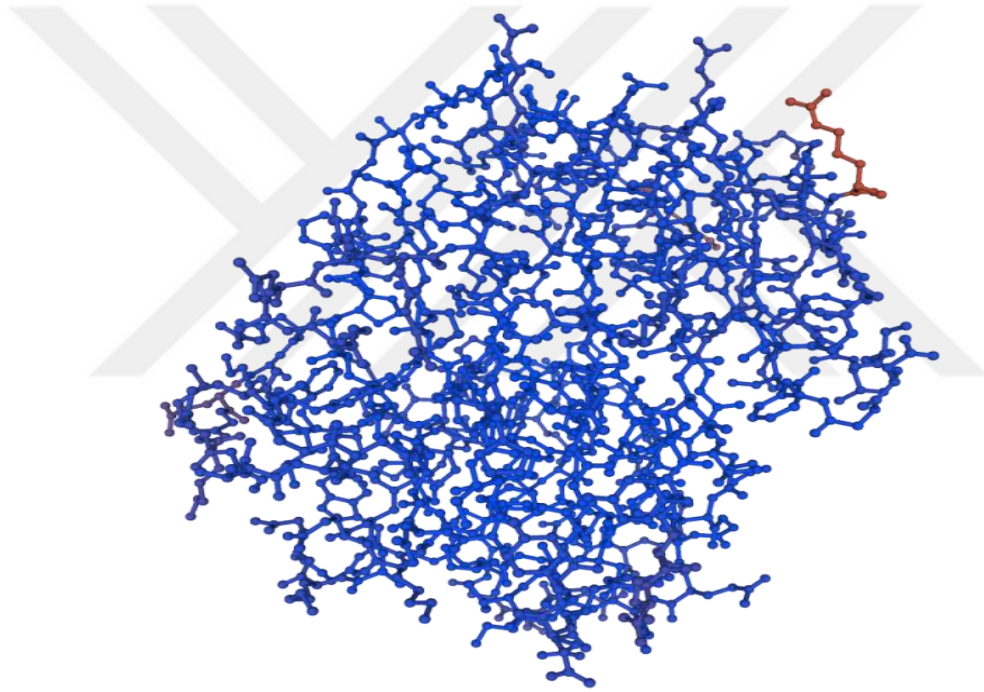
Çizelge 4.2. *Neocallimastix* sp. izolatından klonlanan ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesine ait domain bilgileri(<http://pfam.xfam.org/search/sequence>)

Familya	Tanımlama	Tipi	Başlangıç ve bitiş nükleotiti
Glyco_hydro_1	Glikoz hidrolaz 11	Domain	31-227

Sekans dizilimi sonrası elde edilen bu sonuçlar Inagaki ve ark. (1998)'nın bu gen bölgesi için tespit ettiği izoelektrik nokta (pI) değerine, Black ve ark. (1994) ile Akyol ve ark. (2009)'nın G-C oranı ve ORF bölgesi ile ilgili verilerine benzerlik göstermiştir. Aynı

zamanda gen bölgesinden sentezlenen enzimin ‘Glikozit hidrolaz 11’ ailesine üye olduğu Cheng ve ark. (2014) ile Akyol ve ark. (2009)’nın sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Elde edilen sekans sonucuna göre kutucuk içerisinde gösterilen nükleotit dizisinin kodlanmayan bölge olduğu ve ksilanaz gen bölgeleri için tasarlanan oligonükleotit primerlerin genellikle ORF bölgelerinin çoğaltılması için tasarlandığı bilinmektedir (Huang ve ark.,2005).

Ksilanaz enzimi sentezleyen gen bölgesine ait aminoasit dizilisi Expasy veri tabanında incelenmesi sonucu en fazla %11 oranında glisin en az ise %0.5 oranında sistein aminoasidi tespit edilmiş ve aynı dizinin Swis Model Homolojisi gerçekleştirilerek olası polipeptit yapının üç boyutlu yapısı Şekil 4.14’de verilmiştir.



Şekil 4.14. *Neocallimastix* sp. izolatından klonlanan gen bölgesinden sentezlenen ksilanaz enziminin üç boyutlu gösterimi

(<https://swissmodel.expasy.org/interactive/6fqywC/templates/>)

Aynı zamanda ilgili gen bölgesi için tasarlanan oligonükleotit primerlerin referans alındığı (Bkz.3.3.2.1) gen bölgelerine ait olan aminoasit homolojisi de gerçekleştirilmiştir. Buna göre X82266.1-*Neocallimastix frontalis* (CAA57717.1) ait olan polipeptit yapı ile %95, AY601669.1-*Neocallimastix frontalis* (AAT99015.1) ile %97 ve X65526.1-*N.patriciarum*’a (P29127.1) ile %97 oranında homolojiye sahip olduğu gözlemlenmiş ve homoloji Şekil 4.15’de verilmiştir.

```

GMLF1          -----MTLKSGATFKAEWNAAVNRGNFLARRGLDFGSQKKATDYDYIGLDYAATYRQTA 54
CAA57717.1     TGGNGSMTLGSGATFKAEWNAAVNRGNFLARRGLDFGSQKKANRFDYIGLDYAATYKQTA 360
AAT99015.1     TGGNGSMTLGSGATFKAEWNAAVNRGNFLARRGLDFGSQKKATDYDYIGLDYAATYKQTA 360
P29127.1       TGGNGSMTLGSGATFKAEWNAAVNRGNFLARRGLDFGSQKKATDYDYIGLDYAATYKQTA 360
                *** *****. :*****:***

GMLF1          SASGNSRLCVYGFQNRGVNGVPLVEYYIIEDWVDWVPDAQGKMVTIDGAQYKIFQMDHT 114
CAA57717.1     SASGNSRLCVYGFQNRGLNGVPLVEYYIIEDWVDWVPDAQGKMVTIDGAQYKIFQMDHT 420
AAT99015.1     SASGNSRLCVYGFQNRGLNGVPLVEYYIIEDWVDWVPDAQGKMVTIDGAQYKIFQMDHT 420
P29127.1       SASGNSRLCVYGFQNRGLNGVPLVEYYIIEDWVDWVPDAQGKMVTIDGAQYKIFQMDHT 420
                *****.*****

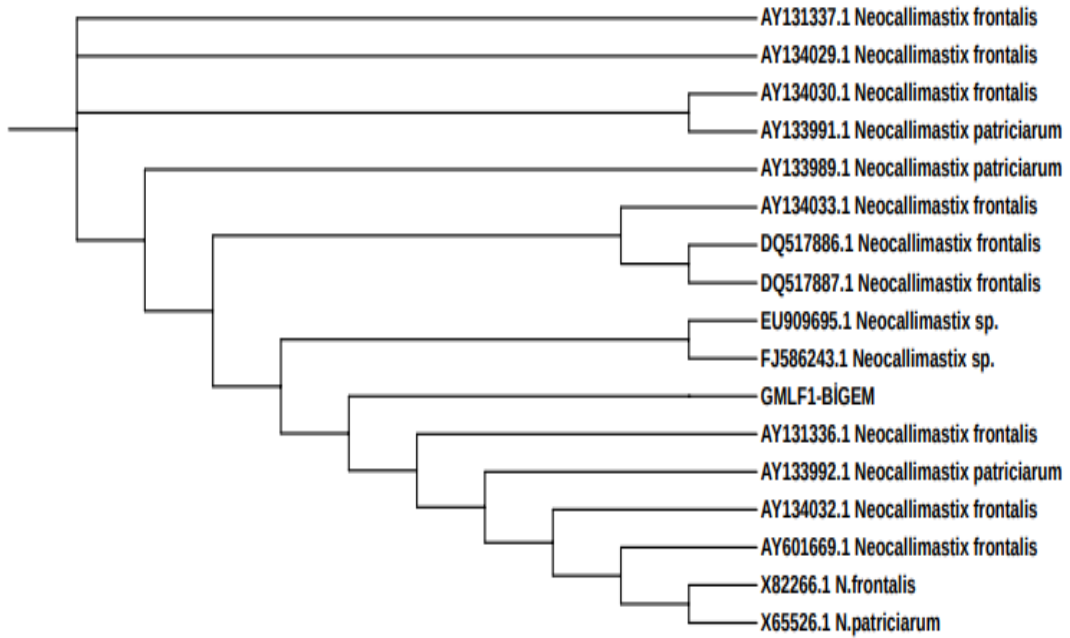
GMLF1          GPTINGGSETFKQYFSVRQQKRTSGHITVSDHFKEWAKQGWGIGNLYEVALNAEGWQSSG 174
CAA57717.1     GPTINGGSETFKQYFSVRQQKRTSGHITVSDHFKEWAKQGWGIGNLYEVALNAEGWQSSG 480
AAT99015.1     GPTINGGSETFKQYFSVRQQKRTSGHITVSDHFKEWAKQGWGIGNLYEVALNAEGWQSSG 480
P29127.1       GPTINGGSETFKQYFSVRQQKRTSGHITVSDHFKEWAKQGWGIGNLYEVALNAEGWQSSG 480
                *****

GMLF1          IADVTKLDVYTTPKGS----- 190
CAA57717.1     VADVTLDDVYTTPKGSSPATSAAPRTTTRTTRTKSLPTNYNKCSARITAQGYKCCSDPN 540
AAT99015.1     VADVTLDDVYTTPKGSSPATSAAPRTTTRTTRTKSLPTNYNKCSARITAQGYKCCSDPN 540
P29127.1       VADVTLDDVYTTPKGSSPATSAAPRTTTRTTRTKSLPTNYNKCSARITAQGYKCCSDPN 540
                :**** *****

```

Şekil 4.15. Ksilanaz enzimi kodlayan gen bölgesi ile referans fungal ksilanaz gen bölgelerine ait aminoasit homolojisi

Ayrıca sekans dizilimi elde edilmiş ilgili gen bölgesinin NCBI veri tabanına kayıtlı diğer *Neocallimastix* spp. izolatlarından izole edilmiş ksilanaz enzimi sentezleyen gen bölgeleri ile beraber filogenetik analiz (Şekil 4.16) de yapılmıştır. Analiz sonucuna göre elde edilen filogenetik ağaç dört kola ayrılmış ve çalışmamızda kullanılan gen bölgesi genel olarak *xynA* genlerinin bir arada bulunduğu izolatlara ait olan kolda tespit edilmiştir.



Şekil 4.16. NCBI veri tabanına kayıtlı olan ksilanaz enzimi sentezleyen gen bölgelerinin GMLF1 izolatına ait (GMLF1-BİGEM) ksilanaz enzimi sentezleyen gen bölgesi ile birlikte filogenetik analizi. Elde edilen filogenetik ağaç MEGA programı yardımıyla Bootstrap parametresi kullanılarak Neighbour Joining yöntemi ve iTOL (<https://itol.embl.de/>) veri tabanı kullanılarak elde edilmiştir.

4.4.4. *E.coli*/Xyn rekombinant suşuna ait ksilanaz enzim üretimi ve karakterizasyonu

Çalışmamızda *E.coli* DH5 α 'ya transforme olan rekombinant pNeoXyl plazmit vektörde bulunan *Neocallimastix* sp. izolatına aitksilanaz enzimi sentezleyen gen gölgesinin ekspresyon düzeyi belirlenmiştir. Optimum inkübasyon şartları altında gelişimi gözlemlenen rekombinant yapılı suşun sahip olduğu enzim aktivitesinin en yüksek değeri spesifik hücrel aktivitenin 4986.24 μ mol/dk/mg protein olarak ilk inokülasyondan yaklaşık 9 saat sonra tespit edilmiştir. Ksilanaz enzimi *Neocallimastix* sp. izolatında hücre dışı aktivitesi hücre içi aktivitesine göre daha fazla olduğu tespit edilmiş ve Çizelge 4.1'de verilmişti. Aynı izolattan izole edilen ilgili enzimin *E.coli*/Xyn rekombinant suşunda ise hücre içi aktivitesinin hücre dışı aktivisine oranla daha yüksek çıkmasının sebebinin ise ilgili suşun sahip olduğu periplasmik boşlukta enzimatik aktivitenin daha fazla olabileceği düşünülmüştür. Huang ve ark. (2006) ksilanaz enzimini kodlayan gen bölgesini *E.coli* suşuna klonlama yaparak enzimin %22.4 hücre dışı,%28.0 hücre içi ve %49.6 oranında periplasmik boşlukta dağıldığını tespit etmişlerdir. Bu durumun temelinde enzimin hücre içi ve hücre dışına salgılanması sırasında *E.coli*'de bulunan sinyal peptit ile bağlantılı olabileceği düşünülmüştür (Beguin,1990).

Suşun enzim üretimi 24 saat boyunca devam etmiş ancak üretim hızının giderek düştüğü tespit edilmiştir.24 saatlik sürenin sonunda hücrel spesifik aktivitenin 3217.2 μ mol/dk/mg protein'e düştüğü görülmüştür (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *E.coli*/Xyn rekombinant suşunun süpernatant ve hücrel ksilanaz enzimine ait spesifik (μ mol/dk/mg protein) ve toplam enzim (μ mol/dk/ml) aktiviteleri

Zaman (Saat)	SÜPERNATANT		HÜCRESEL	
	Toplam Aktivite (μ mol/dk/ml)	Spesifik Aktivite (μ mol/dk/mg protein)	Toplam Aktivite (μ mol/dk/ml)	Spesifik Aktivite (μ mol/dk/mg protein)
3	10,6	79,6	75,4	1277,36
6	34,01	197,5	187,6	2167,24
9	36,72	379,68	195,07	3874,79
12	48,14	517,9	249,67	4986,24
24	39,4	418,7	117,5	3217,2

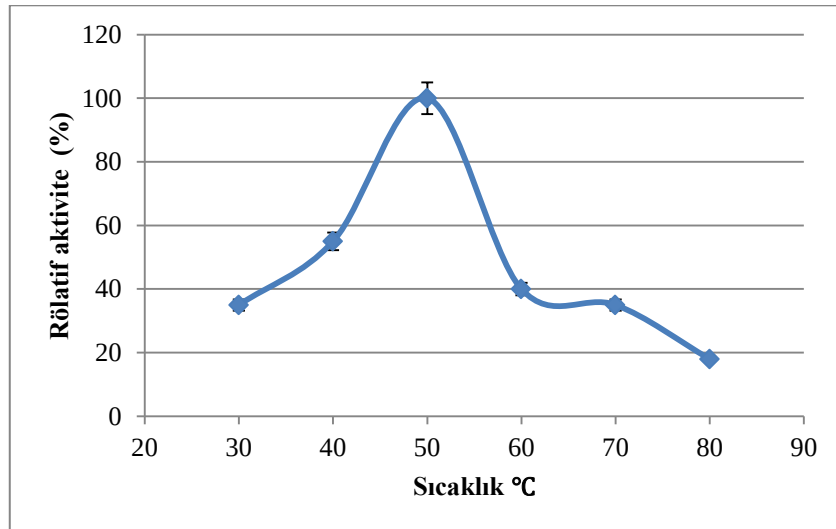
E.coli/Xyn rekombinant suşundan sentezlenen ksilanaz enzim aktivitesi *Neocallimastix* sp. (GMLF 1) izolatına göre daha yüksek oranda etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu kadar yüksek enzim aktivitesinin gözlemlenmesinin sebepleri arasında *E.coli* suşuna aktarılan rekombinant plazmittin yapısındaki sinyal peptit etkisi ve ksilanın hidrolizde etkili olan diğer genlerin çalışılan gen üzerindeki etkisinin ortadan kalkması gibi faktörler olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca yüksek düzeyde gen ekspresyonu elde etmek için prokaryotik promotorların genişleyen bir etkisinin de olduğu bilinmektedir (Makrides,

1996). Özellikle AGF'lar ökaryot hücre yapısına sahip olmasına rağmen ilgili enzim genlerini rumende horizontal gen aktarımı şeklinde prokaryot mikroorganizmalardan geçtiği tahmin edilmektedir (Gilbert ve ark., 1992). Bundan dolayı çalışmamızda kullanılan ilgili genin prokaryotik promotor kontrolünde etkinlik gösterdiği ve yüksek miktarda enzimatik aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir.

4.4.5. *E.coli/Xyn* rekombinant suşuna ait ksilanaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi

Neocallimastix sp.'ye ait ksilanaz enzimin optimum sıcaklık değerinin 50°C olduğu tespit edilmiştir. *Neocallimastix* sp. izolatına ait ilgili gen bölgesi ürünü olan ksilanaz enziminin de optimum sıcaklık düzeyi belirlenmiştir. Enzim 30°C yaklaşık olarak %35 oranında etkinlik gösterdiği sıcaklığın 50°C'ye gelmesi ile enzim etkinliğinin en üst düzeye çıktığı görülmüştür. Sıcaklık artışın devam etmesi ile %60 oranında aktivite kaybına uğrayan enzim 90°C'ye doğru etkinliğini kayıp etmiştir (Şekil 4.17).

Akyol ve ark. (2009) *Neocallimastix* sp. GMLF2 izolatına ait *Xyn2A* gen bölgesinden sentezlenen ksilanaz enziminin optimum çalışma sıcaklığının 50°C olduğunun rapor etmişlerdir. Pai ve ark. (2010) *Neocallimastix patriciarum*'a ait *XynS20E* gen bölgesinden sentezlenen ksilanaz enzimin ise 49°C'de otimum bir aktiviteye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir.

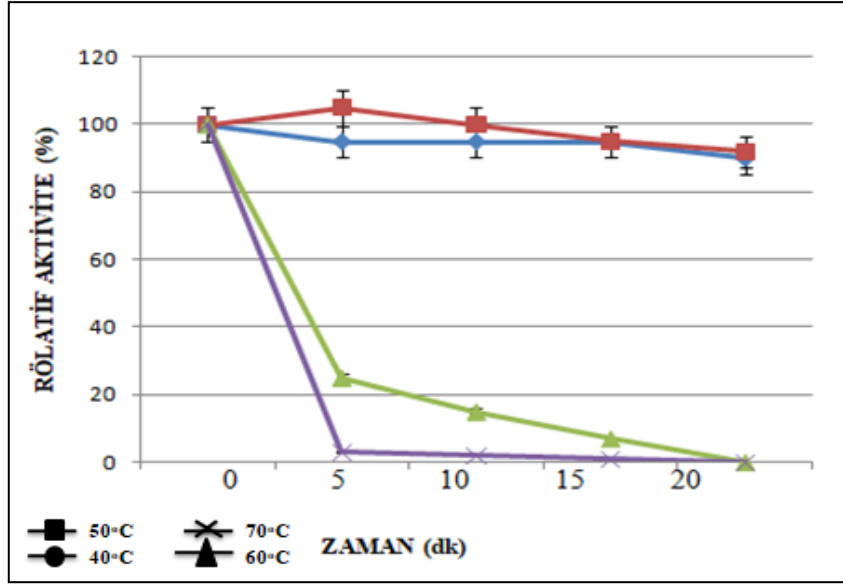


Şekil 4.17. *E.coli/Xyn* rekombinant suşuna ait ksilanaz enziminin farklı sıcaklıklarda gösterdiği rölatif aktive yüzdesi

Neocallimastix sp. izolatu tarafından sentezlenen ksilanaz enziminin optimum çalıştığı sıcaklık değerinin tespitinde (Bkz. başlık 4.2.1) ortam sıcaklığının 30°C olduğu durumda yaklaşık olarak %45 oranında rölatif aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Aynı izolattan izole edilen *E.coli/Xyn* rekombinant suşundan sentezlenen ksilanaz enziminin aynı sıcaklıkta yaklaşık olarak %35 oranında aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ortalama olarak %10 oranında rölatif aktivite farkının görülmesi izolat tarafından sentezlenen ksilanaz enzimlerinin konfarmasyon yapısına bağlı olarak farklı sıcaklıklarda optimum aktiviteye sahip olduğundan kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Liu ve ark. (1999) *Neocallimastix* sp.'ye ait ve *xynC* bölgesinden sentezlenen ksilanaz enzimin 40°C'de optimum aktivite gösterirken ortam sıcaklığının 50°C olması ile aktivitede %15 oranında azalmanın olduğunu rapor etmişlerdir. Zhu ve ark. (2010) *Neocallimastix* sp.'ye ait *Xyn1B* gen bölgesinden sentezlenen ksilanaz enzimin ise en yüksek hidrolitik aktivitesinin 60°C olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı şekilde *E.coli/Xyn* rekombinant suşuna ait ksilaz enziminin şekil 4.16'da görüldüğü gibi 60-70°C arasında yaklaşık olarak %35 oranında rölatif aktivitesinin koruması ilgili enzimin protein konfarmasyonu ile ilgili olabileceğini düşündürmüştür.

4.4.6. *E.coli/Xyn* rekombinant suşuna ait ksilanaz enziminin termal stabilitesinin belirlenmesi

Neocalimastix sp. izolatından direkt salgılanan ksilanaz enziminin termal dayanıklılığının oldukça düşük olduğunu veya termal kararlılığının olmadığı tespit edilmişti. Rumen fungusu tarafında direkt sentezlenen enzim etkinliği kısa süre içersinde %35 oranında azaldığı da gösterilmişti. *E.coli/Xyn* rekombinant suşundan üretilen ksilanaz enziminin termal kararlılığında ise ilk olarak 50°C %110 oranında aktivite artışı olmasına rağmen bu etkinliği koruyamamış inkübasyon süresi sonunda %15 oranında enzim aktivitesinde azalma görülmüştür. Ancak aynı zaman dilimi içerisinde çalışmamızda kullanılan *Neocallimastix* sp. izolatından salgılanan enzime göre ortalama olarak %25 daha fazla aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (şekil 4.18).



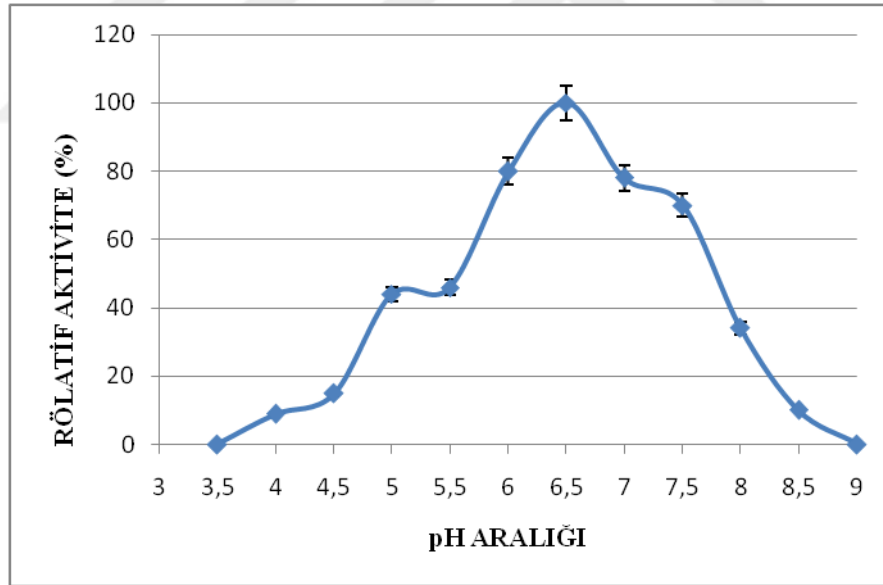
Şekil 4.18. *E.coli*/Xyn rekombinant suşundan salgılanan ksilanaz enziminin termal stabilitesi

Bu durumun ilgili gen bölgesinin klonlaması sonucu sahip olduğu domain bölgesindeki etki mekanizmaları olduğu düşünülmektedir. Çünkü Miao ve ark. (2021), *N. patriciarum* ait olan XynCDBFV'nin aktivitesi ve termostabilite çalışmalarının bu bölge tarafından kodlanan endüstriyel ksilanaz enzimi için oldukça önemli bir gen bölgesi olduğunu vurgulamışlardır.

Çalışmalarında hipertermofilik CBM9_1-2'den C2 modülünü CDBF bölgesinin N-ve/veya C- terminal bölgelerine yerleştirerek C2-CDBFV rekombinant bölgeyi *E.coli*'ye aktarmışlardır. Termostabilite çalışmalarında rekombinant yapının sıcaklığa karşı tolerasyon seviyesinin yükseldiği ve ekspirasyon sonucu oluşan proteinin yarılanma ömrünün yaklaşık olarak 3,8 kat arttığını rapor etmişlerdir. Endüstriyel değeri oldukça yüksek olan ksilanaz enziminin termal stabilitesinin artırılması ile ilgili olarak Wan Wyk ve ark.(2010)'da *Neocallimastix patriciarum*'a ait olan ksilanaz gen bölgesine ait olan aktif merkezde oluşturdukları bir mutasyon sonucu rekombinant genin (Xyn-CDBFV) termobilitesinin artırıldığını rapor etmişlerdir. Aynı şekilde ilgiligen bölgesinin termal stabilitesinin artırılması için ileryen çalışmalarda aktif merkezin yapısında bulunan nükleotit dizilerinin mutasyona uğratılabileceği ve enzimin endüstriyel olarak kullanılmasına katkı sağlanabileceği düşünülmüştür. Başka bir ifade ile ilgi gen bölgesinin yapısında bulunan nükleotit dizileri ile aynı enzimin sıcaklık toleransı yüksek olan farklı fraksiyonlarındaki dizileri ile homoloji yapılarak farklılık gösteren nükleotitlerin yerine CRISPR sistemi yardımıyla yeni nükleotitlerin eklenmesi gerçekleştirilebilir.

4.4.7. *E.coli/Xyn* rekombinant suşuna ait ksilanaz enziminin optimum pH'ın belirlenmesi

Neocallimastix sp.'ye ait ksilanaz enzimin optimum pH 6.5 olduğu tespit edilmiştir. *E.coli/Xyn* rekombinantsuşundan sentezlenen ksilanaz enziminin pH 3.5 ve 9.0 durumunda enzim aktivitesinin olmadığı görülmüştür. Rumen pH'ın değişken bir yapıda olduğucak belli bir pH aralık değerinin altına veya üst seviyesine çıkmadığı bilinmektedir. Fungal enzimin optimum düzeyde çalıştığı pH aralığının 5.5 ile 7.5 arasında olduğu gözlemlenmiştir. pH 5.5 durumunda %45 oranında enzimatik aktiviteye sahip olduğu pH 6.5'de aktivitenin en üst düzeye çıktığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda pH 7.0'dan sonra aktivitenin sırası ile %20-40-80 oranında azaldığı da görülmektedir. Rekombinant ksilanaz enzimlerinin optimum çalıştığı pH aralığının 6.0-7.0 arasında olduğu (Kumar ve Kalirajan, 2015; Wang ve ark., 2017; Li ve ark., 2022) ve çalışmamızda *E.coli/Xyn* rekombinant suşundan sentezlenen ksilanaz enziminin çalıştığı optimum pH aralığı ile benzerlik gösterdiği de tespit edilmiştir. İlgili gen bölgesinden salgılanan ksilanaz enziminin farklı pH aralığında gösterdiği rölative aktive Şekil 4.19'da verilmiştir.



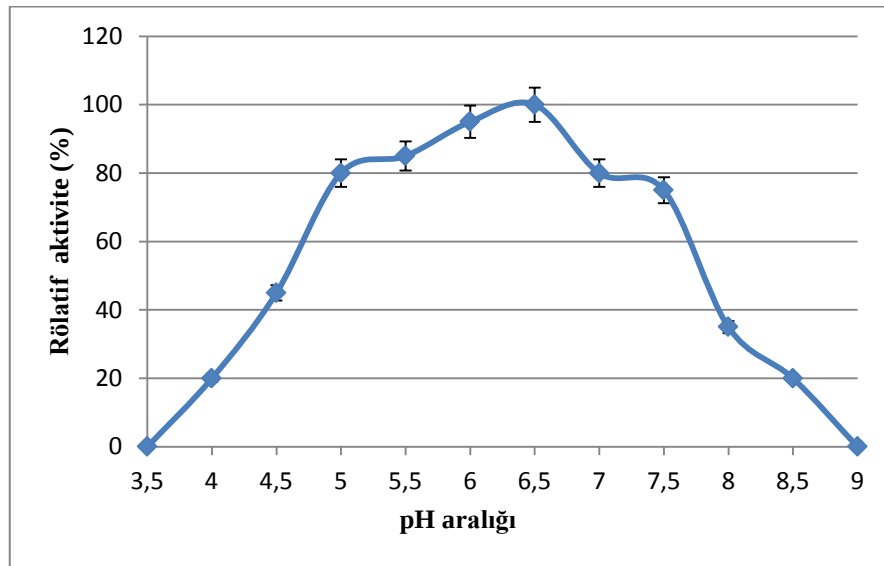
Şekil 4.19. *E.coli/Xyn* rekombinant suşundan salgılanan ksilanaz enziminin farklı pH aralığında gösterdiği rölative aktive

Ek olarak *Neocallimastix* sp. izolatına ait ksilanaz enzimlerinin ortam pH'ı 3.5 olduğu durumda %5 oranında, pH 9.0 olduğunda ise %30 oranında rölative aktive gösterdiği Şekil 4.4'de verilmiştir. Aynı pH noktalarında rekombinat gene ait ksilanaz enzimin rölative aktiviteye sahip olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.19). Bu durumun ilgili

gen bölgesi tarafından sentezlenen enzimin yapısında bulunan aminoasitlerin tepkimeye başladığı optimum pH noktaları ile ilgili olduğu düşünülmüştür.

4.4.8. *E.coli*/Xyn rekombinant suşuna ait ksilanaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi

E.coli/Xyn rekombinant suşuna ait ksilanaz enziminin pH stabilitesinin ayarlanması bu enzimin biyoteknolojik potansiyelinin ortaya çıkarılması için oldukça önemlidir. Çünkü ticari olarak kullanılacak bir enzimin termal stabilitesine ek olarak pH stabilitesi enzimin karakterizasyonu hakkında bilgi vermektedir (Knob ve ark., 2013). Çalışmamızda kullanılan *E.coli*/Xyn rekombinant suşuna ait ksilanaz enziminin geniş bir pH stabilitesi olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.20). Aynı zamanda elde edilen bulgular değişken rumen pH ile paralel bir sonuç vermiştir. pH 5.0-7.5 arasında en az %80 oranında aktiviteye sahip olduğu pH değerinin alkali orana geçmesiyle enzimin stabilitesinde %40'lık azalma gözlemlenmiştir. pH 3.0 ve 9.0'da enzim etkinliğinin olmadığı gözlemlenmiştir. *Neocallimastix* sp. izolatından direkt olarak sentezlenen ksilanaz enzimin bu iki pH durumunda yaklaşık olarak %20 oranında enzimsel aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı enzimin klon ve fungal aktivite arasındaki bu farklılığın sebebi olarak GMLF 1 izolatında *xynA*, *xynB* gibi farklı ksilanaz enzimlerini sentezleyen bölgelerin görev alabileceği düşünülmüştür. Çünkü *Neocallimastix* sp. cinslere ait aynı enzim için birden fazla gen bölgelerinin olduğu bilinmektedir (Huang ve ark., 2005).



Şekil 4.20. *E.coli*/Xyn rekombinant suşundan salgılanan ksilanaz enziminin pH stabilitesi

4.4.9. *E.coli/Xyn* rekombinant suşuna ait ksilanaz enzimi üzerine etki eden iyonlar

MnCl₂, CoCl₂, CaCl₂, MgCl₂ ve ZnCl₂ iyonlarının *E.coli/Xyn* rekombinant suşuna ait ksilanaz enziminin çalışması üzerine olan etkisi incelenmiştir. Bunun için *E.coli/Xyn* rekombinant suşundan sentezlenen ksilanaz enzimi 15 dk 35°C ön inkübasyon işleminden sonra kontrol (iyon içermeyen) ve deney grupları hazırlanmıştır. Enzimin çalıştığı optimum sıcaklık ve pH'da enzim analizi gerçekleştirilmiştir. İyon içermeyen kontrol grubu sonucu referans değer olarak kabul edilmiş ve deney gruplarının enzim aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ksilanaz enzimi üzerinde farklı konsantrasyonlarda farklı etkilere sahip olan metal iyonlarından dolayı çalışmada iki farklı (1mM-10mM) konsantrasyonlara sahip MnCl₂, CoCl₂, CaCl₂, MgCl₂ ve ZnCl₂ iyonlarının etkileri incelenmiş ve sırasıyla 1mM'lık çözeltide sırasıyla enzim çalışması üzerinde %41, %12, %4, %7 oranında aktivatör etkiye ZnCl₂ ise %9 inhibitör özellik göstermiştir. İnhibitör etkiye sahip olan ZnCl₂ 'de dahil olmak üzere bütün iyonların konsantrasyon artışı sonucu enzimin çalışması üzerinde negatif etkiye sahip olduğu tespit edilmiş ve Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Pai ve ark. (2010), *Neocallimastix patrium* 'a ait olan bifonksiyonel esteraz/ksilanaz gen bölgesinin (XynS20E) klonlanmasını gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen rekombinant proteinin ekspresyonu gerçekleştirilerek metal iyonları yardımıyla immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Aynı zamanda Chen ve ark. (1994) ksilanaz enzimin çalışmasında Mg⁺², Mn⁺², Ca⁺² ve Ni⁺² iyonlarının aktivatör Ag⁺, Fe⁺², Cu⁺² ve Hg⁺ iyonlarının inhibitör bir etkiye sahip olduğunu ispat etmişlerdir. Hebraud ve Fevre (1990/b), *N.frontalis* 'e ait olan β-ksilosidaz (EC 3.2.1.37) enziminin saflaştırılmasını gerçekleştirmişler ve bu enziminin çalışması üzerinde aktivatör etkiye sahip olan iyonların Co⁺² ve Mg⁺² olduğunu, Hg⁺² iyonunu ise inhibitör etkiye sahip olduğunu da tespit etmişlerdir. Aynı iyonların farklı etkiye sahip olması farklı gen bölgeleri tarafından salınan aynı enzimlerin aktif bölgeleri ile ilgili olduğu ve çalışmada kullanılan ksilanaz enzimin endüstriyel olarak kullanılması durumunda etkinliğinin artırılması için Mn⁺² iyonunun kullanılması gerektiği düşünülmüştür.

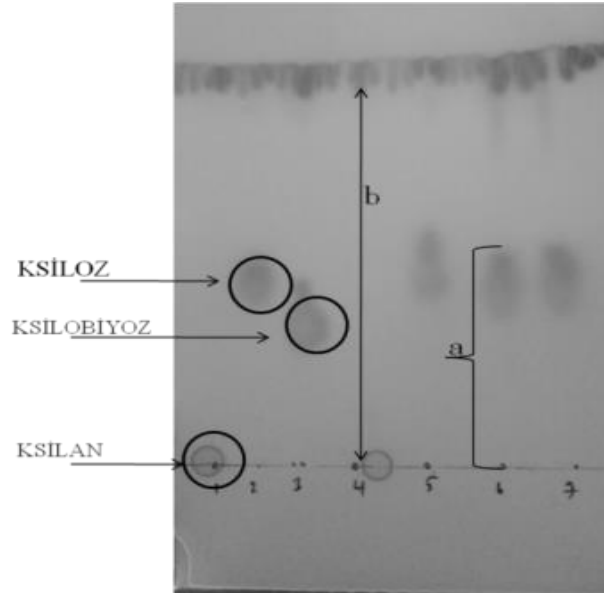
Çizelge 4.4. *E.coli/Xyn* rekombinant suşundan salgılanan ksilanaz enziminin çalışmasına etki eden iyonlar

Kimyasallar	Enzim Aktivitesi (%)	
	1mM (Son konsantrasyon)	10mM (Son konsantrasyon)
Kontrol	100±1,4	100±0,3
MnCl₂	141±1,01	65±1,9
CoCl₂	112±1,5	87±1,8
CaCl₂	104±0,7	79±1,7
MgCl₂	107±0,6	77±1,3
ZnCl₂	91±0,8	62±1,0

4.4.10. *E.coli/Xyn* rekombinant suşundan salgılanan ksilanaz enziminin aktivitesi sonucu oluşan ürünlerin ince tabaka kromatografi ile tespiti

E.coli/Xyn rekombinant suşundan salgılanan ksilanaz enziminin ksilan substratının hidrolizi sonucu medya getirdiği son ürün ksilozun tespiti ince tabaka kromatogram (TLC) ile tespit edilmiştir. Bu işlem yapılırken *Neocallimastix* sp.'den direkt sentezlenen ksilanaz enziminin aktivitesi sonucu oluşan son ürün ile kıyaslaması da gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin hazırlanması ve Silika jele yüklenmesi başlık 3.3.12'de verilen işlem basamaklarına göre yapılmıştır. Kromatogram görüntülemesine göre hem fungus tatafindan salgılanan ksilanaz hem de rekombinant suş tarafından ksilanaz enzimlerinin ksilan subtrattını hidrolize ettiği ve *R_f* (Retention Factor) değerlerinin (0.5) de aynı olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Ksilanaz enzim aktivitesinin ince tabaka kromatogram görüntüsü 1-4:Ksilan standart, 2:Ksiloz standart, 3:Ksilobiyoz standart, 5:*Neocallimastix* sp. enzim ekstratı, 6-7:*E.coli/Xyn* rekombinant suşuna ait ekstrat, a:Örneğin aldığı mesafe, b:Çözücü madde mesafesi

4.5. *Orpinomyces* sp. ait Selülaaz Enzimi Üretimi ve Karakterizasyonu

Anaerobik gut funguslara ait fibrolitik enzimler arasında oldukça önemli bir yere sahip olan selülaaz enzimin *Orpinomyces* sp. (GMLF19) izolatındaki aktivitesi incelenmiştir. Optimum *in vitro* koşulları sağlanarak 9 günlük inkübasyon süresi boyunca ilk günden itibaren düzenli periyotlarda fungal hücreleri ve süpernatant kısımları ayrılarak spesifik ve toplam enzim aktivitesi hesaplanmıştır. *Orpinomyces* sp.'nin 5.gündeki inkübasyon süresi sonunda süpernatant spesifik aktivitesinin (268.7 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) diğer günlere oranla yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

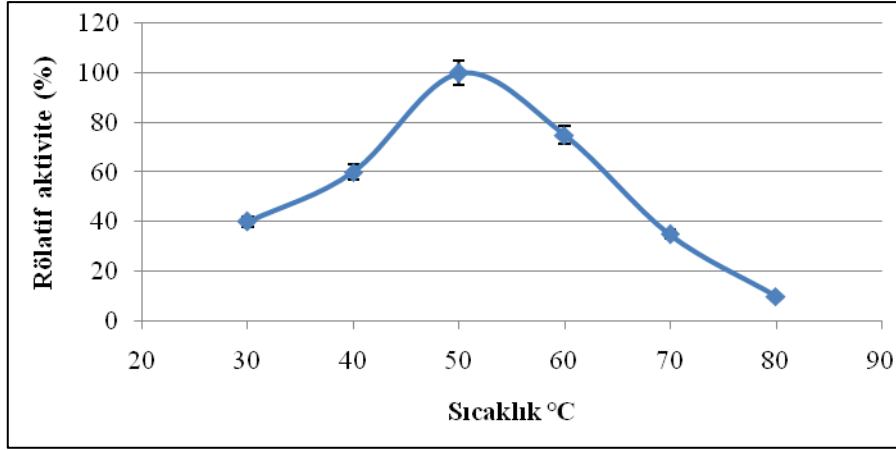
Çizelge 4.5. *Orpinomyces* sp. süpernatant ve hücresel selülaaz enzimine ait spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) ve toplam enzim ($\mu\text{mol/dk/ml}$) aktiviteleri

GÜN	Süpernatant		Hücrecel	
	Toplam Aktivite ($\mu\text{mol/dk/ml}$)	Spesifik Aktivite ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)	Toplam Aktivite ($\mu\text{mol/dk/ml}$)	Spesifik Aktivite ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)
1	1,09	15,7	0,7	12,1
2	6,7	37,8	3,1	19,54
3	29,1	79,6	15,17	37,14
4	36,45	197,4	22,08	86,4
5	47,14	268,7	67,74	144,5
6	42,18	215,4	65,47	127,84
7	30,78	119,57	42,09	109,5
8	21,6	81,9	37,14	97,07
9	16,5	68,38	30,1	81,08

AGF'ların basal besi ortamında 5-15 gün boyunca altkültüre alınmadan canlı kalabilmesi (Lowe ve ark., 1987) besi ortamındaki enerji kaynağı ile ilgili olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda 5 inci ünden itibaren selülaaz enzim aktivitesinin azalmasının sebebinin ortamda yeterli miktarda enerji kaynağının kalmadığının göstergesidir. Aynı zamanda inkübasyonun 7 inci gününden itibaren hücresel enzim aktivitesinin süpernatant aktiviteye göre fazla olmasının sebebi olarak kültür ortamında metabolit ürünlerin enzim aktivitesi üzerinde negatif bir etkiye sebep olduğu düşünülmektedir.

4.5.1. *Orpinomyces* sp.'ye ait selülaaz enzimin optimum sıcaklığının belirlenmesi

Orpinomyces sp.izolatı tarafından salgılanan selülaaz enziminin optimum sıcak düzeyi belirlenmiştir. Enzimin 50°C'de maksimum aktivite gösterdiği, sıcaklığın artmasına bağlı olarak bu aktivitenin 80°C'de %95 oranında azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.22).

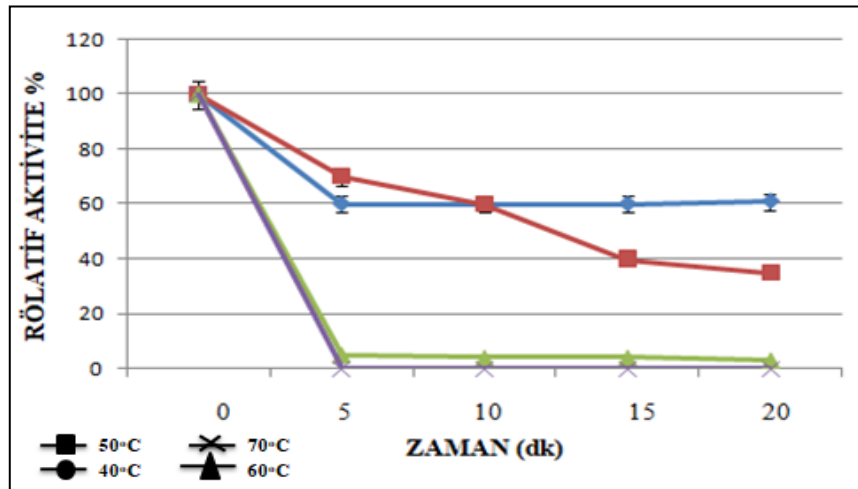


Şekil 4.22. *Orpinomyces* sp.'ye ait selülaaz enziminin farklı sıcaklıklarda gösterdiği rölatif aktive yüzdesi

Chen ve ark. (1994) *Orpinomyces* sp. PC-2 kültür ortamında sellobiyozun hidrolizde görevli olan β -glukosidaz enziminin optimum sıcaklık değerini 50°C olarak rapor etmesi ve rumen fungal selülotik enzimlerin optimum sıcaklık düzeyinin yaklaşık olarak 50°C olduğu bilinmektedir (Lowe ve ark., 1987; Çömlekçioğlu ve ark., 2008; Çömlekçioğlu ve ark., 2010).

4.5.2. *Orpinomyces* sp.'ye ait selülaaz enzimin termal stabilitesinin belirlenmesi

Orpinomyces sp. ait selülaaz enzimin termal stabilitesini belirlemek amacıyla enzim substrat ilave edilmeden farklı sıcaklıklarda (40, 50, 60 ve 70 °C) ve sürelerde (5, 10, 15 ve 20 dk) ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Ön inkübasyon tamamlandıktan sonra selülaaz enzimin kalan aktivitesini belirlemek için substrat ilave edilerek standart enzim deneyleri gerçekleştirilmiştir. *Orpinomyces* sp. ait selülaaz enzimin termal stabilitesi Şekil 4.23'de verilmiştir.

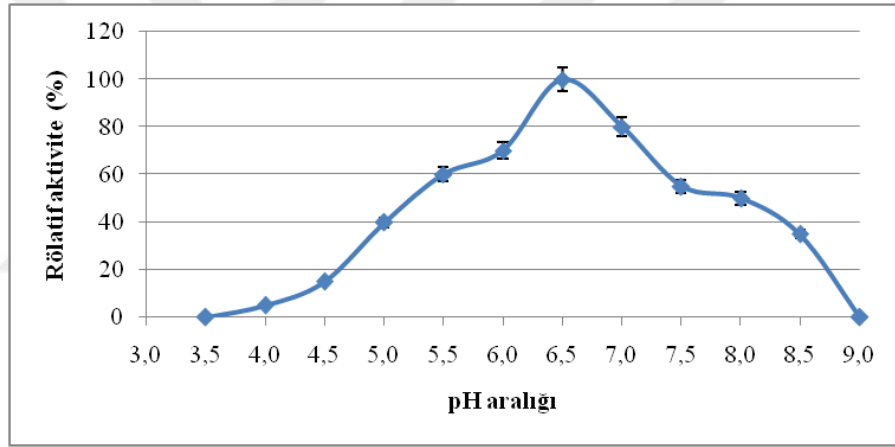


Şekil 4.23. *Orpinomyces* sp.'ye ait selülaaz enzimin termal stabilitesi

Orpinomyces sp. ait selülaaz enzimin 50°C’de termal kararlılığını kaybetmeye başladığı ancak optimum sıcak tespiti sırasında %60 aktiviteye sahip olduğu 40°C sıcaklıkta termal kararlılığını koruduğu gözlemlenmiştir. Bu durum Li ve ark. (1997)’ların *Orpinomyces* sp. PC-2 suşunda elde ettiği enzim termal kararlılığına benzerlik göstermiştir.

4.5.3. *Orpinomyces* sp.’ye ait selülaaz enzimin optimum pH’ın belirlenmesi

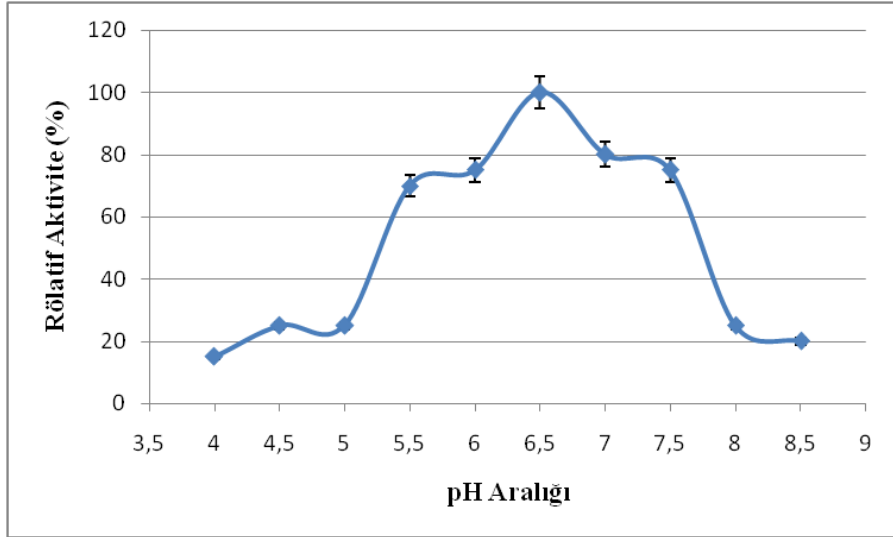
Orpinomyces sp. ait selülaaz enzimin optimum pH düzeyi 6.5 olarak bulunmuştur. pH 5.5’de %60 oranında etkinlik gösteren selülaaz enzimi pH 6.5’de en yüksek aktiviteye sahip olmuş ve ortamın alkali özelliği artmaya başlaması ile etkinliği kaybetmiştir (Şekil4.24).Rumen fungal selülaaz enziminin optimum pH aralığının 5.5 ile 7.5 arasında olduğu bilinmektedir (Borneman ve ark., 1989; Chen ve ark., 1994; Ljungdahlve ark., 2008).



Şekil 4.24. *Orpinomyces* sp.’ye ait selülaaz enzimin farklı pH aralığında gösterdiği rölatif aktive yüzdesi

4.5.4. *Orpinomyces* sp.’ye ait selülaaz enzimin pH stabilitesinin belirlenmesi

Orpinomyces sp. ait selülaaz enzimin pH stabilitesinin tespiti fungal ksilanaz için verilen pH stabiletesinin tespiti yöntemine göre belirlenmiştir (Bkz.4.2.4) Selülaaz enziminin etkinlik gösterdiği pH 4.0-8.5 aralığındaki stabilitesi tespit edilmiştir (Şekil 4.25). Aynı zamanda elde edilen pH stabilite aralıkları ile enzimin etkinlik gösterdiği pH aralıkları benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.25. *Orpinomyces* sp.’ye ait olan selülaz enziminin pH stabilitesi

Özellikle izolata ait optimum pH 8.5’de %35 oranında aktivite gösterirken (Şekil4.24) pH stabilesinin aynı pH değerinde %25 oranında aktive göstermesi ve optimum pH 9.0’da herhangi bir aktivite tespit edilmemesine rağmen pH stabiletisinde %20 aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durumun *Orpinomyces* sp. izolatlarının selülozu katabolize eden enzim grupları ile ilgili olduğu düşünülmüştür. Çünkü ilgili enzim sentezinde *celA*, *celC*, *celF* gibi (Bkz.başlık 1.9.1) farklı gen bölgeleri mevcuttur. Bu gen bölgelerinden sentezlenen protein yapının hem konformasyonu hem de yapısında bulundurduğu aminoasitlerin aktifleştiği pH değerlerinin farklılığından kaynaklanmaktadır.

4.5.5. *Orpinomyces* sp.’ye ait selülaz enzim aktivitesi sonucu oluşan ürünlerin ince tabaka kromatografi ile tespiti

Orpinomyces sp. ait selülaz enzim aktivitesi sonucu oluşan ürünlerin ince tabaka kromatogram görüntüsü ilgili genin etkinliği sonucu oluşan ince tabaka kromatogramı ile birlikte verilmiştir.

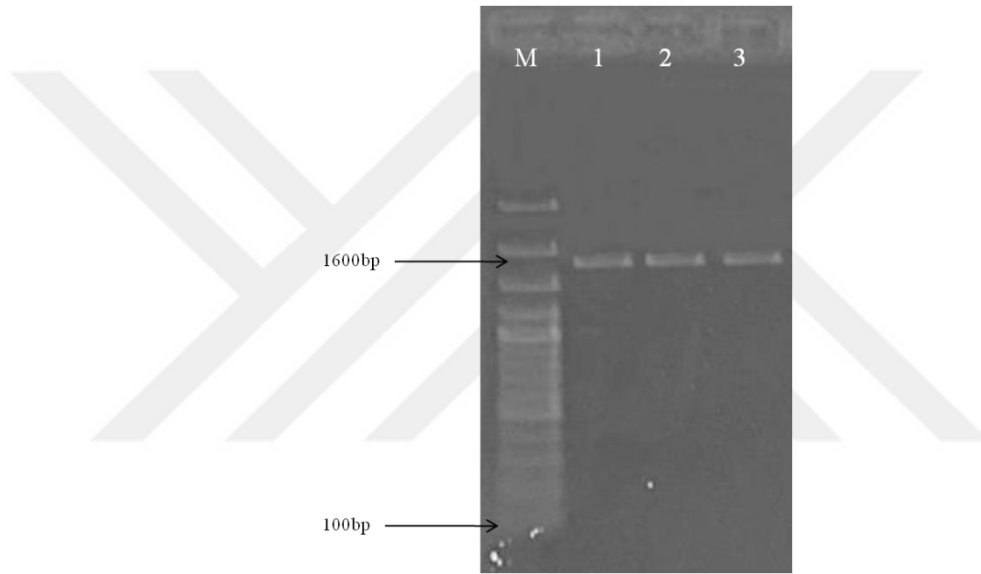
4.6. *Orpinomyces* sp.’ye ait Selülaz Enzimini Kodlayan Geninin Klonlanması ve Karakterizasyonu

AGF’lar selüloz, hemiselüloz ve diğer bitkisel materyallerin hidrolizini gerçekleştirebilecek çok geniş bir enzim spektrumuna sahiptir (Selinger ve ark., 1996). Özellikle selülozun hidrolizinde görevli olan *Orpinomyces* sp. izolatlarının selülaz enzimi sentezleyen en az 10 farklı gen bölgesinin olduğu da bilinmektedir (Ljungdahl, 2008).

Bundan dolayı çalışmamızda *Orpinomyces* sp. (GMLF 19)'ye ait selülaaz enzimin aktivitesi ve moleküler düzeyde incelenmesi gerçekleştirilmiştir.

4.6.1. *Orpinomyces* sp. izolatlarında selülaazenzimini kodlayan gen bölgesinin tespiti

Orpinomyces sp.'ye ait selülaaz genlerinin homolojisi sonunda elde edilen primerlerler yardımıyla ilgili gen bölgesinin PZR ile amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR işlemi sonucu elde edilen DNA parçası %1'lik agaroz jel (w/v) görüntüsü Şekil 4.26'da verilmiştir. Selülaaz enzimini kodlayan gen bölgesine ait olduğu tahmin edilen PZR ürünün yaklaşık olarak 1.6 kb uzunluğuna sahip olduğu gözlemlenmiştir.

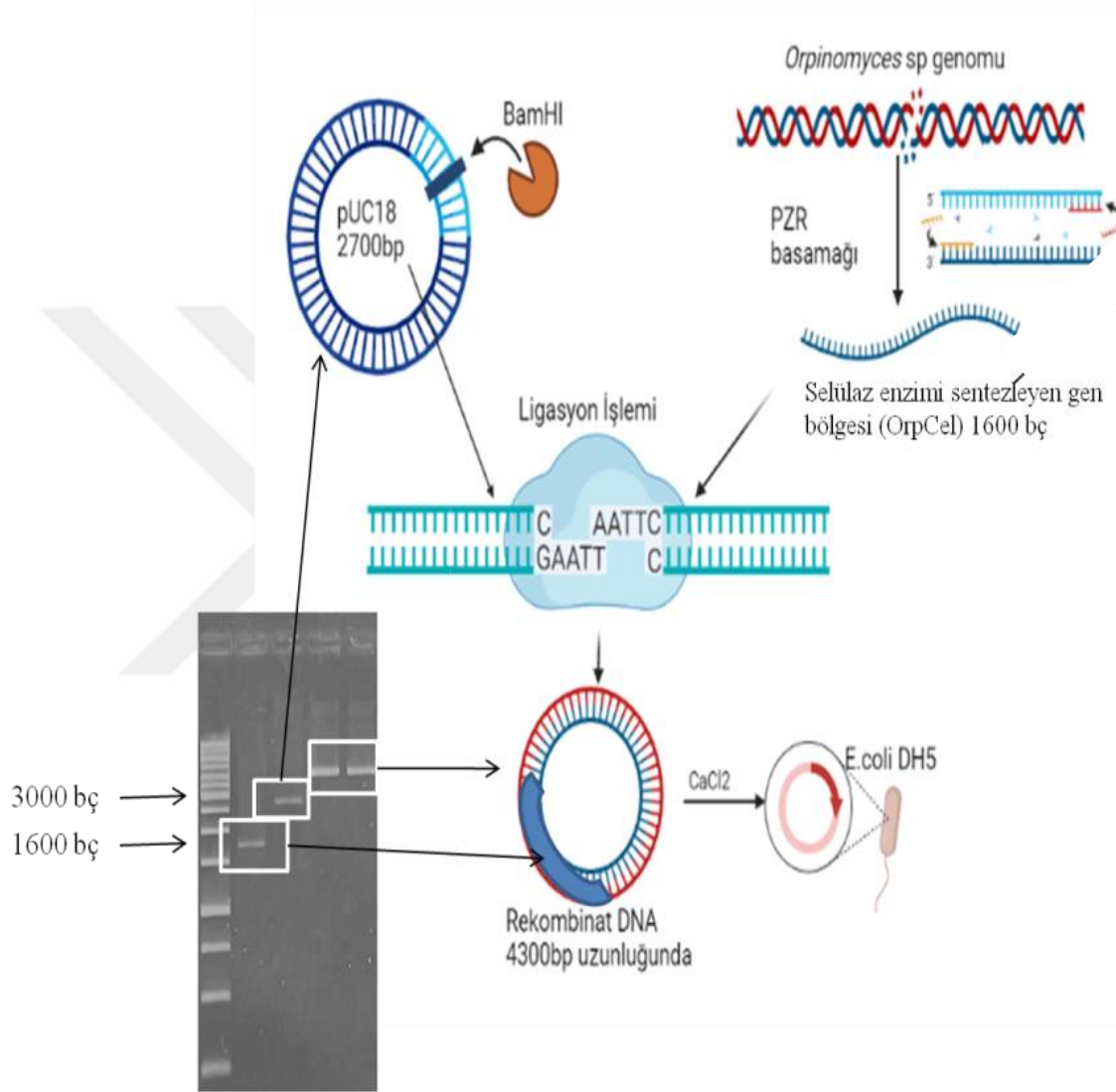


Şekil 4.26. *Orpinomyces* sp.'ye ait selülaaz enzimini kodlayan gen bölgesinin PZR amplifikasyonu M:100bp 1:GMLF19 2:GMLF16, 3:GMLF5

Şekil 4.26' da AGF (GMLF 19-16-5)'lara ait selülaaz enzimini kodlayan gen bölgesinin PZR sonucu elde edilen agarozjel görüntüsünde GMLF 6-17-21 *Orpinomyces* sp. izolatlarında ilgili gen bölgesine ait primerlerin çalışmaması sonucu yer verilmemiştir. Ayrıca başlık 3.3.3'de belirtildiği gibi *in vitro* ortamda gelişimi en net gözlemlenen, fungal DNA NanoDrop (260/280) sonucu, DNA miktarı ve optimum koşulların oluşturulması sonrası DNS metodu ile yapılan selülaaz enzim üretimin fazla olduğu gözlemlenen GMLF 19 izolatı tercih edilmiştir.

4.6.2. *Orpinomyces* sp.'ye ait olan selüloz enzimini kodlayan gen bölgesinin *E.coli*'ye klonlanması

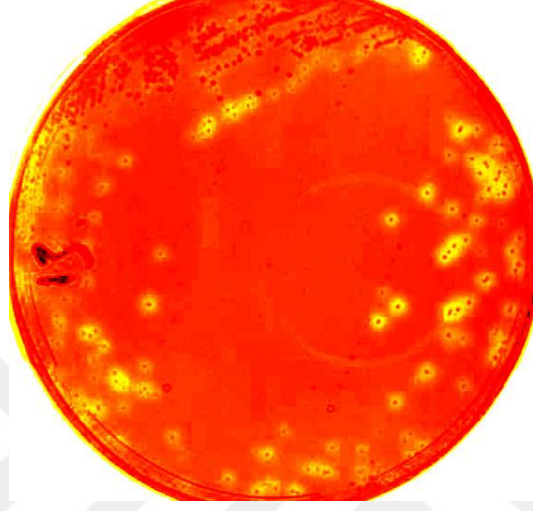
Orpinomyces sp. izolatına ait selüloz enzimini kodlayan gen bölgesinin pUC18 plazmit vektöre ligasyon işlemi 3.2.10'daki işlem basamaklarına göre gerçekleştirilerek pOrpCel rekombinant plazmit DNA eldesi sağlanmıştır (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. PZR sonucu elde edilen selüloz enzimini kodlayan gen bölgesinin plazmit vektöre ligasyonu

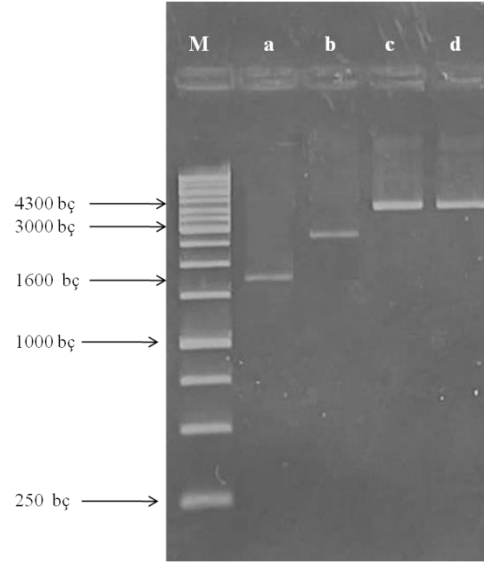
Ligasyon işlemi tamamlandıktan sonra rekombinant plazmit DNA CaCl₂ metodu ile *E.coli* DH5α suşuna aktarılmış ve *E.coli*/Cel rekombinant suşu elde edilmiştir. Selüloz enzimini kodlayan gen bölgesinin klonlandığı tespit etmek ve rekombinant yapının transforme olduğu göstermek için Kongo Red Boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile yapılacak olan seleksiyon için 25 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.5) ile %0,4

selüloz (w/v) ve %0,4 agaroz (w/v) içeren ortamda optimum inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra rekombinant bakteri suşu dikkatli bir şekilde petri plakalarının üzerine dökülerek 37°C’de 4 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi dolduktan sonra petri üzerine %0,5 (w/v)’lik Kongo Kırmızısı dökülerek selülaz aktivitesine sahip kolonilerin etrafında berrak zonlar gözlemlenmiştir (Şekil4.28).



Şekil 4.28. *E.coli/Cel* rekombinant suşun selülaz aktivitesinin kongo kırmızısı ile gösterilmesi

pOrpCelplazmit DNA’nın konak hücreye aktarıldığını tespit etmek için plazmit izolasyon kiti kullanılarak (sigma-plasmid miniprep Kit) pOrpCel rekombinant plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyonu sonrası elde edilen plazmit DNA’da selülaz enzimini kodlayan gen bölgesinin tespiti için celA F-celA R primerleri kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. pOrpCel'e ait PZR amplifikasyondan elde edilen selülaaz enzimini kodlayan gen bölgesi (a), pUC18 plazmit vektörü (b) vepOrpCel (c-d), M:1kb

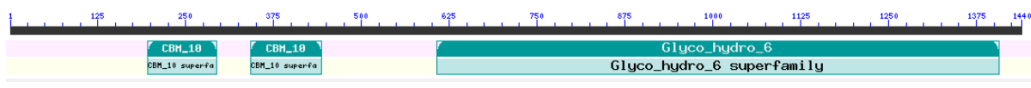
4.6.3. Klonlanan selülaaz enzimini kodlayan gen bölgesine ait nükleotit ve aminoasit dizisi

pOrpCel rekombinant plazmit DNA'dan PZR işlemi yardımıyla elde edilen 1.6 kb'lık selülaaz enzimini kodlayan gen bölgesinin yaklaşık olarak 1.4 kb'lık sekans dizilimi tespit edilmiştir. İlgili gen bölgesine ait sekans dizilimi ve aminoasit karşılığı Şekil 4.30'da verilmiştir. Expasy veri tabanı kullanılarak yapılan dizi analizde teorik olarak bu gen bölgesinin yaklaşık olarak 433 aminoasit, 47.7kDa ağırlığında, izoelektrik noktası (pI) 8.22 ve bir adet açık okuma çerçevesine (ORF) sahip olduğu tespit edilmiştir. Rumen funguslarına ait olan selülaaz gen bölgesinin izoelektrik noktası 3.7-8.3 arasında olduğu bilinmektedir (Barichievich ve Calza, 1990). Aynı zamanda Chen ve ark. (2003) *Orpinomyces* sp.'ye ait olan selülaaz gen bölgesinin klonlaması sonucu bu bölgenin yaklaşık olarak 46736 Dalton ağırlığında olduğunu da rapor etmişlerdir.

aag aaa aaa aaa taa tct att aat ata tat aga aca att aat aga aaa gtt att tga
atc aac ttt aaa atc tat cta tat ata aat aga ata ttt ttt ttt tag tat tag aaa aat
tac aaa aat taa aaa cga aaa atg aaa ttc tct act gtt tta gct act tta ttc gct act
M K F S T V L A T L F A T
gga gct ctt gct tct gaa tgt cac tgg caa tac cca tgt tgt aaa gat tgt act gtt tac
G A L A S E C H W Q Y P C C K D C T V Y
tac act gat act gaa ggt aag tgg ggt gtt tta aac aat gat tgg tgt atg att gat aac
Y T D T E G K W G V L N N D W C M I D N
aga cgt tgt agc agt aac aac aat aat tgt agc agc agt att acc tct caa ggt tac cca
R R C S S N N N N C S S S I T S Q G Y P
tgc tgt agc aac aat aat tgt aag gta gaa tac act gat aat gat ggt aag tgg ggt gtt
C C S N N N C K V E Y T D N D G K W G V
gaa aac aac aac tgg tgt ggt att tcc aac agt tgt ggt ggt ggt caa caa caa caa cca
E N N N W C G I S N S C G G G Q Q Q Q P
acc caa cca act caa cca act caa cca caa cca cca act caa cca agt agt gat aac ttc
T Q P T Q P T Q P Q Q P T Q P S S D N F
ttt gaa aat gaa att tac agt aac tac aag ttc caa gga gaa gtt gat att tct att aag
F E N E I Y S N Y K F Q G E V D I S I K
aaa tta aat ggt gac tta aag gct aag gct gaa aag gtc aaa tat gtt cca acg gct gtc
K L N G D L K A K A E K V K Y V P T A V
tgg tta gct tgg gat ggt gct cca caa gaa gtt cca aga tac ctt caa gaa gct ggt aac
W L A W D G A P Q E V P R Y L Q E A G N
aag act gtt gtt ttc gtc ttg tat atg att cca act cgt gat tgt gga gct aac gct tct
K T V V F V L Y M I P T R D C G A N A S
gct ggt ggt tct gct acc atc gat aaa tac aag ggt tac att aac aac att tac aac act
A G G S A T I D K Y K G Y I N N I Y N T
ttc aac caa tac aag aac tct aaa att gtt atg att ctt gaa cca gat act att ggt aac
F N Q Y K N S K I V M I L E P D T I G N
ctt gta act aac aat aac gat aac tgt aga aat gtc aga aac atg cac aaa caa gcc ctt
L V T N N N D N C R N V R N M H K Q A L
tct tac gct att agt aag ttc ggt act caa agt cac gtc aag gtt tac ctt gat gct gct
S Y A I S K F G T Q S H V K V Y L D A A
cac ggt gct tgg tta aac caa tac gct gat caa aca gct aat gtt att aag gaa atc cta
H G A W L N Q Y A D Q T A N V I K E I L
aat aac gct ggt agt ggt aag ctt cgt ggt att agt act aat gtt tct aac tac caa tcc
N N A G S G K L R G I S T N V S N Y Q S
att gaa agt gaa tac aaa tac cat caa aac ctt aac aga gcc ctt gaa agt aaa ggt gtc
I E S E Y K Y H Q N L N R A L E S K G V
aga ggt ctt aag ttc att gtc gat act tct cgt aac ggt gct aac gtt gaa ggt gct ttc
R G L K F I V D T S R N G A N V E G A F
aat gcc tcc ggt acc tgg tgt aac ttc aag ggt gct ggt tta ggc caa cgt cca aag ggt
N A S G T W C N F K G A G L G Q R P K G
aat cca aac cca ggt agc atg cca tta ctt gat gcc tac atg tgg att aag act cca ggt
N P N P G S M P L L D A Y M W I K T P G
gaa gct gat ggt tct tcc cga ggt tca aga gct gat ccg gta tgt gct cga gga gat agt
E A D G S S R G S R A D P V C A R G D S

Şekil 4.30. *Orpinomyces* sp. izolatından klonlanan selüloz enzimini kodlayan gen bölgesi sekans ve aminoasit dizilimi

Selülaaz enzimini kodlayan geninin glikozit hidrolaz 6 ailesine ait domain bölgesi olduğuNCBI veri tabanı yardımıyla tespit edilmiş ve Şekil 4.31’de NCBI sekans blast sonucu verilmiştir.

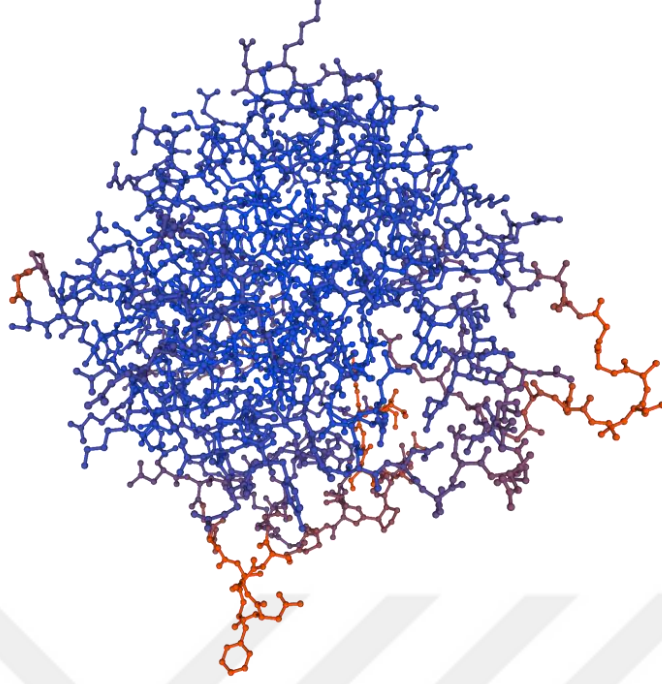


Şekil 4.31. *Orpinomyces* sp. izolatından klonlanan selülaaz enzimini kodlayan gen bölgesine ait sekans diziliminin NCBI blast sonucu

İlgili gen bölgesinde bulunan karbonhidrat bağlama modülü (CBM) domain bölgelerinde sırası ile 32 ve 38 aminasit kodladığı tespit edilmiştir (<http://pfam.xfam.org/search/sequence>).Rumen fungal *celA* gen bölgesinde bulunan CBM bölgesinin 30-40 aminoasitten meydana geldiği ve substrata bağlanma özelliği kazandırdığı bilinmektedir (Fanutti ve ark., 1995; Kaur ve ark., 2020; Brown ve ark., 2021). Ek olarak pOrpCel plazmitine klonlanan ilgili gen bölgesine ait domain bilgileri Çizelge 4.6’de verilmiştir.Aynı zamandailgili gen bölgesinin Swis Model homolojisinde olası polipeptit yapının 3 boyutlu hali verilmiştir (Şekil 4.32).

Çizelge 4.6. *Orpinomyces* sp. izolatından klonlanan selülaaz enzimini kodlayan gen bölgesine ait domain bilgileri

Familya	Tanımlama	Tipi	Başlangıç ve bitiş nükleotiti
Glyco_hydro_6	Glikoz hidrolaz 6	Domain	607-1407
CBM_10	Selüloz veya protein bağlama bölgesi	Domain	343-444
CBM_10	Selüloz veya protein bağlama bölgesi	Domain	196-294



Şekil 4.32. *Orpinomyces* sp. izolatından klonlanan gen bölgesinden sentezlenen selüloz enziminin üç boyutlu gösterimi

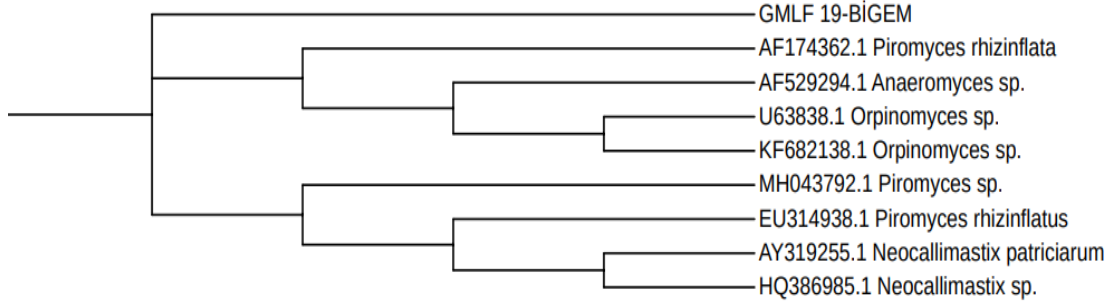
(<https://swissmodel.expasy.org/interactive/6PQvsp/models/>)

Aynı zamanda ilgili gen bölgesi için tasarlanan oligonükleotit primerlerin referans alındığı gen bölgelerine ait olan aminoasit homolojisi de gerçekleştirilmiştir. Buna göre AF 529294-*Anaeromyces* sp. (AAQ09258.1) ait olan polipepetit yapı ile %55, KF 682138-*Orpinomyces* sp. (AIK03053.1) ile %63 ve U63838-*Orpinomyces* sp. (AAB92678.1) ile %99 oranında homolojiye sahip olduğu gözlemlenmiş ve homoloji Şekil 4.33'de verilmiştir.

AAQ09258.1	MKFTTLLTALFATGTMASVCHPYPCNGCDVRYVDEEGNWGIE-GDWCFINESKCNNGG	59
AIK03053.1	MKFSALISTLFAAGAMASRCHPSYPCCNGCNVEYTDSDGNWGVENNDWCFIDESRCNPGY	60
AAB92678.1	MKFSTVLATLTFATGALASECHWQYPCCCKDCTVYYTDTGKKGVLNNDWCMIDNRRCSNN	60
GMLF19	MKFSTVLATLTFATGALASECHWQYPCCCKDCTVYYTDTGKKGVLNNDWCMIDNRRCSNN	60
	::::***:*** ** *****: * * *. * :*:***: .***:***: :*. .	
AAQ09258.1	---SCKFEALGYQCCCKNCN-NVVLTDNDGAWGIENHEWCIDYSRCNGHHHPQRTTTTTR	115
AIK03053.1	C---KFEALGYSCCK--GCDVVYTDADGNWGVENQQWCGIRDN-CTPNVPVTSARTTTR	113
AAB92678.1	NNCSSSITSQGYPCCSNNCKVEYTDNDGKGVENNNWCGISNS-CGGGQQQPTQPTQ-	118
GMLF19	NNCSSSITSQGYPCCSNNCKVEYTDNDGKGVENNNWCGISNS-CGGGQQQPTQPTQ-	118
	.: : ** *. . . * ** * ** *:***:*** . * : *	
AAQ09258.1	RTT-TTTTPAQSRPTSDNFFENTLYSNYKFQGEVDTSIAKLSGQLQEKAKKVKIPTAAW	174
AIK03053.1	TTTTTRTTVNPLPTSDNFFENELYSNYKFQGEVDQSIQRLSGSLQEKAKKVKIPTAAW	173
AAB92678.1	----PTQPQQPTQPSSDNFFENEIYSNYKFQGEVDISIKKLNGDLKAKAEKVKYVPTAV	174
GMLF19	----PTQPQQPTQPSSDNFFENEIYSNYKFQGEVDISIKKLNGDLKAKAEKVKYVPTAV	174
	*:***** :***** ** * *:*. * :*:*****:***.*	
AAQ09258.1	LAWDGAPNEVPRLQEAGSDTVVFLYMIPIRDCGAVSSRGGADSIDKYKGYVDKIYNTI	234
AIK03053.1	LAWSGATNEVARYLNEAGSKTVVFLYMIPIRDCNAGGSNGGADNLSTYQGYVNSIYNTI	233
AAB92678.1	LAWDGAPQEVPRYLQEAGNKTVVFLYMIPIRDCGANASAGGSATIDKYKGYINNIYNTS	234
GMLF19	LAWDGAPQEVPRYLQEAGNKTVVFLYMIPIRDCGANASAGGSATIDKYKGYINNIYNTF	234
	. ** : ** * *:.*****.***. * . * ** : . . . * :***:***	
AAQ09258.1	NQYPNSRIVMILEPDTLGNMVTNNNGICNLHDVYKQSLSYRWLVKFGTPKVTVRVSLDC	294
AIK03053.1	NQYPNSRIVMIEPDTIGNLVNTANNANCRNVHDMHKQALSYAI-SKFGTQK-NVRVYLDA	291
AAB92678.1	NQYKNSKIVMILEPDTIGNLVNTNNNDNCRNVRNMHKQALSYAI-SKFGTQS-HVKVYLDA	292
GMLF19	NQYKNSKIVMILEPDTIGNLVNTNNNDNCRNVRNMHKQALSYAI-SKFGTQS-HVKVYLDA	292
	*** ***:***:***:***:*** ** * .: : : : :*:*** ***** . *: * *	
AAQ09258.1	CPPVWLNTNRRWLKLLRKLVLNLMVRFVLLLTFSNYQSDNEYRYQQNLNSALERN	354
AIK03053.1	A-HGGWLNSSADRATAEVIAEILRNAGNGKIRGISTNVSNYQPVYSEYQYHQNLNRALES	350
AAB92678.1	A-HGAWLNQYADQTANVIKEILNAGSGKLRGISTNVSNYQSIESEYKYHQNLNRALES	351
GMLF19	A-HGAWLNQYADQTANVIKEILNAGSGKLRGISTNVSNYQSIESEYKYHQNLNRALES	351
	. **.. : : : * * : : . . ***** : .***:*** ***** *	
AAQ09258.1	GVRGMKFLVDTSRNGRG-----SSGTWCNFGAGLGARPQANP--ANYPLLDAYVWIKT	406
AIK03053.1	GVRGMKFLVDTSRNGRNP-----SSATWCNFKGAGLGARPQANPDP-NMPLLDAYVWIKT	404
AAB92678.1	GVRGLKFIVDTSRNGANVEGAFNASGTWCNFKGAGLGQRPKGNPNPGSMPLLDAYMWIKT	411
GMLF19	GVRGLKFIVDTSRNGANVEGAFNASGTWCNFKGAGLGQRPKGNPNPGSMPLLDAYMWIKT	411
	** *:***:***** . :*.***:***** **:*. * . *****:****	
AAQ09258.1	PGESDGN-----ADDNCRSYDSFQNAAPAGSWFHDYFVMLLQANPFI	449
AIK03053.1	PGESDSA---SSADPVCNRSDSLQGAPAGSWFHDYFVMLLENANPPF	449
AAB92678.1	PGEADGSSQGSRADPVCARGDSLQGAPDAGSWFHEYFTMLIQANPFI	459
GMLF19	PGEADGSSRGSRADPVCARGDS-----	433
	***:*. ** * **	

Şekil 4.33. *Orpinomycessp.* izolatından klonlanan selülaaz enzimi kodlayan gen bölgesi ile referans fungal selülaaz gen bölgelerine ait aminoasit homolojisi

Ayrıca sekans dizilimi elde edilmiş ilgili gen bölgesinin NCBI veri tabanına kayıtlı diğer AGF izolatlarından izole edilmiş selülaaz enzimi sentezleyen gen bölgeleri ile beraber filogenetik analizi (Şekil 4.34) yapılmıştır. Analiz sonucu ilgili gen bölgeleri üç kola ayrılmıştır. Meydana gelen kolların bir dalında çalışmamızda kullanılan gen bölgesi yer almıştır.



Şekil 4.34. NCBI veri tabanına kayıtlı olan selüloz enzimi sentezleyen gen bölgelerinin GMLF19 izolatına ait (GMLF19-BİGEM) selüloz enzimi sentezleyen gen bölgesi ile birlikte filogenetik analizi. Elde edilen filogenetik ağaç MEGA programı yardımıyla Bootstrap parametresi kullanılarak Neighbour Joining yöntemi ve iTOL (<https://itol.embl.de/>) veri tabanı kullanılarak elde edilmiştir.

4.6.4. *E.coli*/Cel rekombinant suşuna ait selüloz enzim üretimi ve karakterizasyonu

Orpinomyces sp. izolatına ait olan ilgili gen bölgesinin ligasyonu sonucu elde edilen pOrpCel plazmitinin *E.coli* DH5α'a aktarımı sağlanmış ve oluşan yeni suş selülotik özellik kazandırılmıştır. Optimum *in vitro* koşullarda inkübasyona bırakılan suşun farklı zaman dilimlerinde gelişimi gözlemlenmiş ve en yüksek enzim aktivitesinin inoküle edildikten 12 saat sonra yapılan analizlerinde hücresel spesifik enzim aktivitesine (589.64 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) ait olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. *E.coli*/Cel rekombinant suşunun süpernatant ve hücresel selüloz enzimine ait spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) ve toplam enzim ($\mu\text{mol/dk/ml}$) aktiviteleri

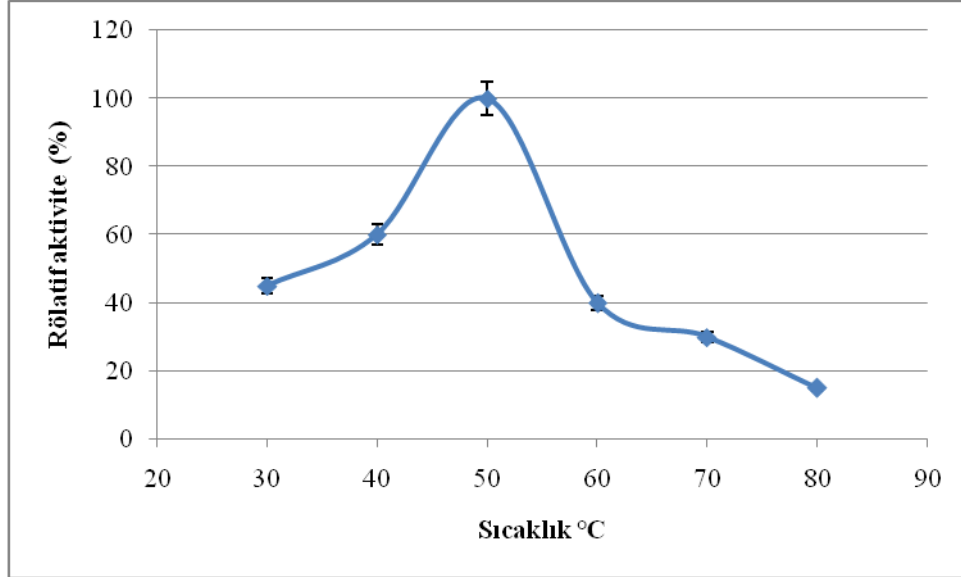
ZAMAN (Saat)	SÜPERNATANT		HÜCRESEL	
	Toplam Aktivite ($\mu\text{mol/dk/ml}$)	Spesifik Aktivite ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)	Toplam Aktivite ($\mu\text{mol/dk/ml}$)	Spesifik Aktivite ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)
3	4,1	49,2	19,8	249,4
6	7,6	87,6	27,6	471,02
9	9,7	119,6	34,54	514,18
12	11,58	187,4	47,8	589,64
24	1,4	27,8	13,6	198,14

Selüloz enzimi *Orpinomyces* sp. izolatında hücre dışı aktivitesi hücre içi aktivitesine göre daha fazla olduğu tespit edilmişti. Aynı izolattan izole edilen ilgili enzimin *E.coli*/Cel rekombinant suşunda ise hücre içi aktivitesinin hücre dışı aktivitesine oranla daha yüksek çıkmasının sebebinin ise ilgili suşun sahip olduğu periplasmik boşluktan kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Çünkü rumen fungal *celA* gen bölgesi ile elde edilen rekombinat *E.coli* suşunda hücresel selüloz aktivitesinin yüksek olması (Ekinci ve ark., 2001) bu enzimin periplasmik boşlukta kalabileceğini göstermiştir (Aylward ve ark.,

1999). Aynı zamanda rekombinat suşun sahip olduğu yüksek spesifik enzim aktivitesi ise bu bölgeden sadece selüloz enziminin salgılandığı, *Orpinomyces* sp. izolatında ise selüloz dışında farklı enzimlerinde etkinlik göstermesinden dolayı olduğu düşünülmüştür.

4.6.5. *E.coli*/Cel rekombinant suşuna ait selüloz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi

İlgili gen bölgesinden sentezlenen selüloz enzimin optimum sıcaklık düzeyi belirlenmiştir. Ortam sıcaklığının 30°C olması ile enzim %45 oranında aktive göstermeye başlamıştır. Sıcaklığın 40°C olduğu zaman diliminde enzim etkinliğinde %15 oranında artış meydana gelerek %60'lık bir aktiviteye sahip olmuştur. Enzimin %100 aktivite gösterdiği sıcaklık değeri ise 50°C olarak tespit edilmiştir. Sıcaklığın artmasına bağlı olarak enzim aktivitesinde azalma olduğu özellikle 50°C'den sonra yaklaşık olarak %60 oranında aktivite kaybı gözlemlenmiş ve sıcaklığın 80°C olması ile enzim sadece %15'e yakın aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Denman ve ark. (1996) tarafından *celA* enziminin optimum sıcaklıktan üst seviyelere doğru çıkması sonucu enzim aktivitesinin durduğunu gözlemlemesi ile benzerlik göstermiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. *E.coli*/Cel rekombinant suşuna ait selüloz enziminin farklı sıcaklıklarda gösterdiği rölatif aktivite yüzdesi

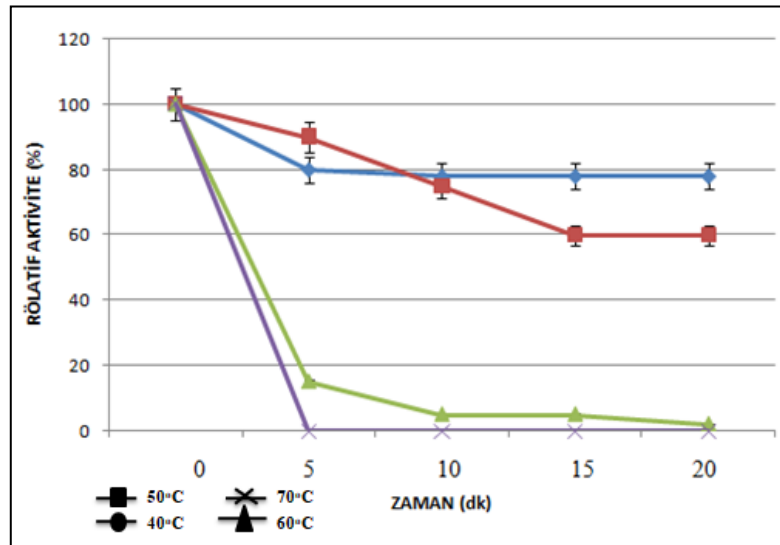
Orpinomyces sp. izolatı tarafından üretilen selüloz enzimleri ile aynı izolata ait ilgili gen bölgesinden sentezlenen selüloz enziminin çalıştığı optimum sıcaklık değerleri kıyaslandığı zaman özellikle ortam sıcaklığının 60°C olduğu durumda *E.coli*/Cel

rekombinant suşuna ait selülaaz enzim aktivitesinde %30 oranında aktivite kaybının görülmesi izolat tarafından sentezlenen selülaaz enzimlerinin belli sıcaklık aralıklarında aktivitesinin koruyabildiğini düşündürmüştür. Çünkü Chen ve ark. (2014) *Orpinomyces* sp. Y102 izolatına ait *celC* gen bölgesi tarafından üretilen selülaaz enzim aktivitesinin ortam sıcaklığı 60°C olduğu durumda enzimin %50 oranında aktivitesini kordüğunu rapor etmişlerdir.

Aynı şekilde rumen fungal selülotik enzimlerin optimum sıcaklık düzeyinin 50°C olması (Chen ve ark., 1994; Li ve ark., 1997; Qui ve ark., 2000; Çömlekçioğlu ve ark., 2010) bu enzimin endüstriyel sektörde aktif olarak kullanılan bazı enzimlerin çalıştığı optimum sıcaklık aralığına yakın olduğunu göstermektedir (Sharma ve ark., 2019).

4.6.6. *E.coli*/Cel rekombinant suşuna ait selülaaz enziminin termal stabilitesinin belirlenmesi

E.coli/Cel rekombinant suşuna aitselülaaz enziminin *Orpinomyces* sp. izolatı tarafından sentezlenen selülaaz enzimine benzer sonuçlar göstermiştir. *E.coli*/Cel rekombinant suşundan sentezlenen selülaaz enziminin 50°C’de termal stabilesinin olabileceği ancak biyokimyasal reaksiyon hızının yaklaşık olarak %40 azalabileceği görülmüştür. Optimum sıcaklık tespitinde 40°C enzim aktivitesinin 50°C (maksimum aktivite sıcaklığı)’ye oranla %40 az olmasına rağmen 40°C’de termal kararlılık durumu stabil olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.36).

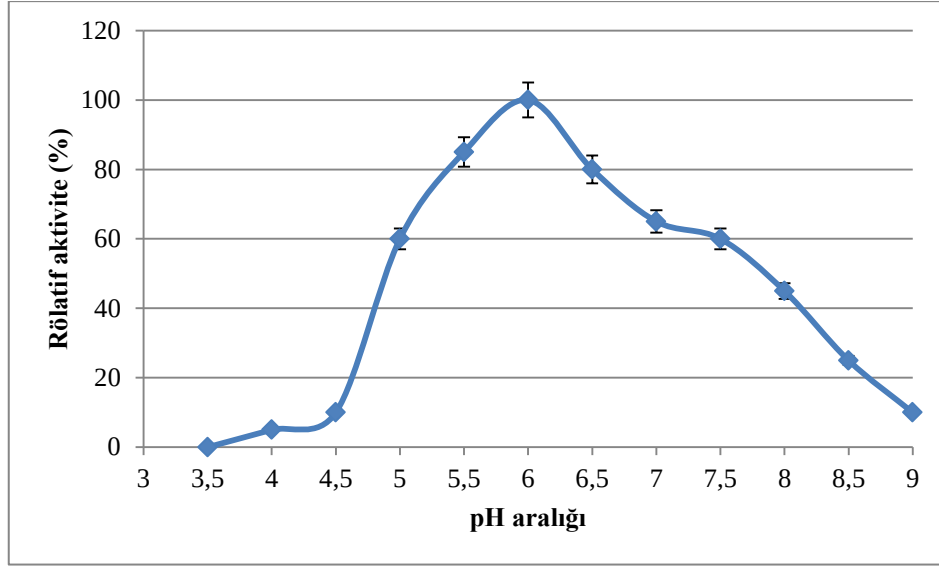


Şekil 4.36. *E.coli*/Cel rekombinant suşundan salgılanan selülaaz enziminin termal stabilitesi

AGF'ların sahip olduğu selülotik enzimlerin termal stabiletelerinin olduğu bilinmektedir. Özellikle *Piromyces* sp. izolatına ait olan selülaz enzimin 7 günlük inkübasyon süresinin sonunda enzim aktivitesinde %50 oranında etkinlik gösterdiği bilinmektedir (Dijkerman ve ark., 1996). Aynı şekilde *Orpinomyces* sp.'ye ait selülaz enziminin yaklaşık olarak 40°C'de 1 gün boyunca inkübasyona bırakılması sonrası enzim etkinliğinde herhangi azalmanın olmadığı bilinmektedir (Chen ve ark., 1994). Ancak endüstriyel alanda kullanılan bazı selülaz enzimleri genel olarak 50-55°C (Haki ve Rakshit, 2003; Obeng ve ark., 2017) arasında etkinlik göstermesi sonucu çalışılan selülaz enzimin ilerleyen dönemlerde endüstriyel özellik kazandırılması önemlidir.

4.6.7. *E.coli*/Cel rekombinant suşuna ait selülaz enziminin optimum pH'ın belirlenmesi

E.coli/Cel rekombinant suşundansalgılanan selülaz enzimeait optimal pH aralığı belirlenmiş ve maksimum düzeyde çalıştığı pH değeri 6.0 olarak bulunmuştur. İlgili gen bölgesinden sentezlenen enzimin pH 4.0'de %5'lik bir aktivite göstermesi ve pH 5.0 olduğu zaman ise ilk durumuna göre enzim etkinliği %60 oranında artışı gözlenlenmiştir. Rumen fungal selülaz enzimini kodlayan geninin klonlaması sonucu elde edilen optimum pH aralığının 4.0-7.5 arasında olduğu bilinmektedir (Barichievich ve ark., 1990; Li ve ark., 1997). Wang ve ark. (2013) *Neocallimastix* sp. izolatına ait *celA* gen bölgesinin klonlanması sonucu selülaz enzimin optimum pH değerinin 6.0 olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı şekilde aynı cinse sahip olan AGF ile yapılan başka bir çalışmada Çömlekçioğlu ve ark. (2010)'da benzer bir sonuç bulmuştur. Ancak *celA* gen bölgesindeki domain bölgelerinin mutasyona uğratılması sonucu bu pH aralığının 5.0 ile 11.0 arasında değiştirilebileceğini ispatlanmıştır (Chen ve ark., 2014). *E.coli*/Cel rekombinant suşundan salgılanan selülaz enziminin farklı pH aralığında gösterdiği rölatif aktivesi Şekil 4.37'de verilmiştir.

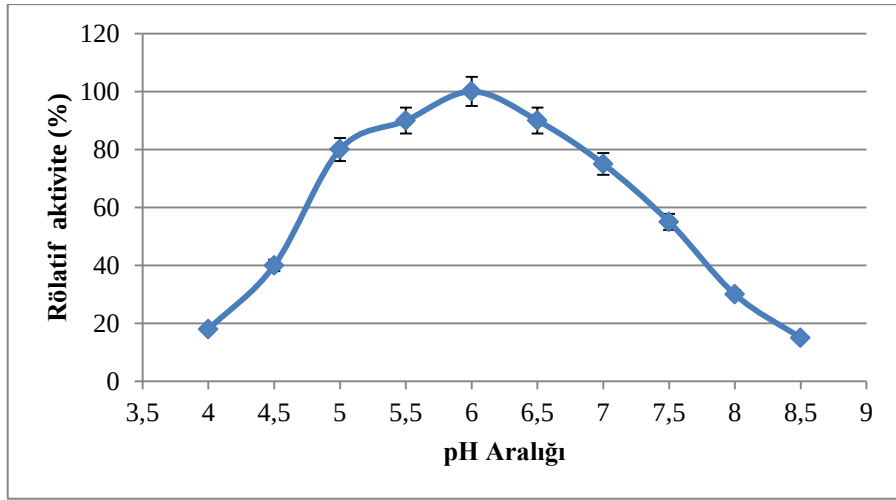


Şekil 4.37. *E.coli/Cel* rekombinant suşundan salgılanan selüloz enziminin farklı pH aralığında gösterdiği rölatif aktive

Orpinomyces sp. izolatına ait selüloz enziminin optimum çalıştığı pH değerinin 6.5 bulunması rağmen aynı izolata ait *E.coli/Cel* rekombinant suşundan sentezlenen selüloz enziminin optimum pH değeri ise 6.0 olarak tespit edilmiştir. Bu durum AGF'lar tarafından selülozun hidrolizde görevli olan birden fazla selüloz enzimi sentezleyen bölgelerin olduğunun göstergesidir. Li ve ark (1997) *Orpinomyces* sp. izolatına ait ve selülozun hidrolizde görevli olan *CelA* ve *CelC* gen bölgelerinden sentezlenen selüloz enzimlerinin sırası ile pH 4.5 ve 6.0'da optimum aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

4.6.8. *E.coli/Cel* rekombinant suşuna ait selüloz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi

E.coli/Cel rekombinant suşuna ait selüloz enziminin pH stabilitesinin ayarlanması endüstriyel olarak kullanılacak bir enzimin hem termal stabilitesine hem de pH stabilitesi enzimin karakterizasyonu hakkında net bilgi vermektedir. *E.coli/Cel* rekombinant suşu tarafından salgılanan selüloz enzimi pH 4.0 ile 8.5 arasında stabilizeye sahip olduğu gözlemlenmiştir. *E.coli/Cel* rekombinant suşuna ait selüloz enzimin optimum aktivite gösterdiği pH 6.0'da en iyi stabilizeye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ortam pH'ın alkali olmaya başlaması ile enzim stabilitesinde yaklaşık olarak %40'ın üstünde azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. *E.coli*/Cel rekombinant suşundan salgılanan selülaz enziminin pH stabilitesi

İlgili gen bölgesini tarafından sentezlenen selülaz enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi sırasında (Şekil 4.37) pH 4.0'da rölatif aktivite %5 iken pH stabilitesi (Şekil 4.36) %20 olarak bulunmuştur. Bu durum ilgili enzimin substrat ile tepkimeye başlamadan önce ön inkübasyona bırakılması sonrası yapısında bulunan aminoasitlerin aktifleştiği optimum pH değeri ile ilgili olduğu düşünülmüştür.

4.6.9. *E.coli*/Cel rekombinantsuşuna aitselülaz enzimi üzerine etki eden iyonlar

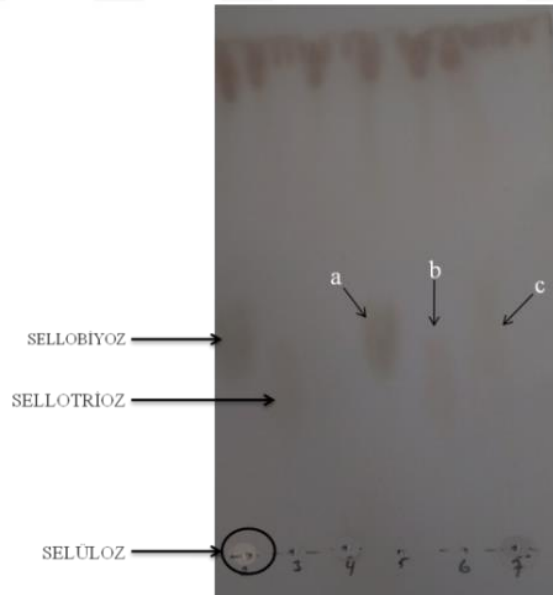
E.coli/Cel rekombinant suşu tarafından sentezlenen selülaz enzimaktivitesi (hücresel enzim aktivitesi) üzerine etki eden bazı metal iyonların araştırılması yapılmıştır. Bunun için 15 dk 35°C ön inkübasyon işleminden sonra kontrol (iyon içermeyen) ve deney grupları optimum sıcaklık ve pH altında analizleri gerçekleştirilmiştir. İyon içermeyen kontrol grubu sonucu referans değer olarak alınmıştır. İlgili gen bölgesine ait selülaz enzimi üzerine Zn^{+} iyonu inhibitör etki yaparak enzimin çalışmasını %81 oranında azalttığı, Co^{+} iyonun ise %67 oranında aktivör etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Mn^{+} iyon konsantrasyonundaki artış ile beraber enzim aktivitesi %17 daha fazla etkinliğine sahip olduğu görülmüştür. Mg^{+} iyonundaki yoğunluk farkı Mn^{+} iyonundaki enzimsel artışa yakın yaklaşık olarak %18 daha fazla aktivite gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 4.8). Aynı şekilde Çömlekçioğlu ve ark. (2010), *Neocallimastix* sp'den izole ettikleri *celA* geni üzerinde Mn^{+} , Co^{+} , Ca^{+} ve Mg^{+} iyonları ile DTT ve EDTA'nın aktivatör etkiye sahip olduğunu Sn^{+} , Hg^{+} , Zn^{+} , Ni^{+} , Cu^{+} ve Ba^{+} iyonları ile SDS'in inhibitör etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Çizelge 4.8. *E.coli*/Cel rekombinant suşu tarafından salgılanan selüloz enzimi (hücresel) üzerine etki eden iyonlar

Kimyasallar	Enzim Aktivitesi (%)	
	1mM (Son konstrasyon)	10mM (Son konstrasyon)
Kontrol	100 ± 0,9	100±0,4
MnCl₂	148±1,7	165±2,1
CoCl₂	167±1,0	120±1,9
CaCl₂	115±2,1	104±1,7
MgCl₂	108±2,6	118±2,7
ZnCl₂	19±1,4	TE

4.6.10. *E.coli*/Cel rekombinant suşuna ait selüloz enzimi aktivitesi sonucu oluşan ürünlerin ince tabaka kromatografi ile tespiti

İnce Tabaka Kromagrafik analizler yardımıyla rumen funguslarının sahip olduğu glikozit hidrolaz ailesine üye olan gen bölgeleri tarafından sekrasyona uğrayan hidrolitik enzimlerin etki mekanizması sonucu oluşan son ürünlerin kantitatif analizi gerçekleştirilebilir (Kelleci ve Çömlekçioğlu, 2016; Wen ve ark., 2021). *E.coli*/Cel rekombinant suşu ve *Orpinomyces* sp. izolatından sentezlenen selüloz enzim ürünlerinin Silika jele yüklemesi yapılırken aynı zamanda substrat ve hidrolizi sonucu oluşan son ürünlerde standart olarak yüklenmiştir (Şekil 4.39).

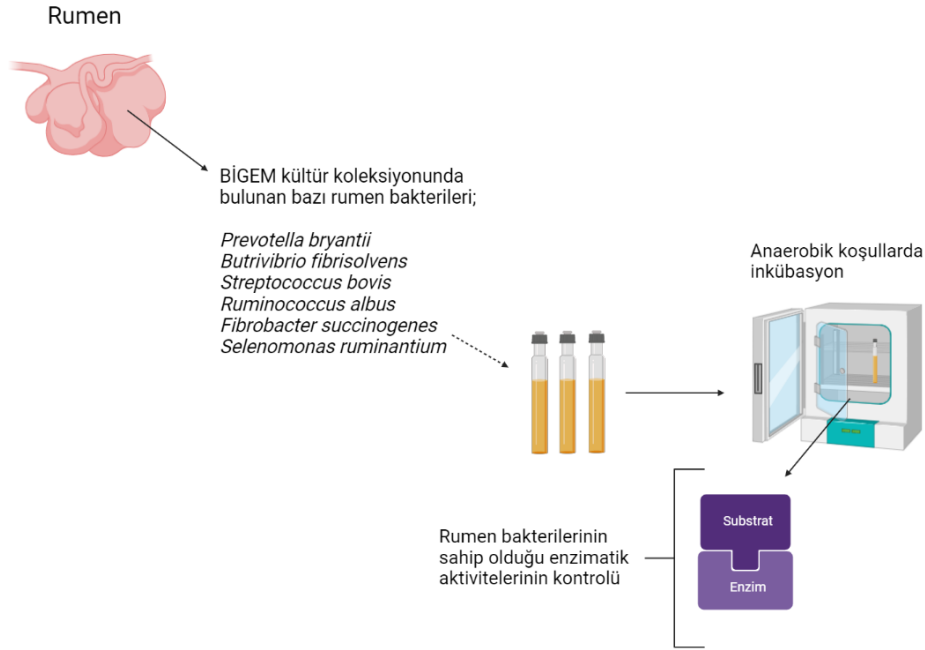


Şekil 4.39. *Orpinomyces* sp. izolatı ve *E.coli*/Cel rekombinant suşuna ait ince tabaka kromatogram görüntüsü. *E.coli*/Cel rekombinant ekstratı (5-7), *Orpinomyces* sp. izolatına ait ekstrat (6), Standart solüsyonlar selüloz (2), sellotrioz (3), sellobiyoz (2), sellobiyoz (a,b,c)

E.coli/Cel rekombinant suşu ve *Orpinomyces* sp. izolatına ait selülaaz enzimi aktivitesi sonucu oluşan örnekler ile standart çözeltilerin sahip olduğu R_f (Retention Factor) değerleri 0.5 olarak tespit edilmiştir. Farklı mikroorganizmaların sahip olduğu selülaaz enzimin hidrolizi sonucu oluşan son ürünlerin yaklaşık R_f değerleri glikoz için 0.7 (Suto ve ark., 1991), sellobiyoz için 0.53 (Koizumi ve Utamura, 1981; Suto ve ark., 1991; Yano ve ark., 2016) ve sellotrioz için 0.33 (Suto ve ark., 1991) olarak rapor edilmiştir.

4.7. Rumen Bakterilerinin Aktifleştirilmesi ve Kültüre Alınması

Stok rumen bakterileri azot tankın içerisinde çıkarılır ve oda sıcaklığına gelince kadar bekletildikten sonra başlık 3.2.3.'de belirtilen basal besiyerinde gelişim inokülasyonları gerçekleştirilir. Rumen bakterilerinin *in vitro* ortamda üretim süreci Şekil 4.40'da şematize edilmiştir.



Şekil 4.40. Rumen bakterilerinin *in vitro* koşullarda üretim süreci

Rumen bakterileri selülitik, hemiselülitik, lipolitik, pektinolitik, proteolitik, amilolitik, sakkarolitik, tanilolitik, üreolitik (Choudhury ve ark., 2015) ve inülitik (Kasperowicz ve ark., 2016) aktivite gösterebilmektedirler. Ancak inülitik (inülinaz) aktivite gösteren ender rumen bakteri suşları bulunmaktadır. Bundan dolayı çalışmamızda BİGEM kültür koleksiyonunda bulunan rumen bakterilerinin inülaaz aktivitesinin varlığını tespit etmek için *Prevotella bryantii*, *Butrivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus bovis*, *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes* ve *Selenomonas ruminantium* suşlarına

Lugol-İyot plak testi yapılmıştır. Yapılan kantitatif analiz sonunda sadece *Selenomonas ruminantium*'a ait plaklarda inülin hidrolizinin gerçekleştiği ve berrak zonların meydana geldiği gözlemlenmiştir (Şekil4.41).



Şekil 4.41. *Selenomonas ruminantium*'a ait süpernatant agar plaka testi

4.7.1. *Selenomonas ruminantium* ve özellikleri

S. ruminantium kavisli bir çubuk şekline sahip, gram negatif hücre yapısı bulunduran ve yaklaşık olarak onaltı adet kamçıya sahip olan rumen bakterisidir (Bryant, 1984). Ancak ortamda aşırı miktarda glikoz bulunması veya fosfat gibi yapıların kısıtlanması sonucu olarak kamçılarını kaybeder ve spiral bir morfolojiye sahip olabilirler (Hudman, 1984). *S.ruminantium* genel olarak maltoz, sellobiyoz, D-ksiloz, L-Arabinoz, glikoz, fruktoz, galaktoz, mannoz, laktoz ve mannitol gibi substratların fermantasyonun gerçekleştirebilecek enzim gruplarına sahiptir (Stewart ve ark., 1997).

4.7.2. *Selenomonas ruminantium*' ait inülinaz enzimi üretimi ve karakterizasyonu

BİGEM kültür koleksiyonunda bulunan *S.ruminantium*'ünün *vitro* koşullarda optimum gelişim gösterdiği anaerobik besi ortamına karbon kaynağı olarak inülin (%0.5-w/v) eklenmesi ile 36 saat inkübasyona bırakılmıştır (Hungate, 1969). Düzenli periyotlarda toplanan *S. ruminantium*'e ait hücresel ve süpernatant inülinaz enzim aktivitesi tespit

edilmiştir. En yüksek enzimsel aktivite 12 saatlik inkübasyon süresi sonunda süpernatant spesifik aktivitesi 8.22 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak bulunmuştur (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. *Selenomonas ruminantium*'a ait süpernatant ve hücresel toplam ($\mu\text{mol/dk/ml}$) ve spesifik ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein) inülinaz enzim aktivitesi

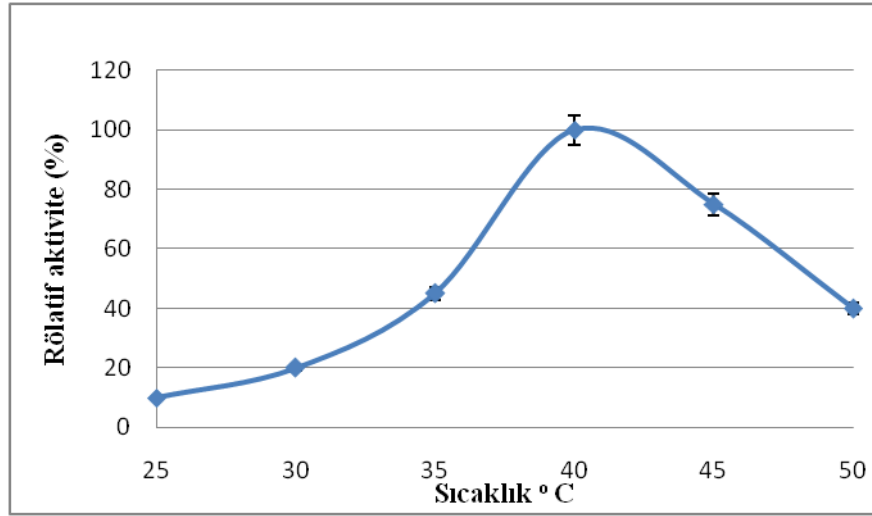
Süre (Saat)	Süpernatant		Hücresel	
	Spesifik Aktivite ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)	Toplam Aktivite ($\mu\text{mol/dk/ml}$)	Spesifik Aktivite ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein)	Toplam Aktivite ($\mu\text{mol/dk/ml}$)
0	TE	TE	TE	TE
12	8,22 $\pm$ 0,01	1,22 $\pm$ 0,21	2,5 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,002
24	5,72 $\pm$ 0,02	0,98 $\pm$ 0,04	1,04 $\pm$ 0,4	0,77 $\pm$ 0,001
36	2,4	0,55 $\pm$ 0,1	0,68 $\pm$ 0,07	0,3 $\pm$ 0

Fruktoz standartı kullanılmıştır.

S.ruminantium'a ait hücresel enzim aktivitesi olarak en yüksek spesifik enzim aktivitesi 2.5 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak bulunmuştur. *S.ruminantium*'un hücresel ve süpernatant en yüksek toplam enzim aktiviteleri sırası ile 0.9 ve 1.22 $\mu\text{mol/dk/ml}$ bulunmuştur. Rumen bakterileri dışında inülinaz aktivitesine sahip olan bazı prokaryot canlıların enzim etkinliği sırasıyla *Bacillus polymyxa*'da 37.50 IU/mL (Zherebtsov ve ark., 2002), *Bacillus safensis*'de 12.56 IU/mL (Singh ve ark., 2013), *Bacillus subtilis* 0,025 IU/mL (Vullo ve ark., 1991), *Clostridium acetobutylicum* 53 IU/mL (Efsthathiou ve ark., 1986), *Flavobacterium multivorum*'da 0,45IU/mL (Allais ve ark., 1986) ve *Staphylococcus* sp.'de 0,62 IU/mL (Selvakumar ve Pandey, 1999) olarak rapor edilmiştir.

4.7.3. *Selenomonas ruminantium*'a ait inülinaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi

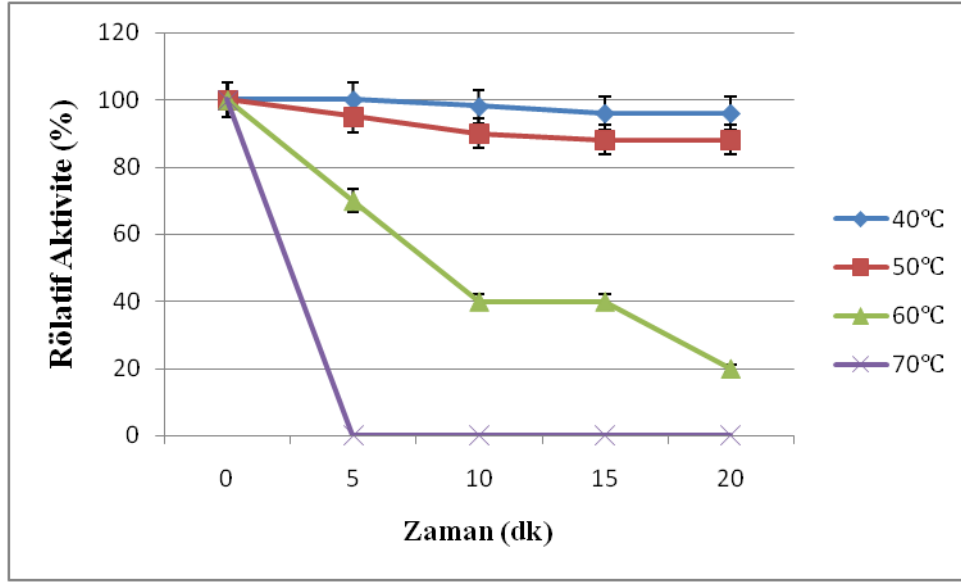
S.ruminantium'a ait inülinaz enziminin sahip olduğu optimum sıcaklık düzeyinin tespiti için enzim aktivitesinin en yüksek olduğu 12. Saatlik inkübasyon verileri kullanılmıştır. İlgili enzimin optimum sıcaklık değerinin %100 rölatif aktiviteye sahip olduğu 40°C olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.42). Ortam sıcaklığın 25°C olması ile yaklaşık %10 enzim aktivesi göstermeye başlamış ve sıcaklığın 35°C gelmesi ile enzim etkinliğinde %35 oranında artış gözlemlenmiştir. Sıcaklığın yükselmesine bağlı olarak enzim aktivitesinde %60 oranında azalmanın olduğu tespit edilmiştir. İnülinaz enzimin optimum sıcaklık değerlendirmesi yapılırken farklı canlılardan sekresyona uğramış inülinaz enzimin aktif olduğu optimum sıcaklık aralığının 35°C-55°C arasında olduğu bilinmektedir (Yun ve ark., 1997; Singh ve ark., 2007; Raveendran ve ark., 2018). Ayrıca Elyachoui ve ark. (1992), süpernatant bakteriyel inülinaz aktivitesinin optimum çalışma şartını 40°C olarak rapor etmişlerdir.



Şekil 4.42. *S.ruminantium*’a ait inülinaz enziminin optimum sıcaklık durumu

4.7.4. *Selenomonas ruminantium*’a ait inülinaz enziminin termal stabilitesinin belirlenmesi

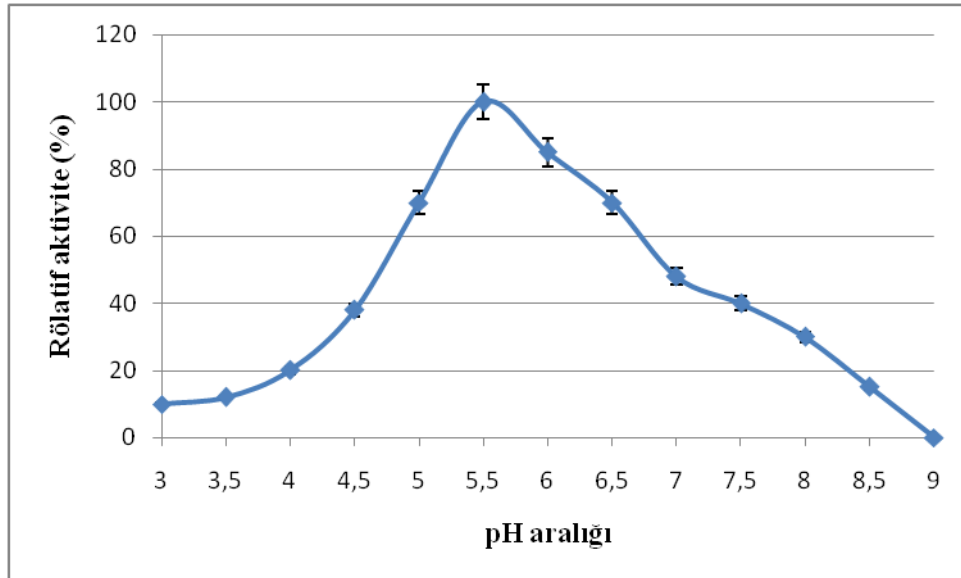
Selenomonas ruminantium’a ait olan inülinaz enziminin termal stabilitesini belirlemek amacıyla enzime substrat ilave edilmeden 40, 50, 60 ve 70 °C sıcaklıklarda, 5, 10, 15 ve 20 dk ön inkübasyona tabi tutulduktan sonra enzimin kalan aktivitesini belirlemek için substrat ilave edilerek standart enzim deneyleri gerçekleştirilmiştir. *S.ruminantium* suşunun 40°C’de diğer sıcaklıklara oranla stabilitesinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.43). İlgili enzimin termal stabilizeye sahip olduğu sıcaklık enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ile aynı olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda mikrobiyal inülinazlar farklı termal kararlılıklara sahip olabilmekle birlikte benzer stabilizeye sahip olabilirler (Singh ve Singh, 2017). Sanal ve ark. (2005), bazı fungal inülinaz enzimin termal stabilitesinin 40°C’de daha uzun süre stabil olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı şekilde bazı prokaryot canlılara ait inülinaz enziminin de termal stabilitesinin (40°C) fungal inülinazlara benzer olduğunu bildirmişlerdir (Haraguchi ve ark.,1990).



Şekil 4.43. *S.ruminantium* 'a ait inülinaz enziminin termal stabilitesi

4.7.5. *Selenomonas ruminantium* 'a ait inülinaz enziminin optimum pH'ın belirlenmesi

Selenomonas ruminantium 'a ait inülinaz enziminin en yüksek aktiviteye sahip olduğu pH değeri 5.5 olarak bulunmuş ve ortamın alkali olması ile birlikte enzim etkinliğinin azalmaya başladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.44). Ortam pH 3.0 olması ile ilgili enzimin aktivite gösterdiği (%10) ve bu aktivitenin pH 5.0 olduğunda yaklaşık olarak %40 oranında arttığı gözlemlenmiştir.



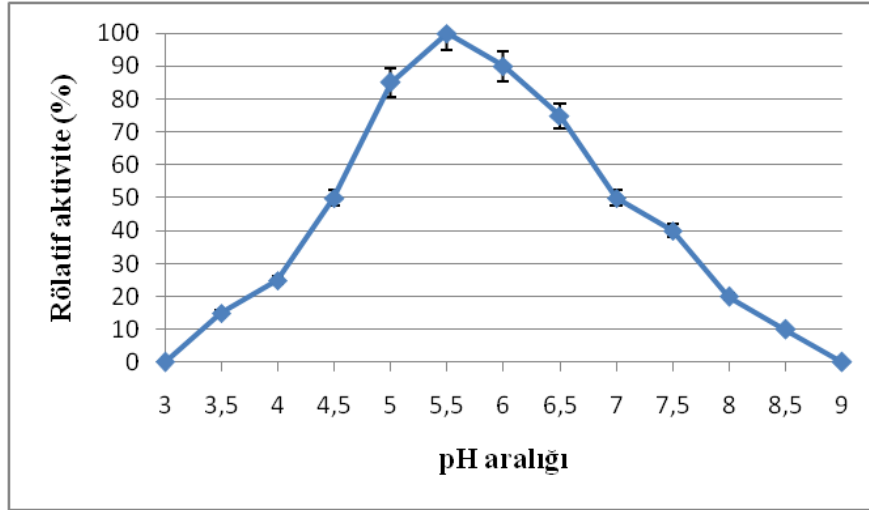
Şekil 4.44. *Selenomonas ruminantium* 'a ait inülinaz enzimi optimum pH aktivitesi

Çoğu rumen bakterisi nötre yakın pH ortamında optimum gelişim göstermesine rağmen bazı türlerin gelişim gösterdiği pH aralıkları farklı olabilmektedir. *Selenomonas ruminantium* ve alt türleri pH 4.5-7.6 aralığında gelişim gösterdiği bilinen en iyi örneklerden biridir (Russell ve Dombrowski, 1980). Çalışmamızda kullanılan *S.ruminantium* suşundan sentezlenen inülinaz enzimin maksimum seviyede rölatif aktivite gösterdiği pH değerinin 5.5 olması bu canlının *in vitro* ortamda gelişim gösterdiği pH aralığında olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda ortam pH'ının 3.0-4.5 aralığındaki inülinaz enzim etkinliğinin ise ilgili enzimi oluşturan aminoasitlerin aktifleşmeye başladığı pH değeri ile ilgili olduğu düşünülmüştür.

Inülinaz enzimi ticari amaçlı olarak farklı canlılardan saflaştırılabilmekte ve optimal pH değeri tespit edilebilmektedir. Bakteriyel kökenli inülinaz enzimleri pH 4.8 ile 7.0 arasında etkinlik gösterdiği bilinmektedir (Elyachoui ve ark., 1992; Fontana ve ark., 1994). Xu ve ark. (2016) *Lactobacillus* sp.'den elde etikleri prokaryotik inülinaz enziminin optimum pH değerini 5.2 olarak rapor etmişlerdir.

4.7.6. *Selenomonas ruminantium*'a ait inülinaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi

Selenomonas ruminantium'a ait inülinaz enziminin pH stabilitesi %50 aktivite göstermeye başladığı pH 4.5 ile 7.0 aralığında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.45). İlgili enzimin çalıştığı optimum pH aralığına benzer olduğu ancak pH 3.0 olduğu durumda enzimin etkinlik göstermesine rağmen bu pH'da stabilitesi olmadığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda inülinaz enzimin pH stabilitesi üzerine yapılan çalışmalarda farklı stabilite değerlerinin olabileceği tespit edilmiştir. Mikrobiyal inülinaz enzimi sentezleyen bazı fungal canlılarda bu aralığın 3.2 ile 7.0 arasında olduğu (Nakamura ve ark., 2001), *Bacillus* sp. gibi bazı prokaryot canlılarda 4.2 ile 10.4 gibi geniş bir pH stabilitesi mevcuttur (Keto ve ark., 1999).



Şekil 4.45. *Selenomonas ruminantium* 'a ait inülinaz enziminin pH stabilitesi

4.7.8. *Selenomonas ruminantium*'a ait inülinaz enzime etki eden iyonlar

S.ruminantium 'a ait olan inülinaz enzimi üzerinde etkili olan iyonların etkisinin tespiti için enzim aktivitesinin yüksek olduğu süpernatant kısım kullanılmıştır. Bakteriyel kökenli inülinazlar üzerine farklı bir şekilde etkiye sahip olan iyonların *Selenomonas ruminantium* üzerinde 1mM'lık son konsantrasyonları Mg^{+} %2, Co^{+} %24, Mn^{+} %3 aktivatör etkiye sahip olurken 10mM'lık son konsantrasyonlarında ise bu iyonların hepsinin inhibitör özellikte olduğu ve Zn^{+} iyonu ise her iki konsantrasyon uygulamasında da inhibitör etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.10). Bakteriyel inülinaz üzerine aynı iyonlar aktivatör veya inhibitör etkiye sahip olabilmektedir (Li ve ark., 2012). *Streptomyces* sp.'ye ait inülinaz üzerine Mg^{+} %13, Cu^{+} %5, Co^{+} %28, Mn^{+} %59 oranında aktivatör etkiye sahip iken, Ca^{+} ise %2 oranında inhibitör etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Laowklomve ark., 2012). *Bacillus* sp.'ya ait olan inülinaz enzimi üzerinde Mg^{+} %1, Cu^{+} %55, Co^{+} %25, Mn^{+} %23 oranında inhibitör etki yaratmıştır (Ivanova ve ark., 2021).

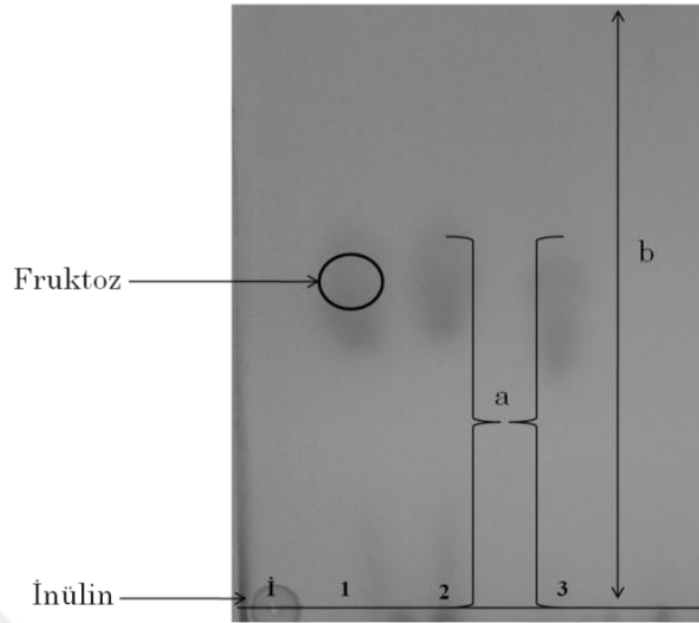
Çizelge 4.10. *Selenomonas ruminantium*'a ait süpernatantinülinaz enzimi üzerine etki eden iyonların farklı konsatrasyondaki aktivitesi

Örnekler	1mM (Son konsatrasyon)	10mM (Son konsatrasyon)
Kontrol	100±0,9	100±1,0
MnCl ₂	103±0,9	90±1,0
CoCl ₂	124±1,5	80±1,4
CaCl ₂	108±0,5	65±1,9
MgCl ₂	102±0,3	60±0,5
ZnCl ₂	80±0,7	50±1,0

Aynı iyonların farklı canlılar tarafından sentezlenen inülinaz enzimi üzerinde farklı etkiye sahip olması bu enzimlerin sahip olduğu aktif merkezlerinde bulunan *N*-terminal kısmındaki katalitik domain bölgesi ile ilgili olabileceği (Bujacz ve ark., 2011) ve bu etkinin ilgili bölgede bulunan aminoasitlerin çeşitli iyonlar karşısında elektriksel yük değişimine sahip olarak enzimin substrata bağlanma özelliğini farklılaştırması sayesinde gerçekleştiği bilinmektedir (Nagem ve ark., 2004). Bundan dolayı *S.ruminantium*'a ait inülinaz enzimi üzerinde aktivatör etkiye sahip olan (1mM Mg⁺, Co⁺ ve Mn⁺) iyonların katalitik domain bölgesi üzerinde substrata bağlanma özelliğini pozitif yönde etkide bulunduğu düşünülmektedir.

4.7.9. *Selenomonas ruminantium*'a ait inülinaz aktivitesi sonucu oluşan ürünlerin ince tabaka kromatografi ile belirlenmesi

Bakteriyel inülinaz enzim ailesinin aktivitesi sonucu oluşan hidroliz ürünlerinin kantitatif olarak tespiti için ince tabaka kromatografisi yapılabilir (Kasperowicz ve ark., 2010; Kasperowicz ve ark., 2012; Ojwach ve ark., 2020). *S.ruminantium* suşundan sentezlenen inülinaz enzim ürünlerinin Silika jele yüklemesi yapılırken aynı zamanda substrat ve hidrolizi sonucu oluşan son ürün standart olarak yüklenmiştir (Şekil 4.46).



Şekil 4.46. *S.ruminantium*'a ait inülinaz enzim aktivitesi ince tabaka kromatogram görüntüsü. i: İnülin, 1: Fruktoz standartı, 2-3: *S.ruminantium*'a ait ürün, a: Çözünen madde mesafe, b: Çözücü madde mesafe

S.ruminantium'a ait inülinaz enzim aktivitesi sonucu oluşan son ürünün fruktoz olduğu standart olarak kullanılan fruktoz sayesinde tespit edilmiştir. Son ürün R_f değerinin 0.47 olması mikrobiyal kökenli inülinaz enzim aktivitesinin R_f sonuçlarına uygunluk göstermiştir (Şekil 4.44). TLC analizi sırasında fruktoz monomerinin sahip olduğu R_f değeri hesaplanırken ürün ile standart solüsyon kıyaslaması yapılmakta ve bu değerin bazı çalışmalarda farklılık göstermesinin ise kullanılan mobil fazla ilgili olduğu bilinmektedir (Reiffová ve ark., 2003) ve genel olarak fruktoza ait R_f değeri yaklaşık olarak 0,47 olarak tespit edilmektedir (Fontana ve ark., 1994).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Çalışmanın amacı doğrultusunda rumen mikroorganizmalarına ait biyoteknolojik potansiyeli olan ksilanaz, selüloz ve inülinaz enzimlerinin moleküler düzeyde analizleri yapılırken ksilanaz ve selüloz enzimlerinin ilgili gen bölgeleri de klonlanmıştır. Ayrıca inülinaz enziminin *Selenomonas ruminantium* suşu tarafından sentezlendiği ilk defa bulunmuştur. *E.coli* DH5 α 'ya aktarılan ksilanaz ve selüloz enzimini kodlayan gen bölgelerinin sekans analizi sonrası sahip oldukları baz uzunlukları sırası ile 900 ve 1400 bp olarak tespit edilmiştir. Bu bölgelerde birer adet açık okuma çerçevesi (ORF) ve pNeoXyl'e klonlanan ilgili gende bir adet katalitik domain, pOrpCel'e klonlanan ilgili gen bölgesinde ise karbonhidrat bağlama modülüne ait domain bölgesi tespit edilmiştir. İlgili gen bölgelerinden sentezlenen enzimlere ait aminoasit dizilerinin tespitinden sonra ksilanaz enzimin sahip olduğu izoelektrik (pI) noktası 7.78 iken selüloz enziminin pI noktası 8.72 olarak bulunmuştur. Enzimlere ait en yüksek aktivite değerleri ise ksilanaz için 4986.24 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein, selüloz için 589.64 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein ve inülinaz için 8.82 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein şeklinde bulunmuştur. Ksilanaz ve selüloz enzimlerin çalıştığı optimum sıcaklık değerleri 50°C, *Selenomonas ruminantium* suşundan sekrasyona uğrayan inülinaz enzimin optimum sıcaklık değerinin ise 40°C olduğu tespit edilmiştir. Enzimlerin çalıştığı optimum pH değerleri ksilanaz için 6.5, selüloz için 6.0 ve inülinaz için 5.5 olarak belirlenmiştir.

Selüloz ile inülinaz enzimleri 40°C'de 60 dk boyunca termal stabilitesinin korunurken, ksilanaz enzimi ise termal stabiliteye sahip olmadığı gözlemlenmiştir. pH stabilitesi için ksilanaz enziminin 3.5-9.0 aralıklarında %55, selüloz enziminin 4.0-8.5 aralığında %50.7, inülinaz enziminin ise 3.0-9.0 aralığında %50.9 oranında stabilitesini koruduğu belirlenmiştir.

Mn⁺², Co⁺², Ca⁺² ve Mg⁺² iyonları üç enzim üzerinde de aktivatör etki gösterirken Zn⁺² iyonu ise inhibitör etki göstermiştir. Enzimlerin etkili oldukları substrat hidrolizi sonucu oluşan ürünler ince tabaka kromatografi ile tespit edilerek R_f (Retention factor) değerleri belirlenmiştir.

5.2. Öneri

Ksilanaz enzimin özellikle gıda sektöründe aktif olarak kullanıldığı düşünüldüğünde mevcut ksilanaz enziminin domain bölgeleri CRISPR sistemi yardımıyla uygun modifikasyonlar yapılarak termal stabilitesinin artırılması gereklidir. Selüloz enziminin sekresyon seviyesinde artış olabilmesi için ilgili gen bölgesinin farklı plazmit vektöre klonlanması ya da promotor bölgelerinin kuvvetlendirilmesi gereklidir. *S. ruminantium* suşu tarafından ilk defa sentezlendiği gözlemlenen inülinaz enziminin ilgili gen bölgesi için uygun primerler tasarlanarak bölgenin tespiti ve uygun plazmit vektöre aktarılması oldukça önemlidir.



KAYNAKLAR

- Adesioye, F. A., Makhalanyane, T. P., Biely, P., Cowan, D. A. (2016). Phylogeny, classification and metagenomic bioprospecting of microbial acetyl xylan esterases. *Enzyme and Microbial Technology*, 93, 79-91.
- Agarwal, N., Kamra, D. N., Chaudhary, L. C. (2015). Rumen microbial ecosystem of domesticated ruminants. In *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution* (pp. 17-30). Springer, New Delhi.
- Akin, D.E., (1993). Plant Structure and Chemistry – Influence on lignocellulose degradation by rumen protozoa, bacteria, and fungi. In: Genetics, Biochemistry, and Ecology of Lignocellulase Degradation. Shimada, K., Ohmiya, K., Kobayashi, Y., Hoshino, S., Saka, K., Karita, S., Ed., Unipublishers, Tokyo, Japan.
- Akin, D. E. (1979). Microscopic evaluation of forage digestion by rumen microorganisms—a review. *Journal of Animal Science*, 48(3), 701-710.
- Akin, D. E., Borneman, W. S. (1990). Role of rumen fungi in fiber degradation. *Journal of Dairy Science*, 73(10), 3023-3032.
- Akin, D. E., Borneman, W. S., Windham, W. R. (1988). Rumen fungi: morphological types from Georgia cattle and the attack on forage cell walls. *Biosystems*, 21(3-4), 385-391.
- Akin, D. E., Gordon, G. L., Hogan, J. P. (1983). Rumen bacterial and fungal degradation of *Digitaria pentzii* grown with or without sulfur. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(3), 738-748.
- Akyol, I., Comlekcioglu, U., Kar, B., Ekinci, M., 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.
- Alataş, M. S., Umucalilar, H. D. (2011). Bacteria of the rumen ecosystem and their roles. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(1), 71-83.
- Allais, J. J., Kammoun, S., Blanc, P., Girard, C., Baratti, J. C. (1986). Isolation and characterization of bacterial strains with inulinase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(5), 1086-1090.
- Amin, F., Bhatti, H. N., Bilal, M. (2019). Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 1017-1026.
- Amore, A., Knott, B. C., Supekar, N. T., Shajahan, A., Azadi, P., Zhao, P., ...Taylor, L. E. (2017). Distinct roles of N- and O-glycans in cellulase activity and stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(52), 13667-13672.

- Ang, S. K., Shaza, E. M., Adibah, Y., Suraini, A. A., Madihah, M. S. (2013). Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 48(9), 1293-1302.
- Antosch, J., Hadzifejzovic, N., Hubbert, M., Prenner, L. N., Donner, B., Schram, J. (2010). Establishment of xylose in plantago ovata forssk. as a leading compound for quantification in raw material and finished product. *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies*, 33(7-8), 996-1004.
- Arca, H. C., Mosquera-Giraldo, L. I., Bi, V., Xu, D., Taylor, L. S., Edgar, K. J. (2018). Pharmaceutical applications of cellulose ethers and cellulose ether esters. *Biomacromolecules*, 19(7), 2351-2376.
- Ariyawansa, H. A., Hyde, K. D., Jayasiri, S. C., Buyck, B., Chethana, K. W., Dai, D. Q., ... Spirin, V. (2015). Fungal diversity notes 111–252—taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. *Fungal diversity*, 75(1), 27-274.
- Armenta, S., Moreno-Mendieta, S., Sánchez-Cuapio, Z., Sánchez, S., Rodríguez-Sanoja, R. (2017). Advances in molecular engineering of carbohydrate-binding modules. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 85(9), 1602-1617.
- Attwood, G. T., Brooker, J. D. (1992). Complete nucleotide sequence of a *Selenomonas ruminantium* plasmid and definition of a region necessary for its replication in *Escherichia coli*. *Plasmid*, 28(2), 123-129.
- Aylward, J. H., Gobius, K. S., Xue, G. P., Simpson, G. D., Dalrymple, B. P. (1999). The *Neocallimastix patriciarum* cellulase, *CelD*, contains three almost identical catalytic domains with high specific activities on Avicel. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(8-9), 609-614.
- Balch, W. E., Wolfe, R. (1976). New approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth of *Methanobacterium ruminantium* in a pressurized atmosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 32(6), 781-791.
- Barichievich, E. M., Calza, R. E. (1990). Supernatant protein and cellulase activities of the anaerobic ruminal fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(1), 43-48.
- Barr, D. J. S., Kudo, H., Jakober, K. D., Cheng, K. J. (1989). Morphology and development of rumen fungi: *Neocallimastix* sp., *Piromyces communis*, and *Orpinomyces bovis* gen. nov., sp. nov. *Canadian Journal of Botany*, 67(9), 2815-2824.
- Bauchop, T., Mountfort, D. O. (1981). Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(6), 1103-1110.

- Bayané, A., Guiot, S. R. (2011). Animal digestive strategies versus anaerobic digestion bioprocesses for biogas production from lignocellulosic biomass. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 10(1), 43-62.
- Bayer, E. A., Belaich, J. P., Shoham, Y., Lamed, R. (2004). The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.*, 58, 521-554.
- Bayer, E. A., Chanzy, H., Lamed, R., Shoham, Y. (1998). Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology*, 8(5), 548-557.
- Beguín, P. (1990). Molecular biology of cellulose degradation. *Annual Review of Microbiology*, 44(1), 219-248.
- Bekele, A.Z., Koike, S., Kobayashi Y. 2010. Genetic diversity and diet specificity of ruminal *Prevotella* revealed by 16s rna gene-based analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 305(1), 49-57.
- Berger, E., Jones, W. A., Jones, D. T., Woods, D. R. (1989). Cloning and sequencing of an endoglucanase (*end1*) gene from *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c. *Molecular and General Genetics MGG*, 219(1), 193-198.
- Bernalier, A., Fonty, G., Gouet, P. (1991). Cellulose degradation by two rumen anaerobic fungi in monoculture or in coculture with rumen bacteria. *Animal Feed Science and Technology*, 32(1-3), 131-136.
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances*, 18(5), 355-383.
- Binod, P., Sindhu, R., Janu, K. U., Pandey, A. (2019). Hydrolysis of cellulosic and hemicellulosic biomass. In *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels* (pp. 447-460). Academic Press.
- Bisaria, V. S., Saxena, S. K., Manihar, R. B., Gopalkrishnan, K. S. (1984). Solid state fermentation of plant residues for improved animal feed by *Pleurotus* sp. *Applied biochemistry and biotechnology*, 9(4), 341-341.
- Black, G. W., Hazlewood, G. P., Xue, G. P., Orpin, C. G., Gilbert, H. J. (1994). Xylanase B from *Neocallimastix patriciarum* contains a non-catalytic 455-residue linker sequence comprised of 57 repeats of an octapeptide. *Biochemical Journal*, 299(2), 381-387.
- Bladen, H. A., Bryant, M. P., Doetsch, R. N. (1961). A study of bacterial species from the rumen which produce ammonia from protein hydrolyzate. *Applied Microbiology*, 9(2), 175-180.
- Boger, M. C., Lammerts van Bueren, A., Dijkhuizen, L. (2018). Cross-feeding among probiotic bacterial strains on prebiotic inulin involves the extracellular exo-

- inulinase of *Lactobacillus paracasei* strain W20. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(21), e01539-18.
- Borneman, W. S., Akin, D. E., Ljungdahl, L. G. (1989). Fermentation products and plant cell wall-degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(5), 1066-1073.
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 345-351.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Braune, R. (1913). *Untersuchungen über die im Wiederkäuermagen vorkommenden Protozoen...* Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin.
- Breton, A., Bernalier, A., Bonnemoy, F., Fonty, G., Gaillard, B., Gouet, P. (1989). Morphological and metabolic characterization of a new species of strictly anaerobic rumen fungus: *Neocallimastix joyonii*. *FEMS Microbiology Letters*, 58(2-3), 309-314.
- Breton, A., Gaillard-Martine, B., Gerbi, C., de Ségura, 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 rhizinflata*. *Current Microbiology*, 31(4), 224-227.
- Breton, A., Bernalier, A., Dusser, M., Fonty, G., Gaillard-Martine, B., Guillot, J. (1990). *Anaeromyces mucronatus* nov. gen., nov. sp. A new strictly anaerobic rumen fungus with polycentric thallus. *FEMS Microbiology Letters*, 70(2), 177-182.
- Bromley, J. R., Busse-Wicher, M., Tryfona, T., Mortimer, J. C., Zhang, Z., Brown, D. M., Dupree, P. (2013). GUX 1 and GUX 2 glucuronyltransferases decorate distinct domains of glucuronoxylan with different substitution patterns. *The Plant Journal*, 74(3), 423-434.
- Brookman, J. L., Ozkose, E., Rogers, S., Trinci, A. P., Theodorou, M. K. (2000). Identification of spores in the polycentric anaerobic gut fungi which enhance their ability to survive. *FEMS Microbiology Ecology*, 31(3), 261-267.
- Brown, J. L., Swift, C. L., Mondo, S. J., Seppala, S., Salamov, A., Singan, V., ...O'Malley, M. A. (2021). Co-cultivation of the anaerobic fungus *Caecomyces churrovis* with *Methanobacterium bryantii* enhances transcription of carbohydrate binding modules, dockerins, and pyruvate formate lyases on specific substrates. *Biotechnology for biofuels*, 14(1), 1-16.
- Brunzelle, J. S., Jordan, D. B., McCaslin, D. R., Olczak, A., Wawrzak, Z. (2008). Structure of the two-subsite β -D-xylosidase from *Selenomonas ruminantium* in complex

- with 1, 3-bis [tris (hydroxymethyl) methylamino] propane. *Archives of biochemistry and biophysics*, 474(1), 157-166.
- Bryant, M. P., Small, N., Bouma, C., Chu, H. (1958). *Bacteroides ruminicola* n. sp. and *Succinimonas amylolytica* the new genus and species: species of succinic acid-producing anaerobic bacteria of the bovine rumen. *Journal of bacteriology*, 76(1), 15-23.
- Bryant, M. P., Small, N. (1956). The anaerobic monotrichous butyric acid-producing curved rod-shaped bacteria of the rumen. *Journal of Bacteriology*, 72(1), 16-21.
- Bu, Y., Cui, Y., Peng, Y., Hu, M., Tian, Y. E., Tao, Y., Wu, B. (2018). Engineering improved thermostability of the GH11 xylanase from *Neocallimastix patriciarum* via computational library design. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(8), 3675-3685.
- Bujacz, A., Jedrzejczak-Krzepkowska, M., Bielecki, S., Redzynia, I., Bujacz, G. (2011). Crystal structures of the apo form of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* and its complex with fructose. *The FEBS Journal*, 278(10), 1728-1744.
- Bujna, E., Styevko, G., Laskawy, P., Rezessy-Szabo, J., Nguyen, V. D., Tran, A. M., ... Nguyen, Q. D. (2022). Synthesis of oligosaccharides with prebiotic potential by crude enzyme preparation from *Bifidobacterium*. *Food Chemistry*, 367, 130696.
- Bull, A. T. (2000). Clean technology: industry and environment, a viable partnership. *Biologist (London, England)*, 47(2), 61-64.
- Bull, A. T., Goodfellow, M., Slater, J. H. (1992). Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annual Review of Microbiology*, 46(1), 219-246.
- Burnet, M. C., Dohnalkova, A. C., Neumann, A. P., Lipton, M. S., Smith, R. D., Suen, G., Callister, S. J. (2015). Evaluating models of cellulose degradation by *Fibrobacter succinogenes* S85. *PLoS One*, 10(12), e0143809.
- Burton, R. A., Gidley, M. J., Fincher, G. B. (2010). Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology*, 6(10), 724-732.
- Busse-Wicher, M., Grantham, N. J., Lyczakowski, J. J., Nikolovski, N., Dupree, P. (2016). Xylan decoration patterns and the plant secondary cell wall molecular architecture. *Biochemical Society Transactions*, 44(1), 74-78.
- Byun, S. M., Nahm, B. H. (1978). Production of fructose from Jerusalem artichoke by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Science*, 43(6), 1871-1873.
- Callaghan, T. M., Podmirseg, S. M., Hohlweck, D., Edwards, J. E., Puniya, A. K., Dagar, S. S., Griffith, G. W. (2015). *Buwchfawromyceseastonii* gen. nov., sp. nov.: a new anaerobic fungus (Neocallimastigomycota) isolated from buffalo faeces. *Mycology*, 9, 11.

- Cano, M. E., García-Martin, A., Comendador Morales, P., Wojtusik, M., Santos, V. E., Kovensky, J., Ladero, M. (2020). Production of oligosaccharides from agrofood wastes. *Fermentation*, 6(1), 31.
- Cao, J. W., Deng, Q., Gao, D. Y., He, B., Yin, S. J., Qian, L. C., ...Wang, Q. (2021). A novel bifunctional glucanase exhibiting high production of glucose and cellobiose from rumen bacterium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 136-145.
- Carpita, N. C. (1996). Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual Review of Plant Biology*, 47(1), 445-476.
- Carpita, N. C., Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3(1), 1-30.
- Chang, J., Park, H. (2020). Nucleotide and protein researches on anaerobic fungi during four decades. *Journal of Animal Science and Technology*, 62(2), 121.
- Chaudhary, R., Kuthiala, T., Singh, G., Rarotra, S., Kaur, A., Arya, S. K., Kumar, P. (2021). Current status of xylanase for biofuel production: a review on classification and characterization. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-19.
- Chebli, Y., Bidhendi, A. J., Kapoor, K., Geitmann, A. (2021). Cytoskeletal regulation of primary plant cell wall assembly. *Current Biology*, 31(10), R681-R695.
- Chen, H. L., Chen, Y. C., Lu, M. Y. J., Chang, J. J., Wang, H. T. C., Ke, H. M., ...Li, W. H. (2012). A highly efficient β -glucosidase from the buffalo rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* W5. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 1-10.
- Chen, H. U. I. Z. H. O. N. G., Li, X. I. N. L. I. A. N. G., Ljungdahl, L. G. (1994). Isolation and properties of an extracellular beta-glucosidase from the polycentric rumen fungus *Orpinomyces* sp. strain PC-2. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1), 64-70.
- Chen, H., Li, X. L., Blum, D. L., Ximenes, E. A., Ljungdahl, L. G. (2003). CelF of *Orpinomyces* PC-2 has an intron and encodes a cellulase (CelF) containing a carbohydrate-binding module. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 775-785). Humana Press, Totowa, NJ.
- Chen, H., Li, X. L., Ljungdahl, L. G. (1997). Sequencing of a 1, 3-1, 4-beta-D-glucanase (lichenase) from the anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2: properties of the enzyme expressed in *Escherichia coli* and evidence that the gene has a bacterial origin. *Journal of bacteriology*, 179(19), 6028-6034.
- Chen, Y. C., Chen, W. T., Liu, J. C., Tsai, L. C., Cheng, H. L. (2014). A highly active beta-glucanase from a new strain of rumen fungus *Orpinomyces* sp. Y102 exhibits cellobiohydrolase and cellotriohydrolase activities. *Bioresource Technology*, 170, 513-521.

- Chen, Y. C., Chiang, Y. C., Hsu, F. Y., Tsai, L. C., Cheng, H. L. (2012). Structural modeling and further improvement in pH stability and activity of a highly-active xylanase from an uncultured rumen fungus. *Bioresource Technology*, 123, 125-134.
- Chen, Y. C., Hseu, R. S., Cheng, K. J. (2003). The genetic similarity of different generations of *Neocallimastix frontalis* SK. *FEMS Microbiology Letters*, 221(2), 227-231.
- Cheng, K. J., Akin, D. E., Costerton, J. W. (1977). Rumen bacteria: interaction with particulate dietary components and response to dietary variation. In *Federation proceedings* (Vol. 36, No. 2, pp. 193-197).
- Cheng, K. J., Forsberg, C. W., Minato, H., Costerton, J. W. (1991). Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. In *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants* (pp. 595-624). Academic Press.
- Cheng, Y. F., Edwards, J. E., Allison, G. G., Zhu, W. Y., Theodorou, M. K. (2009). Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in consecutive batch culture. *Bioresource Technology*, 100(20), 4821-4828.
- Cheng, Y. S., Chen, C. C., Huang, C. H., Ko, T. P., Luo, W., Huang, J. W., ...Guo, R. T. (2014). Structural analysis of a glycoside hydrolase family 11 xylanase from *Neocallimastix patriciarum*: insights into the molecular basis of a thermophilic enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 289(16), 11020-11028.
- Cheng, Y. S., Chen, C. C., Huang, J. W., Ko, T. P., Huang, Z., Guo, R. T. (2015). Improving the catalytic performance of a GH11 xylanase by rational protein engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(22), 9503-9510.
- Chi, Z. M., Zhang, T., Cao, T. S., Liu, X. Y., Cui, W., Zhao, C. H. (2011). Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. *Bioresource Technology*, 102(6), 4295-4303.
- Cho, K. K., Kim, S. C., Woo, J. H., Bok, J. D., Choi, Y. J. (2000). Molecular cloning and expression of a novel family A endoglucanase gene from *Fibrobacter succinogenes* S85 in *Escherichia coli*. *Enzyme and microbial technology*, 27(7), 475-481.
- Choudhury, P. K., Salem, A. Z. M., Jena, R., Kumar, S., Singh, R., Puniya, A. K. (2015). Rumen microbiology: An overview. *Rumen Microbiology: from evolution to revolution*, 3-16.
- Chung, K. T., vBryant, M. P. (1997). Robert E. Hungate: pioneer of anaerobic microbial ecology. *Anaerobe*, 3(4), 213-217.
- Ciolacu, D. E., Suflet, D. M. (2018). Cellulose-based hydrogels for medical/pharmaceutical applications. In *Biomass as renewable raw material to obtain bioproducts of high-tech value* (pp. 401-439). Elsevier.

- Ciura, K., Dziomba, S., Nowakowska, J.,Markuszewski, M. J. (2017). Thin layer chromatography in drug discovery process. *Journal of Chromatography A*, 1520, 9-22.
- Coleman, G. S. (1975). The interrelationship between rumen ciliate protozoa and bacteria. *Digestion and Metabolism in the Ruminant*.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G.,Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), 86-95.
- Cotta, M. A.,Whitehead, T. R. (1993). Regulation and cloning of the gene encoding amylase activity of the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1), 189-196.
- Cotta, M. A.,Whitehead, T. R. (1998). Xylooligosaccharide utilization by the ruminal anaerobic bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Current Microbiology*, 36(4), 183-189.
- Cotta, M. A.,Zeltwanger, R. L. (1995). Degradation and utilization of xylan by the ruminal bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Selenomonas ruminantium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), 4396-4402.
- Couger, M. B., Youssef, N. H., Struchtemeyer, C. G., Liggenstoffer, A. S.,Elshahed, M. S. (2015). Transcriptomic analysis of lignocellulosic biomass degradation by the anaerobic fungal isolate *Orpinomyces* sp. strain C1A. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 1-17.
- Cragg, S. M., Beckham, G. T., Bruce, N. C., Bugg, T. D., Distel, D. L., Dupree, P., ...Zimmer, M. (2015). Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. *Current opinion in Chemical Biology*, 29, 108-119.
- Çömlekçioğlu, U., Özköse, E., Akyol, I., Yazdic, F. C., Ekinci, M. S. (2011). Expression of β -(1, 3-1, 4)-glucanase gene of *Orpinomyces* sp. GMLF18 in *Escherichia coli* EC1000 and *Lactococcus lactis* subsp. cremoris MG1363. *Turkish Journal of Biology*, 35(4), 405-414.
- Çömlekçioğlu, U., (2009). *Rumen funguslarının izolasyonu ve bu funguslara ait enzim genleri üzerine moleküler çalışmalar*.Doktora Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş, 59-84.
- Çömlekçioğlu, U., Akyol, İ., Bülent, K., Özköse, E.,Ekinci, M. S. (2008). Anaerobik rumen funguslarının izolasyonu, tanımlanması ve kültür koleksiyonunun oluşturulması. *Hayvansal Üretim*, 49(2).
- Çömlekçioğlu, U., Ozkose, E., Tutus, A., Akyol, I.,Ekinci, M. S. (2010). Cloning and characterization of cellulase and xylanase coding genes from anaerobic fungus *Neocallimastix* sp. GMLF1. *Int J Agric Biol*, 12(5), 691-696.
- Da Silva, R. R., Pedezzi, R.,Souto, T. B. (2017). Exploring the bioprospecting and biotechnological potential of white-rot and anaerobic *Neocallimastigomycota*

- fungi: peptidases, esterases, and lignocellulolytic enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(8), 3089-3101.
- Dagar, S. S., Kumar, S., Griffith, G. W., Edwards, J. E., Callaghan, T. M., Singh, R., ... Puniya, A. K. (2015). A new anaerobic fungus (*Oontomyces anksri* gen. nov., sp. nov.) from the digestive tract of the Indian camel (*Camelus dromedarius*). *Fungal Biology*, 119(8), 731-737.
- Dai, J. Y., Guan, W. T., Xiu, Z. L. (2020). Bioconversion of inulin to 2, 3-butanediol by a newly isolated *Klebsiella pneumoniae* producing inulinase. *Process Biochemistry*, 98, 247-253.
- Das, D., Bhat, R., Selvaraj, R. (2020). Optimization of inulinase production by a newly isolated *Penicillium amphipolaria* strain using solid-state fermentation of hardy sugarcane stems. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30, 101875.
- Das, D., Selvaraj, R., Bhat, M. R. (2019). Optimization of inulinase production by a newly isolated strain *Aspergillus flavus* var. *flavus* by solid state fermentation of *Saccharum arundinaceum*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101363.
- Davies, D. R., Theodorou, M. K., Lawrence, M. I., Trinci, A. P. (1993). Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces. *Microbiology*, 139(6), 1395-1400.
- Davies, G., Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853-859.
- de Freitas, C., Terrone, C. C., Masarin, F., Carmona, E. C., Brienzo, M. (2021). In vitro study of the effect of xylooligosaccharides obtained from banana pseudostem xylan by enzymatic hydrolysis on probiotic bacteria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33, 101973.
- de Moura, F. A., Macagnan, F. T., da Silva, L. P. (2015). Oligosaccharide production by hydrolysis of polysaccharides: a review. *International Journal of Food Science Technology*, 50(2), 275-281.
- Dehnavi, E., Moeini, S., Akbarzadeh, A., Dabirmanesh, B., Siadat, S. O. R., Khajeh, K. (2019). Improvement of *Selenomonas ruminantium* β -xylosidase thermal stability by replacing buried free cysteines via site directed mutagenesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 352-358.
- Dehnavi, E., Siadat, S. O. R., Roudsari, M. F., Khajeh, K. (2016). Cloning and high-level expression of β -xylosidase from *Selenomonas ruminantium* in *Pichia pastoris* by optimizing of pH, methanol concentration and temperature conditions. *Protein Expression and Purification*, 124, 55-61.
- Dehority, B. A. (1998). Microbial interactions in the rumen. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 15, 69-86.

- Dehority, B. A., Tirabasso, P. A., Grifo Jr, A. P. (1989). Most-probable-number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(11), 2789-2792.
- Denman, S., Xue, G. P., Patel, B. (1996). Characterization of a *Neocallimastix patriciarum* cellulase cDNA (celA) homologous to *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(6), 1889-1896.
- Diao, Q., Zhang, R., Fu, T. (2019). Review of strategies to promote rumen development in calves. *Animals*, 9(8), 490.
- Dias, J., Marcondes, M. I., Noronha, M. F., Resende, R. T., Machado, F. S., Mantovani, H. C., ...Suen, G. (2017). Effect of pre-weaning diet on the ruminal archaeal, bacterial, and fungal communities of dairy calves. *Frontiers in microbiology*, 8, 1553.
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl*, 3(3), S30-S37.
- Difford, G. F., Plichta, D. R., Løvendahl, P., Lassen, J., Noel, S. J., Højberg, O., ...Sahana, G. (2018). Host genetics and the rumen microbiome jointly associate with methane emissions in dairy cows. *PLoS genetics*, 14(10), e1007580.
- Dijkerman, R., Vervuren, M. B., Op Den Camp, H. J., Van der Drift, C. (1996). Adsorption characteristics of cellulolytic enzymes from the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 on microcrystalline cellulose. *Applied and environmental microbiology*, 62(1), 20-25.
- Dilokpimol, A., Mäkelä, M. R., Varriale, S., Zhou, M., Cerullo, G., Gidijala, L., ...de Vries, R. P. (2018). Fungal feruloyl esterases: Functional validation of genome mining based enzyme discovery including uncharacterized subfamilies. *New biotechnology*, 41, 9-14.
- Dodd, D., Kiyonari, S., Mackie, R. I., Cann, I. K. (2010). Functional diversity of four glycoside hydrolase family 3 enzymes from the rumen bacterium *Prevotella bryantii* B14. *Journal of Bacteriology*, 192(9), 2335-2345.
- Dollhofer, V., Callaghan, T. M., Dorn-In, S., Bauer, J., Lebuhn, M. (2016). Development of three specific PCR-based tools to determine quantity, cellulolytic transcriptional activity and phylogeny of anaerobic fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 127, 28-40.
- Dollhofer, V., Dandikas, V., Dorn-In, S., Bauer, C., Lebuhn, M., Bauer, J. (2018). Accelerated biogas production from lignocellulosic biomass after pre-treatment with *Neocallimastix frontalis*. *Bioresource Technology*, 264, 219-227.
- Dollhofer, V., Podmirseg, S. M., Callaghan, T. M., Griffith, G. W., Fliegerová, K. (2015). Anaerobic fungi and their potential for biogas production. *Biogas science and technology*, 41-61.

- Dore, J., Stahl, D. A. (1991). Phylogeny of anaerobic rumen Chytridiomycetes inferred from small subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *Canadian Journal of Botany*, 69(9), 1964-1971.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1987). *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue* (No. RESEARCH).
- Drackley, J. K. (2008). Calf nutrition from birth to breeding. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(1), 55-86.
- Durand, R., Rasclé, C., Fischer, M., Fevre, M. (1997). Transient expression of the β -glucuronidase gene after biolistic transformation of the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Current genetics*, 31(2), 158-161.
- Ebringerová, A. (2005, December). Structural diversity and application potential of hemicelluloses. In *Macromolecular symposia* (Vol. 232, No. 1, pp. 1-12). Weinheim: WILEY-VCH Verlag.
- Efstathiou, I., Reyssset, G., Truffaut, N. (1986). A study of inulinase activity in the *Clostridium acetobutylicum* strain ABKn8. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25(2), 143-149.
- Ehrmann, M. A., Korakli, M., Vogel, R. F. (2003). Identification of the gene for β -fructofuranosidase of *Bifidobacterium lactis* DSM10140T and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Current microbiology*, 46(6), 0391-0397.
- Eijssink, V. G., Bjørk, A., Gåseidnes, S., Sirevåg, R., Synstad, B., van den Burg, B., Vriend, G. (2004). Rational engineering of enzyme stability. *Journal of Biotechnology*, 113(1-3), 105-120.
- Ekinci, M. S., Martin, J. C., Flint, H. J. (2002). Expression of a cellulase gene, *celA*, from the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* in *Streptococcus bovis* by means of promoter fusions. *Biotechnology Letters*, 24(9), 735-741.
- Ekinci, M. S., McCrae, S. I., Flint, H. J. (1997). Isolation and overexpression of a gene encoding an extracellular beta-(1, 3-1, 4)-glucanase from *Streptococcus bovis* JB1. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 3752-3756.
- Ekinci, M. S., Özcan, N., Özköse, E., Flint, H. J. (2001). A study on cellulolytic and hemicellulolytic enzymes of anaerobic rumen bacterium *Ruminococcus flavefaciens* strain 17. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25(5), 703-709.
- Elshahed, M. S., Hanafy, R. A., Cheng, Y., Dagar, S. S., Edwards, J. E., Flad, V., ... Youssef, N. H. (2022). Characterization and rank assignment criteria for the anaerobic fungi (Neocallimastigomycota). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(7), 005449.

- Elyachioui, M., Hornez, J. P., Tailliez, R. (1992). General properties of extracellular bacterial inulinase. *Journal of Applied Bacteriology*, 73(6), 514-519.
- Emerson, E. L., Weimer, P. J. (2017). Fermentation of model hemicelluloses by *Prevotella* strains and *Butyrivibrio fibrisolvens* in pure culture and in ruminal enrichment cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(10), 4269-4278.
- Ettalibi, M., Baratti, J. C. (1987). Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26(1), 13-20.
- Fachrial, E., Ginting, R. I., Harmileni, H., Lister, I. N. E., Saryono, S., Nugroho, T. T. (2021, July). Isolation and molecular identification of inulinase producing thermophilic bacteria from geothermal hot spring. In *2021 IEEE International Conference on Health, Instrumentation Measurement, and Natural Sciences (InHeNce)* (pp. 1-6). IEEE.
- Fan, M. Z., Wang, W., Cheng, L., Chen, J., Fan, W., Wang, M. (2021). Metagenomic discovery and characterization of multi-functional and monomolecular processive endoglucanases as biocatalysts. *Applied Sciences*, 11(11), 5150.
- Fanutti, C., Ponyi, T., Black, G. W., Hazlewood, G. P., Gilbert, H. J. (1995). The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. *Journal of Biological Chemistry*, 270(49), 29314-29322.
- Fifendy, M., Yuni, A., Kurniati, L., Indriati, G. (2021, June). Isolation and characterization of inulinase producing bacteria *Dahlia hybrida* hort. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1940, No. 1, p. 012048). IOP Publishing.
- Firkins, J. L., Yu, Z., Park, T., Plank, J. E. (2020). Extending Burk Dehority's perspectives on the role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontiers in Microbiology*, 11, 123.
- Fischer, M., Durand, R., Fèvre, M. (1995). Characterization of the "promoter region" of the enolase-encoding gene enol from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: sequence and promoter analysis. *Current Genetics*, 28(1), 80-86.
- Fleming, S. E., Groot Wassink, J. W., Murray, E. D. (1979). Preparation of high-fructose syrup from the tubers of the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 12(1), 1-28.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut microbes*, 3(4), 289-306.
- Fontana, J. D., Baron, M., Diniz, A. C., Franco, V. C. (1994/a). Microbial inulinase secretion using chemically modified inulins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45(1), 257-268.

- Fontana, J. D., Fo, S. A., Rogelin, R., Kaiss, J., Hauly, M. C. O., Franco, V. C., Baron, M. (1994/b). PCR protocol-and inulin catabolism-based differentiation of inulinolytic soil bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45(1), 269-282.
- Franck, A. (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(S2), S287-S291.
- Fraser, D., Milligan, B. N., Pajor, E. A., Phillips, P. A., Taylor, A. A., Weary, D. M. (1998). Behavioural perspectives on weaning in domestic pigs. *Progress in Pig Science*.
- Fregulia, P., Cedrola, F., Bordim, S., D'Agosto, M., Dias, R. J. P. (2020). Morphological and morphometric characterization of *eodinium posteroovesiculatum* (*Ciliophora*, Ophryoscolecidae) in Brazilian cattle. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 63.
- Friedersdorff, J. C., Kingston-Smith, A. H., Pachebat, J. A., Cookson, A. R., Rooke, D., Creevey, C. J. (2020). The isolation and genome sequencing of five novel bacteriophages from the rumen active against *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Frontiers in Microbiology*, 1588.
- Fushinobu, S., Ito, K., Konno, M., Wakagi, T., Matsuzawa, H. (1998). Crystallographic and mutational analyses of an extremely acidophilic and acid-stable xylanase: biased distribution of acidic residues and importance of Asp37 for catalysis at low pH. *Protein Engineering*, 11(12), 1121-1128.
- Gainvors, A., Frezier, V., Lemaesquier, H., Lequart, C., Aigle, M., Belarbi, A. (1994). Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast*, 10(10), 1311-1319.
- Gao, W., Bao, Y., Liu, Y., Zhang, X., Wang, J., An, L. (2009). Characterization of thermo-stable endoinulinase from a new strain *Bacillus smithii* T7. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(3), 498-506.
- García, J. J., Bartolomé, D. J., Posado, R., Zúñiga, J. A., Montañés, M. (2018). Weather conditions and rumen temperature and pH in lidia cattle. *J. Vet. Sci. Technol*, 9(532), 10-4172.
- Germec, M., Turhan, I. (2020). Partial purification and characterization of *Aspergillus niger* inulinase produced from sugar-beet molasses in the shaking incubator and stirred-tank bioreactors. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 3789-3799.
- Germec, M., Turhan, I. (2021). Kinetic modeling and sensitivity analysis of inulinase production in large-scale stirred tank bioreactor with sugar beet molasses-based medium. *Biochemical Engineering Journal*, 176, 108201.
- 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. *Molecular microbiology*, 6(15), 2065-2072.

- Gilbert, R. A., Klieve, A. V. (2015). Ruminant viruses (bacteriophages, archaeophages). In *Rumen microbiology: From evolution to revolution* (pp. 121-141). Springer, New Delhi.
- Gille, S., Cheng, K., Skinner, M. E., Liepman, A. H., Wilkerson, C. G., Pauly, M. (2011). Deep sequencing of voodoo lily (*Amorphophallus konjac*): an approach to identify relevant genes involved in the synthesis of the hemicellulose glucomannan. *Planta*, 234(3), 515-526.
- Glass, N. L., Schmoll, M., Cate, J. H., Coradetti, S. (2013). Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annual review of microbiology*, 67, 477-498.
- Goel, G., Dagar, S. S., Raghav, M., Bansal, S. (2015). Rumen: an underutilised niche for industrially important enzymes. In *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution* (pp. 247-263). Springer, New Delhi.
- Gold, J. J., Heath, I. B., Bauchop, T. (1988). Ultrastructural description of a new chytrid genus of caecum anaerobe, *Caecomycetes equi* gen. nov., sp. nov., assigned to the Neocallimastixaceae. *Biosystems*, 21(3-4), 403-415.
- Gomez de Segura, B., Durand, R., Fèvre, M. (1998). Multiplicity and expression of xylanases in the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Microbiology Letters*, 164(1), 47-53.
- Gomez de Segura, B., Fèvre, M. (1993). Purification and characterization of two 1, 4-beta-xylan endohydrolases from the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11), 3654-3660.
- Gordon, G. L. R., Phillips, M. W. (1992). Extracellular pectin lyase produced by *Neocallimastix* sp. LM1, a rumen anaerobic fungus. *Letters in Applied Microbiology*, 15(3), 113-115.
- Gordon, G. L., Phillips, M. W. (1998). The role of anaerobic gut fungi in ruminants. *Nutrition Research Reviews*, 11(1), 133-168.
- Gruninger, R. J., Puniya, A. K., Callaghan, T. M., Edwards, J. E., Youssef, N., Dagar, S. S., ... Elshahed, M. S. (2014). Anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), 1-17.
- Gruppen, H., Hoffmann, R. A., Kormelink, F. J., Voragen, A. G., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. (1992). Characterisation by ¹H NMR spectroscopy of enzymically derived oligosaccharides from alkali-extractable wheat-flour arabinoxylan. *Carbohydrate Research*, 233, 45-64.
- Gu, J., Mao, B., Cui, S., Tang, X., Liu, Z., Zhao, J., Zhang, H. (2022). Bifidobacteria exhibited stronger ability to utilize fructooligosaccharides, compared with other bacteria in the mouse intestine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(6), 2413-2423.

- Guo, W., Zhou, M., Ma, T., Bi, S., Wang, W., Zhang, Y., ...Long, R. (2020). Survey of rumen microbiota of domestic grazing yak during different growth stages revealed novel maturation patterns of four key microbial groups and their dynamic interactions. *Animal Microbiome*, 2(1), 1-20.
- Guo, Z. W., Ni, Z. F., Zong, M. H., Lou, W. Y. (2022). Modular metabolic engineering of *Bacillus licheniformis* for efficient 2, 3-Butanediol production by consolidated bioprocessing of *Jerusalem artichoke* Tubers. *ACS Sustainable ChemistryEngineering*, 10(29), 9624-9634.
- Gupta, R., Gupta, K., Saxena, R. K., Khan, S. (1999). Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 21(2), 135-138.
- Hackmann, T. J., Spain, J. N. (2010). Invited review: ruminant ecology and evolution: perspectives useful to ruminant livestock research and production. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1320-1334.
- Haemmerli, S. D., Leisola, M. S., Fiechter, A. (1986). Polymerisation of lignins by ligninases from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters*, 35(1), 33-36.
- Hagen, L. H., Brooke, C. G., Shaw, C. A., Norbeck, A. D., Piao, H., Arntzen, M. Ø., ...Hess, M. (2021). Proteome specialization of anaerobic fungi during ruminal degradation of recalcitrant plant fiber. *The ISME Journal*, 15(2), 421-434.
- Haitjema, C. H., Gilmore, S. P., Henske, J. K., Solomon, K. V., De Groot, R., Kuo, A., ...O'malley, M. A. (2017). A parts list for fungal cellulosomes revealed by comparative genomics. *Nature Microbiology*, 2(8), 1-8.
- Haki, G. D., Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89(1), 17-34.
- Hall, M. B., Weimer, P. J. (2016). Divergent utilization patterns of grass fructan, inulin, and other nonfiber carbohydrates by ruminal microbes. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 245-257.
- Hamlin, L. J., Hungate, R. E. (1956). Culture and physiology of a starch-digesting bacterium (*Bacteroides amylophilus* n. sp.) from the bovine rumen. *Journal of Bacteriology*, 72(4), 548-554.
- Han, N., Miao, H., Ding, J., Li, J., Mu, Y., Zhou, J., Huang, Z. (2017). Improving the thermostability of a fungal GH11 xylanase via site-directed mutagenesis guided by sequence and structural analysis. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 1-12.
- Hanafy, R. A., Dagar, S. S., Griffith, G. W., Pratt, C. J., Youssef, N. H., Elshahed, M. S. (2022). Taxonomy of the anaerobic gut fungi (Neocallimastigomycota): a review of classification criteria and description of current taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(7), 005322.

- Hanafy, R. A., Elshahed, M. S., Liggenstoffer, A. S., Griffith, G. W., Youssef, N. H. (2017). *Pecoramyces ruminantium*, gen. nov., sp. nov., an anaerobic gut fungus from the feces of cattle and sheep. *Mycologia*, 109(2), 231-243.
- Hanafy, R. A., Elshahed, M. S., Youssef, N. H. (2018). *Feramyces austinii*, gen. nov., sp. nov., an anaerobic gut fungus from rumen and fecal samples of wild Barbary sheep and fallow deer. *Mycologia*, 110(3), 513-525.
- Hanafy, R. A., Lanjekar, V. B., Dhakephalkar, P. K., Callaghan, T. M., Dagar, S. S., Griffith, G. W., ...Youssef, N. H. (2020). Seven new Neocallimastigomycota genera from wild, zoo-housed, and domesticated herbivores greatly expand the taxonomic diversity of the phylum. *Mycologia*, 112(6), 1212-1239.
- Hanafy, R. A., Lanjekar, V. B., Dhakephalkar, P. K., Callaghan, T. M., Dagar, S. S., Griffith, G. W., ... Youssef, N. H. (2019). Seven new Neocallimastigomycota genera from fecal samples of wild, zoo-housed, and domesticated herbivores: Description of *Ghazallomyces constrictus* gen. nov., sp. nov., *Aklioshbomyces papillarum* gen. nov., sp. nov., *Agriosomyces longus* gen. nov., sp. nov., *Capellomyces foraminis* gen. nov., sp. nov. and *Capellomyces elongatus* sp. nov., *Joblinomyces apicalis* gen. nov., sp. nov., *Khoyollomyces ramosus* gen. nov., sp. nov., and *Tahromyces munnarensis* gen. nov., sp. nov. *bioRxiv*, 642694.
- Hanafy, R. A., Youssef, N. H., 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*.
- Haraguchi, K., Hayashi, K., Kasumi, T. (1990). Purification and properties of inulinase from *Arthrobacter globiformis* S64—1. *Starch-Stärke*, 42(1), 28-30.
- Hardie, J. M. (1984). Oral streptococci. *Bergey's manual of Systematic bacteriology* Vol. 2, 602-631.
- Harhangi, H. R., Akhmanova, A. S., Emmens, R., van der Drift, C., de Laat, W. T., van Dijken, J. P., ...Op den Camp, H. J. (2003). Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 follows the bacterial pathway. *Archives of Microbiology*, 180(2), 134-141.
- Harholt, J., Suttangkakul, A., Vibe Scheller, H. (2010). Biosynthesis of pectin. *Plant Physiology*, 153(2), 384-395.
- Hartinger, T., Zebeli, Q. (2021). The present role and new potentials of anaerobic fungi in ruminant nutrition. *Journal of Fungi*, 7(3), 200.
- Hayashi, H., Takagi, K. I., Fukumura, M., Kimura, T., Karita, S., Sakka, K., Ohmiya, K. (1997). Sequence of *xynC* and properties of *XynC*, a major component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *Journal of bacteriology*, 179(13), 4246-4253.

- Hazlewood, G. P., Davidson, K., Laurie, J. I., Romaniec, M. P., Gilbert, H. J. (1990). Cloning and sequencing of the *celA* gene encoding endoglucanase A of *Butyrivibrio fibrisolvens* strain A46. *Microbiology*, 136(10), 2089-2097.
- He, L., Zhang, R., Shen, J., Miao, Y., Zeng, C., Tang, X., ...Huang, Z. (2022). Improving the low-temperature properties of an exo-inulinase via the deletion of a loop fragment located in its catalytic pocket. *Electronic Journal of Biotechnology*, 55, 1-8.
- Heath, I. B. (1988). Recommendations for future taxonomic studies of gut fungi. *BioSystems*, 21(3-4), 417-418.
- Heath, I. B., Bauchop, T., Skipp, R. A. (1983). Assignment of the rumen anaerobe *Neocallimastix frontalis* to the Spizellomycetales (Chytridiomycetes) on the basis of its polyflagellate zoospore ultrastructure. *Canadian Journal of Botany*, 61(1), 295-307.
- Heath, I. B., Kaminskyj, S. G., Bauchop, T. (1986). Basal body loss during fungal zoospore encystment: evidence against centriole autonomy. *Journal of Cell Science*, 83(1), 135-140.
- Hébraud, M., Fèvre, M. (1988). Characterization of glycoside and polysaccharide hydrolases secreted by the rumen anaerobic fungi *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* and *Piromonas communis*. *Microbiology*, 134(5), 1123-1129.
- Hebraud, M., Fèvre, M. (1990/a). Purification and characterization of an aspecific glycoside hydrolase from the anaerobic ruminal fungus *Neocallimastix frontalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(10), 3164-3169.
- Hebraud, M., Fèvre, M. (1990/b). Purification and characterization of an extracellular β -xylosidase from the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS microbiology letters*, 72(1-2), 11-16.
- Hefford, M. A., Kobayashi, Y., Allard, S. E., Forster, R. J., Teather, R. M. (1997). Sequence analysis and characterization of pOM1, a small cryptic plasmid from *Butyrivibrio fibrisolvens*, and its use in construction of a new family of cloning vectors for *Butyrivibrios*. *Applied and environmental microbiology*, 63(5), 1701-1711.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280(2), 309-316.
- Henske, J. K., Gilmore, S. P., Haitjema, C. H., Solomon, K. V., O'Malley, M. A. (2018/a). Biomass-degrading enzymes are catabolite repressed in anaerobic gut fungi. *AIChE Journal*, 64(12), 4263-4270.
- Henske, J. K., Wilken, S. E., Solomon, K. V., Smallwood, C. R., Shutthanandan, V., Evans, J. E., ...O'Malley, M. A. (2018/b). Metabolic characterization of anaerobic fungi provides a path forward for bioprocessing of crude lignocellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(4), 874-884.

- Hespell, R. B., Akin, D. E., Dehority, B. A., Mackie, R., White, B., Isaacson, R. (1997). Bacteria, fungi, and protozoa of the rumen. *Mackie RI, White BA, Isaacson RE. Gastrointestinal Microbiology. Chapman and Hall, New York.*
- Hespell, R. B., Whitehead, T. R. (1990). Physiology and genetics of xylan degradation by gastrointestinal tract bacteria. *Journal of Dairy Science*, 73(10), 3013-3022.
- Hess, M., Paul, S. S., Puniya, A. K., Van der Giezen, M., Shaw, C., Edwards, J. E., Fliegerová, K. (2020). Anaerobic fungi: past, present, and future. *Frontiers in Microbiology*, 2621.
- Heuermann, K., Cosgrove, J. (2001). S-Gal™: An autoclavable dye for color selection of cloned dna inserts. *Biotechniques*, 30(5), 1142-1147.
- Heyer, A. G., Schroeder, B., Radosta, S., Wolff, D., Czapla, S., Springer, J. (1998). Structure of the enzymatically synthesized fructan inulin. *Carbohydrate Research*, 313(3-4), 165-174.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ...Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509-547.
- Hill, J., McSweeney, C., Wright, A. D. G., Bishop-Hurley, G., Kalantar-Zadeh, K. (2016). Measuring methane production from ruminants. *Trends in Biotechnology*, 34(1), 26-35.
- Himmel, M. E., Adney, W. S., Baker, J. O., Nieves, R. A., Thomas, S. R. (2018). Cellulases: structure, function, and applications. In *Handbook on Bioethanol* (pp. 143-161). Routledge.
- Ho, Y. W., Abdullah, N., Jalaludin, S. (1994). *Orpinomyces intercalaris*, a new species of polycentric anaerobic rumen fungus from cattle. *Mycotaxon*, 50, 139-150.
- Ho, Y. W., Abdullah, N., Jalaludin, S. (1988). Penetrating structures of anaerobic rumen fungi in cattle and swamp buffalo. *Microbiology*, 134(1), 177-181.
- Ho, Y. W., Abdullah, N., Jalaludin, S. (2000). The diversity and taxonomy of anaerobic gut fungi. *Fungal Diversity*, 4, 37-51.
- Ho, Y. W., BARR, D. S., Abdullah, N., Jalaludin, S., Kudo, H. (1993). *Neocallimastix variabilis*, a new species of anaerobic fungus from the rumen of cattle. *Mycotaxon*, 46, 241-258.
- Ho, Y. W., Barr, D. J. S. (1995). Classification of anaerobic gut fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia. *Mycologia*, 87(5), 655-677.
- Ho, Y. W., Barr, D. S., Abdullah, N., Jalaludin, S., Kudo, H. (1993). *Neocallimastix variabilis*, a new species of anaerobic fungus from the rumen of cattle. *Mycotaxon*, 46, 241-258.

- Hobson, P. N., Wallace, R. J., Bryant, M. P. (1982). Microbial ecology and activities in the rumen: Part II. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 9(4), 253-320.
- Hodrova, B., Kopečný, J., Káš, J. (1998). Cellulolytic enzymes of rumen anaerobic fungi *Orpinomyces joyonii* and *Caecomyces communis*. *Research in microbiology*, 149(6), 417-427.
- Holdeman, L. V., Moore, W. E. C., Cato, E. P. (1977). Anaerobe laboratory manual.
- Holland, C., Ryden, P., Edwards, C. H., Grundy, M. M. L. (2020). Plant cell walls: Impact on nutrient bioaccessibility and digestibility. *Foods*, 9(2), 201.
- Hooker, C. A., Lee, K. Z., Solomon, K. V. (2019). Leveraging anaerobic fungi for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 59, 103-110.
- Hoshida, H., Kidera, K., Takishita, R., Fujioka, N., Fukagawa, T., Akada, R. (2018). Enhanced production of extracellular inulinase by the yeast *Kluyveromyces marxianus* in xylose catabolic state. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(6), 676-681.
- Houfani, A. A., Anders, N., Spiess, A. C., Baldrian, P., Benallaoua, S. (2020). Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars—a review. *Biomass and Bioenergy*, 134, 105481.
- Hu, L., Fang, X., Du, M., Luo, F., Guo, S. (2020). Hemicellulose-based polymers processing and application. *American Journal of Plant Sciences*, 11(12), 2066-2079.
- Hu, N., Yuan, B., Sun, J., Wang, S. A., Li, F. L. (2012). Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* strains representing potentials for bioethanol production from Jerusalem artichoke by consolidated bioprocessing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(5), 1359-1368.
- Hu, W., Liu, J., Chen, J. H., Wang, S. Y., Lu, D., Wu, Q. H., Li, W. J. (2014). A mutation of *Aspergillus niger* for hyper-production of citric acid from corn meal hydrolysate in a bioreactor. *Journal of Zhejiang University Science B*, 15(11), 1006-1010.
- Huang, Y. H., Huang, C. T., Hseu, R. S. (2005). Effects of dockerin domains on *Neocallimastix frontalis* xylanases. *FEMS Microbiology Letters*, 243(2), 455-460.
- Huang, J., Wang, G., Xiao, L. (2006). Cloning, sequencing and expression of the xylanase gene from a *Bacillus subtilis* strain B10 in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 97(6), 802-808.
- Huang, Y., Li, L., Chi, Y., Sha, Y., Wang, R., Xu, Z., ... Xu, H. (2021). Fusion and secretory expression of an exo-inulinase and ad-allulose 3-epimerase to produce d-allulose syrup from inulin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(2), 693-702.

- Huang, Y., Marden, J. P., Julien, C., Bayourthe, C. (2018). Redox potential: an intrinsic parameter of the rumen environment. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 102(2), 393-402.
- Hungate, R. E. (1944). Studies on cellulose fermentation: I. The culture and physiology of an anaerobic cellulose-digesting bacterium. *Journal of bacteriology*, 48(5), 499-513.
- Hungate, R. E. (1947). Studies on cellulose fermentation: III. The culture and isolation for cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle. *Journal of Bacteriology*, 53(5), 631-645.
- Hungate, R. E. (1950). The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 14(1), 1-49.
- Hungate, R. E. (1969). Chapter IV A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In *Methods in Microbiology* (Vol. 3, pp. 117-132). Academic Press.
- Hungate, R. E. (1979). Evolution of a microbial ecologist. *Annual Reviews in Microbiology*, 33(1), 1-21.
- Huntly, N. (1991). Herbivores and the dynamics of communities and ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 477-503.
- Huws, S. A., Kim, E. J., Cameron, S. J., Girdwood, S. E., Davies, L., Tweed, J., ...Scollan, N. D. (2015). Characterization of the rumen lipidome and microbiome of steers fed a diet supplemented with flax and echium oil. *Microbial biotechnology*, 8(2), 331-341.
- Imamura, L., Hisamitsu, K., Kobashi, K. (1994). Purification and characterization of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 17(5), 596-602.
- Inagaki, K., Nakahira, K., Mukai, K., Tamura, T., Tanaka, H. (1998). Gene cloning and characterization of an acidic xylanase from *Acidobacterium capsulatum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(6), 1061-1067.
- Irwin, D., Jung, E. D., Wilson, D. B. (1994). Characterization and sequence of a *Thermomonospora fusca* xylanase. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(3), 763-770.
- Itabashi, H. (2004). Recent topics in rumen microbiology with particular reference to animal production in Japan. *Microbes and environments*, 19(4), 270-275.
- Ivanova, V., Gavrilov, S., Pashkoulova, V. (2021). Purification of an exo-inulinase from *Bacillus* Sp. SG7. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 685-691.
- Jaichakan, P., Thongsook, T., Nakphaichit, M., Wattanasiritham, L. S., Phongthai, S., Pattarapisitporn, A., ...Klangpetch, W. (2022). Xylobiose and xylotriose

- production from alkali soluble defatted rice bran arabinoxylan using endoxylanase from *Neocallimastix partriciarum*. *starch-stärke*, 74(3-4), 2100177.
- Jain, J., Singh, B. (2016). Characteristics and biotechnological applications of bacterial phytases. *Process Biochemistry*, 51(2), 159-169.
- Janeček, Š., Mareček, F., MacGregor, E. A., Svensson, B. (2019). Starch-binding domains as CBM families—history, occurrence, structure, function and evolution. *Biotechnology Advances*, 37(8), 107451.
- Janssen, P. H., Kirs, M. (2008). Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3619-3625.
- Jayani, R. S., Saxena, S., Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931-2944.
- Jin, X., Meng, N., Xia, L. M. (2011). Expression of an endo- β -1, 4-glucanase gene from *Orpinomyces* PC-2 in *Pichia pastoris*. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(5), 3366-3380.
- Joblin, K. N. (1981). Isolation, enumeration, and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(6), 1119-1122.
- Joblin, K. N. (1989). Physical disruption of plant fibre by rumen fungi of the *Sphaeromonas* group. *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*, 259-260.
- Joblin, K. N. (1990). Bacterial and protozoal interactions with ruminal fungi. In *Proceedings of the Tri-National Workshop Microbial and Plant Opportunities to improve lignocellulose utilization by ruminants held in Athens, Georgia, April 30-May 4, 1990*. (pp. 311-324). Elsevier Science Publishing Co., Inc..
- Joblin, K. N., Naylor, G. E. (2002). The ruminal mycoplasmas: a review. *Journal of Applied Animal Research*, 21(2), 161-179.
- Joshi, A., Lanjekar, V. B., Dhakephalkar, P. K., Callaghan, T. M., Griffith, G. W., Dagar, S. S. (2018). *Liebetanzomyces polymorphus* gen. et sp. nov., a new anaerobic fungus (Neocallimastigomycota) isolated from the rumen of a goat. *MycoKeys*, (40), 89.
- Joshi, N., Sharma, M., Singh, S. P. (2020). Characterization of a novel xylanase from an extreme temperature hot spring metagenome for xylooligosaccharide production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 4889-4901.
- Kadam, K. L. (2018). Cellulase production. *Handbook on Bioethanol*, 213-252.
- Kala, A., Kamra, D. N., Chaudhary, L. C., Agarwal, N. (2019). Metagenomics and CAZymes in Rumen: a review. *Indian Journal of Animal Nutrition*, 36(1), 1-10.
- Kamra, D. N. (2005). Rumen microbial ecosystem. *Current science*, 124-135.

- Kang, S., Suzuki, R., Suzuki, Y., Koike, S., Nagashima, K., Kobayashi, Y. (2018). Rumen responses to dietary supplementation with cashew nut shell liquid and its cessation in sheep. *Animal Science Journal*, 89(11), 1549-1555.
- Kar, B., Özköse, E., Ekinçi, M. S. (2021). The comparisons of fatty acid composition in some anaerobic gut fungi *Neocallimastix*, *Orpinomyces*, *Piromyces*, and *Caecomyces*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93.
- Kar, B., (2013). *Anaerobik rumen funguslarının filogenetikanalizi ve lipit metabolizmasındaki rollerinin incelenmesi*. Doktora Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş, 130-133s.
- Karaman, A., Yücel, H., Ekinçi, K., Cömertpay, S. (2022). Comparing cellulotic enzyme activities of *Neocallimastix* sp. in Orpin's and Menke's media. *Mantar Dergisi*, 13(1), 55-61.
- Kasperowicz, A., Pristaš, P., Piknová, M., Javorský, P., Guczyńska, W., Michałowski, T., Kwiatkowska, E. (2010/a). Fructanolytic and saccharolytic enzymes of *Treponema zioleckii* strain kT. *Anaerobe*, 16(4), 387-392.
- Kasperowicz, A., Stan-Glasek, K., Guczynska, W., Piknova, M., Pristaš, P., Nigutova, K., ...Michałowski, T. (2010/b). Fructanolytic and saccharolytic enzymes of the rumen bacterium *Pseudobutyrvibrio ruminis* strain 3—preliminary study. *Folia microbiologica*, 55(4), 329-331.
- Kasperowicz, A., Stan-Glasek, K., Guczynska, W., Pristas, P., Javorsky, P., Vandzurova, A., Michałowski, T. (2012). β -Fructofuranosidase and sucrose phosphorylase of rumen bacterium *Pseudobutyrvibrio ruminis* strain 3. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 1271-1279.
- Kasperowicz, A., Stan-Glasek, K., Taciak, M., Michałowski, T. (2016). The fructanolytic abilities of the rumen bacterium *Butyrvibrio fibrisolvens* strain 3071. *Journal of Applied Microbiology*, 120(1), 29-40.
- Kaufhold, J., Hammon, H. M., Blum, J. W. (2000). Fructo-oligosaccharide supplementation: effects on metabolic, endocrine and hematological traits in veal calves. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 47(1), 17-29.
- Kaur, N., Kaur, M., Gupta, A. K., Singh, R. (1992). Properties of β -fructosidases (invertases and inulinases) of *Fusarium oxysporum* grown on an aqueous extract of *Cichorium intybus* roots. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, 53(3), 279-284.
- Kaur, P., Taggar, M. S., Kaur, J. (2020). Cellulolytic microorganisms: diversity and role in conversion of rice straw to bioethanol. *Cell. Chem. Technol*, 54, 613-634.
- Kelleci, B. M., Comlekcioglu, U. (2016). Production of amylolytic enzyme by rumen fungi, *Neocallimastix* sp. K7 and *Orpinomyces* sp. K5. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 26(1), 242-252.

- Kenters, N., Henderson, G., Jeyanathan, J., Kittelmann, S., Janssen, P. H. (2011). Isolation of previously uncultured rumen bacteria by dilution to extinction using a new liquid culture medium. *Journal of Microbiological Methods*, 84(1), 52-60.
- Keto, K., Araki, T., Kitamura, T., Morita, N., Moori, M., Suzuki, Y. (1999). Purification and properties of a thermostable inulinase (β -D-Fructan Fructohydrolase) from *Bacillus stearothermophilus* KP1289. *Starch-Stärke*, 51(7), 253-258.
- Khalili Ghadikolaie, K., Akbari Noghabi, K., Shahbani Zahiri, H. (2017). Development of a bifunctional xylanase-cellulase chimera with enhanced activity on rice and barley straws using a modular xylanase and an endoglucanase procured from camel rumen metagenome. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(18), 6929-6939.
- Khatun, M. M., Liu, C. G., Zhao, X. Q., Yuan, W. J., Bai, F. W. (2017). Consolidated ethanol production from Jerusalem artichoke tubers at elevated temperature by *Saccharomyces cerevisiae* engineered with inulinase expression through cell surface display. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(2), 295-301.
- Kim, M., Morrison, M., Yu, Z. (2011). Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiology Ecology*, 76(1), 49-63.
- Kirk, O., Borchert, T. V., Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345-351.
- Kleine, J., Liebl, W. (2006). Comparative characterization of deletion derivatives of the modular xylanase XynA of *Thermotoga maritima*. *Extremophiles*, 10(5), 373-381.
- Knob, A., Beitel, S. M., Fortkamp, D., Terrasan, C. R. F., Almeida, A. F. D. (2013). Production, purification, and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer's spent grain as substrate. *BioMed research international*, 2013.
- Kobayashi, Y. (2006). Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: need for basic and applied science. *Animal Science Journal*, 77(4), 375-385.
- Kobayashi, Y., Onodera, R. (1999). Application of molecular biology to rumen microbes-review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 12(1), 77-83.
- Kohl, K. D., Dearing, M. D. (2016). The woodrat gut microbiota as an experimental system for understanding microbial metabolism of dietary toxins. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1165.
- Koizumi, K., Utamura, T. (1981). Trityl Derivatives of Cellobiose. VII. Unusual Di-O-trityl Derivatives of Cellobiose. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 29(11), 3118-3123.

- Komsta, Ł., Skibiński, R., Berecka, A., Gumieniczek, A., Radkiewicz, B., Radoń, M. (2010). Revisiting thin-layer chromatography as a lipophilicity determination tool—A comparative study on several techniques with a model solute set. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(4), 911-918.
- Kopečný, J., Hodrová, B. (1995). Pectinolytic enzymes of anaerobic fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 20(5), 312-316.
- Krause, D. O., Nagaraja, T. G., Wright, A. D. G., Callaway, T. R. (2013). Board-invited review: rumen microbiology: leading the way in microbial ecology. *Journal of Animal Science*, 91(1), 331-341.
- Krause, D. O., Russell, J. B. (1996). How many ruminal bacteria are there?. *Journal of Dairy Science*, 79(8), 1467-1475.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713-3729.
- Kumar, S., Indugu, N., Vecchiarelli, B., Pitta, D. W. (2015/a). Associative patterns among anaerobic fungi, methanogenic archaea, and bacterial communities in response to changes in diet and age in the rumen of dairy cows. *Frontiers in Microbiology*, 6, 781.
- Kumar, V. S., Kalirajan, J. (2015/b). Cloning, gene expression and characterization of xylanase coding gene from mesophilic filamentous fungus *Trichoderma reesei* (Hypocreaceae) in *E. coli*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 9(4), 2921-2931.
- Kusmiyati, N., Sunarti, S., Wahyuningsih, T. D., Widodo, W. (2020). Inulinase activity of extracellular protein of *Lactobacillus casei* AP in different growth conditions. In *Key Engineering Materials* (Vol. 840, pp. 101-106). Trans Tech Publications Ltd.
- Kwon, M., Song, J., Park, H. S., Park, H., Chang, J. (2016). Characterization of heterologously expressed acetyl xylan esterase1 isolated from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis* PMA02. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(11), 1576.
- Lange, L., Barrett, K., Pilgaard, B., Gleason, F., Tsang, A. (2019). Enzymes of early-diverging, zoosporic fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(17), 6885-6902.
- Langer, P. (1988). *The mammalian herbivore stomach: comparative anatomy, function and evolution*. Gustav Fischer.
- Laowklom, N., Chantanaphan, R., Pinphanichakarn, P. (2012). Production, purification and characterization of inulinase from a newly isolated *Streptomyces* sp. CP01.

- Lapedes, A., Barnes, C., Burks, C., Farber, R., Sirotkin, K. (2018). Application of neural networks and other machine learning algorithms to DNA sequence analysis. In *Computers and DNA* (pp. 157-182). Routledge.
- Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J. M., Gillet, F., Pelloux, J., Rayon, C. (2015). Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants*, 4(1), 112-166.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (62), e3923.
- Lee, S. S., Choi, C. K., Ahn, B. H., Moon, Y. H., Kim, C. H., Ha, J. K. (2004). In vitro stimulation of rumen microbial fermentation by a rumen anaerobic fungal culture. *Animal Feed Science and Technology*, 115(3-4), 215-226.
- Lee, S. S., Ha, J. K., Cheng, K. J. (2001). The effects of sequential inoculation of mixed rumen protozoa on the degradation of orchard grass cell walls by anaerobic fungus *Anaeromyces mucronatus* 543. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(8), 754-760.
- Leedle, J. A., Bryant, M. P., Hespell, R. B. (1982). Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed low-or high-forage diets. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(2), 402-412.
- Leggieri, P. A., Kerdman-Andrade, C., Lankiewicz, T. S., Valentine, M. T., O'Malley, M. A. (2021). Non-destructive quantification of anaerobic gut fungi and methanogens in co-culture reveals increased fungal growth rate and changes in metabolic flux relative to mono-culture. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 1-16.
- Leng, L., Li, J., Yuan, X., Li, J., Han, P., Hong, Y., ... Zhou, W. (2018). Beneficial synergistic effect on bio-oil production from co-liquefaction of sewage sludge and lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 251, 49-56.
- Li, A. X., Guo, L. Z., Fu, Q., Lu, W. D. (2011). A simple and rapid plate assay for screening of inulin-degrading microorganisms using Lugol's iodine solution. *African Journal of Biotechnology*, 10(46), 9518-9521.
- Li, A. X., Guo, L. Z., Lu, W. D. (2012). Alkaline inulinase production by a newly isolated bacterium *Marinimicrobium* sp. LS-A18 and inulin hydrolysis by the enzyme. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 81-89.
- Li, C., Xue, S., Asano, A., Tajima, A., Ishikawa, N. (2018). Dynamic Changes of Main Rumen Microflora and Ruminal Fermentation in Sheep Supplemented with Molasses-Urea. *Journal of Rangeland Science*, 8(1), 1-10.
- Li, G. J., Hyde, K. D., Zhao, R. L., Hongsanan, S., Abdel-Aziz, F. A., Abdel-Wahab, M. A., ... Maharachchikumbura, S. S. (2016). Fungal diversity notes 253–366: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. *Fungal Diversity*, 78(1), 1-237.

- Li, X. L., Chen, H., Ljungdahl, L. G. (1997/a). Monocentric and polycentric anaerobic fungi produce structurally related cellulases and xylanases. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 628-635.
- Li, X. L., Chen, H., Ljungdahl, L. G. (1997/b). Two cellulases, CelA and CelC, from the polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2 contain N-terminal docking domains for a cellulase-hemicellulase complex. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4721-4728.
- Li, X. L., Skory, C. D., Ximenes, E. A., Jordan, D. B., Dien, B. S., Hughes, S. R., Cotta, M. A. (2007). Expression of an AT-rich xylanase gene from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain PC-2 in and secretion of the heterologous enzyme by *Hypocrea jecorina*. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(6), 1264-1275.
- Li, X. L., Ximenes, E. A., Chen, H., Cotta, M., & Ljungdahl, L. (2004). Cloning and sequencing of two highly homologous cellulase genes, CelH and CelI from the anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2. *Biotechnology of Lignocellulose Degradation and Biomass Utilization*. K. Ohmiya, K. Sakka, S. Karita, et al. Eds, 638-641.
- Li, X., Calza, R. E. (1991). Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the rumen fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. *Enzyme and Microbial Technology*, 13(8), 622-628.
- Li, Y., Jin, W., Cheng, Y., 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. *Current Microbiology*, 73(3), 434-441.
- Li, Y., Meng, Z., Xu, Y., Shi, Q., Ma, Y., Aung, M., ...Zhu, W. (2021). Interactions between anaerobic fungi and methanogens in the rumen and their biotechnological potential in biogas production from lignocellulosic materials. *Microorganisms*, 9(1), 190.
- Li, Y., Zhang, X., Lu, C., Lu, P., Yin, C., Ye, Z., Huang, Z. (2022). Identification and characterization of a novel endo- β -1, 4-xylanase from *Streptomyces* sp. t7 and its application in xylo-oligosaccharide production. *Molecules*, 27(8), 2516.
- Liang, J., Zhang, H., Zhang, P., Zhang, G., Cai, Y., Wang, Q., ...Zubair, M. (2021). Effect of substrate load on anaerobic fermentation of rice straw with rumen liquid as inoculum: Hydrolysis and acidogenesis efficiency, enzymatic activities and rumen bacterial community structure. *Waste Management*, 124, 235-243.
- Liebetanz, E. (1910). Die parasitischen protozoen des wiederkäuermagens. *Archiv für Protistenkunde*, 19, 19-80.
- Liu, J. C., Chang, W. J., Hsu, T. C., Chen, H. J., Chen, Y. C. (2020). Direct fermentation of cellulose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* displaying a bifunctional cellobiohydrolase gene from *Orpinomyces* sp. Y102. *Renewable Energy*, 159, 1029-1035.

- Liu, J. H., Selinger, B. L., Tsai, C. F., Cheng, K. J. (1999). Characterization of a *Neocallimastix patriciarum* xylanase gene and its product. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(11), 970-974.
- Liu, J. R., Duan, C. H., Zhao, X., Tzen, J. T., Cheng, K. J., Pai, C. K. (2008). Cloning of a rumen fungal xylanase gene and purification of the recombinant enzyme via artificial oil bodies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(2), 225-233.
- Liu, J. R., Yu, B., Lin, 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 Microbiology Letters*, 251(2), 233-241.
- Liu, J., Wang, J. K., Zhu, W., Pu, Y. Y., Guan, L. L., Liu, J. X. (2014). Monitoring the rumen pectinolytic bacteria *Treponema saccharophilum* using real-time PCR. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(3), 576-585.
- Liu, N., Li, H., Chevrette, M. G., Zhang, L., Cao, L., Zhou, H., ...Wang, Q. (2019). Functional metagenomics reveals abundant polysaccharide-degrading gene clusters and cellobiose utilization pathways within gut microbiota of a wood-feeding higher termite. *The ISME Journal*, 13(1), 104-117.
- Liu, Z., Wen, S., Wu, G., Wu, H. (2022). Heterologous expression and characterization of *Anaeromyces robustus* xylanase and its use in bread making. *European Food Research and Technology*, 1-14.
- Ljungdahl, L. G. (2008). The cellulase/hemicellulase system of the anaerobic fungus *Orpinomyces* PC-2 and aspects of its applied use. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 308-321.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research*, 42(D1), D490-D495.
- Lowe, S. E., Theodorou, M. K., Trinci, A. P. (1987). Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose, and xylan. *Applied and environmental microbiology*, 53(6), 1216-1223.
- Ma, J., Li, T., Tan, H., Liu, W., Yin, H. (2020). The important roles played in substrate binding of aromatic amino acids in exo-inulinase from *Kluyveromyces cicerisporus* CBS 4857. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 569797.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., (2010). Mikroorganizmaların biyolojisi (Editör: Çökmüş, C.). Palme Yayıncılık, Ankara, 992s.
- Magadum, D. B., Yadav, G. D. (2018). Fermentative production, purification of inulinase from *Aspergillus terreus* MTCC 6324 and its application for hydrolysis of sucrose. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 14, 293-299.
- Makrides, S. C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 60(3), 512-538.

- Mandel, M., Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of molecular biology*, 53(1), 159-162.
- Mann, S. P., Hazlewood, G. P., Orpin, C. G. (1986). Characterization of a cryptic plasmid (p0M1) in *Butyrivibrio fibrisolvens* by restriction endonuclease analysis and its cloning in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, 13(1), 17-22.
- Mansora, A. M., Lima, J. S., Anib, F. N., Hashima, H., Hoa, W. S. (2019). Characteristics of cellulose, hemicellulose and lignin of MD2 pineapple biomass. *Chem. Eng*, 72(1), 79-84.
- Mao, H., Zhang, Y., Yun, Y., Ji, W., Jin, Z., Wang, C., Yu, Z. (2021). Weaning age affects the development of the ruminal bacterial and archaeal community in hu lambs during early life. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- Marasinghe, S. D., Jo, E., Hettiarachchi, S. A., Lee, Y., Eom, T. Y., Gang, Y., ...Oh, C. (2021). Characterization of glycoside hydrolase family 11 xylanase from *Streptomyces* sp. strain J103; its synergetic effect with acetyl xylan esterase and enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 1-14.
- Martin, S. A., Dean, R. G. (1989). Characterization of a plasmid from the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(12), 3035-3038.
- Martínez, A. T., Ruiz-Dueñas, F. J., Camarero, S., Serrano, A., Linde, D., Lund, H., ...Alcalde, M. (2017). Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnology Advances*, 35(6), 815-831.
- Martinez, E., Bartolomé, B., de la Cruz, F. (1988). pACYC184-derived cloning vectors containing the multiple cloning site and lacZ α reporter gene of pUC8/9 and pUC18/19 plasmids. *Gene*, 68(1), 159-162.
- Marvin-Sikkema, F. D., Richardson, A. J., Stewart, C. S., Gottschal, J. C., Prins, R. A. (1990). Influence of hydrogen-consuming bacteria on cellulose degradation by anaerobic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(12), 3793-3797.
- Mazutti, M. A., Skrowonski, A., Boni, G., Zabot, G. L., Silva, M. F., de Oliveira, D., ...Treichel, H. (2010). Partial characterization of inulinases obtained by submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates: a comparative study. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(3), 682-693.
- McCann, J. C., Wickersham, T. A., Loor, J. J. (2014). High-throughput methods redefine the rumen microbiome and its relationship with nutrition and metabolism. *Bioinformatics and Biology Insights*, 8, BBI-S15389.
- McCann, M. C. (1991). Architecture of the primary cell wall. *The cytoskeletal basis of plant growth and form*, 109-129.

- McGavin, M. J., Forsberg, C. W., Crosby, B., Bell, A. W., Dignard, D., Thomas, D. Y. (1989). Structure of the cel-3 gene from *Fibrobacter succinogenes* S85 and characteristics of the encoded gene product, endoglucanase 3. *Journal of bacteriology*, 171(10), 5587-5595.
- McGovern, E., Waters, S. M., Blackshields, G., McCabe, M. S. (2018). Evaluating established methods for rumen 16S rRNA amplicon sequencing with mock microbial populations. *Frontiers in microbiology*, 9, 1365.
- McPherson, M., Møller, S. (2000). *Pcr*. Taylor Francis. ISBN 0-203-34667-X 48-50s
- McSweeney, C., Mackie, R. (2012). Commission on genetic resources for food and agriculture. *Micro-organisms and ruminant digestion: State of knowledge, trends and future prospects. Background Study Paper (FAO)*, 61, 1-62.
- Meissner, K., Wassenberg, D., Liebl, W. (2000). The thermostabilizing domain of the modular xylanase XynA of *Thermotoga maritima* represents a novel type of binding domain with affinity for soluble xylan and mixed-linkage β -1, 3/ β -1, 4-glucan. *Molecular Microbiology*, 36(4), 898-912.
- Mensink, M. A., Frijlink, H. W., van der Voort Maarschalk, K., Hinrichs, W. L. (2015). Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 130, 405-419.
- Mesta, L., Rascle, C., Durand, R., Fèvre, M. (2001). Construction of a chimeric xylanase using multidomain enzymes from *Neocallimastix frontalis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(6-7), 456-463.
- Mewis, K., Lenfant, N., Lombard, V., Henrissat, B. (2016). Dividing the large glycoside hydrolase family 43 into subfamilies: a motivation for detailed enzyme characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(6), 1686-1692.
- Meyers, C. L. F., Meyers, D. J. (2008). Thin-layer chromatography. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, 34(1), A-3D.
- Miao, H., Ma, Y., Zhe, Y., Tang, X., Wu, Q., Huang, Z., Han, N. (2021). Improving the thermostability of a fungal gh11 xylanase via fusion of a submodule (c2) from hyperthermophilic CBM9_1-2. *International journal of molecular sciences*, 23(1), 463.
- Michel, V., Fonty, G., Millet, L., Bonnemoy, F., Gouet, P. (1993). In vitro study of the proteolytic activity of rumen anaerobic fungi. *FEMS microbiology letters*, 110(1), 5-9.
- Milek, J. (2020). Determination of optimum temperatures and activation energies of inulin hydrolysis by endo-inulinase *Aspergillus Niger*. *Chemical and Process Engineering*, 41(3), 229-236.

- Miller, G. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Anal Chem*, 31(3), 426-428.
- Millward-Sadler, S. J., Hall, J., Black, G. W., Hazlewood, G. P., Gilbert, H. J. (1996). Evidence that the Piromyces gene family encoding endo-1, 4-mannanases arose through gene duplication. *FEMS Microbiology Letters*, 141(2-3), 183-188.
- Miron, J., Ben-Ghedalia, D., Morrison, M. (2001). Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of dairy science*, 84(6), 1294-1309.
- Mittendorf, V., Thomson, J. A. (1993). Cloning of an endo-(1→4)-β-glucanase gene, celA, from the rumen bacterium *Clostridium* sp. ('*C. longisporum*') and characterization of its product, CelA, in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 139(12), 3233-3242.
- Miyazaki, K., Hirase, T., Kojima, Y., Flint, H. J. (2005). Medium-to large-sized xylo-oligosaccharides are responsible for xylanase induction in *Prevotella bryantii* B14. *Microbiology*, 151(12), 4121-4125.
- Mohan, A., Flora, B., Girdhar, M. (2018). Inulinase: an important microbial enzyme in food industry. In *Microbial bioprospecting for sustainable development* (pp. 237-248). Springer, Singapore.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 266-277.
- Montgomery, L., Flesher, B., Stahl, D. (1988). Transfer of *Bacteroides succinogenes* (Hungate) to *Fibrobacter* gen. nov. as *Fibrobacter succinogenes* comb. nov. and description of *Fibrobacter intestinalis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(4), 430-435.
- Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., Newbold, C. J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4(7), 1024-1036.
- Morrison, J. M., Elshahed, M. S., Youssef, N. H. (2016). Defined enzyme cocktail from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain C1A effectively releases sugars from pretreated corn stover and switchgrass. *Scientific Reports*, 6(1), 1-12.
- Mosoni, P., Fonty, G., Gouet, P. (1997). Competition between ruminal cellulolytic bacteria for adhesion to cellulose. *Current Microbiology*, 35(1), 44-47.
- Mountfort, D. O., Asher, R. A. (1988). Production of α-amylase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Applied and environmental microbiology*, 54(9), 2293-2299.
- Mountfort, D. O., Asher, R. A., Bauchop, T. (1982). Fermentation of cellulose to methane and carbon dioxide by a rumen anaerobic fungus in a triculture with *Methanobrevibacter* sp. strain RA1 and *Methanosarcina barkeri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1), 128-134.

- Mountfort, D. O., Asher, R. A. (1985). Production and regulation of cellulase by two strains of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(5), 1314-1322.
- Mountfort, D. O., Asher, R. A. (1989). Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(4), 1016-1022.
- Munn, E. A., Orpin, C. G., Hall, F. J. (1981). Ultrastructural studies of the free zoospore of the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*. *Microbiology*, 125(2), 311-323.
- Murphy, M. R., Baldwin, R. L., Koong, L. J. (1982). Estimation of stoichiometric parameters for rumen fermentation of roughage and concentrate diets. *Journal of Animal Science*, 55(2), 411-421.
- Murzin, D. Y., Kusema, B., Murzina, E. V., Aho, A., Tokarev, A., Boymirzaev, A. S., ...Salmi, T. (2015). Hemicellulose arabinogalactan hydrolytic hydrogenation over Ru-modified H-USY zeolites. *Journal of Catalysis*, 330, 93-105.
- Mwenya, B., Santoso, B., Sar, C., Gamo, Y., Kobayashi, T., Arai, I., Takahashi, J. (2004). Effects of including β 1-4 galacto-oligosaccharides, lactic acid bacteria or yeast culture on methanogenesis as well as energy and nitrogen metabolism in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 115(3-4), 313-326.
- Naidoo, K., Ayyachamy, M., Permaul, K., Singh, S. (2009). Enhanced fructooligosaccharides and inulinase production by a *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli KM 24 mutant. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(5), 689-695.
- Nagem, R. A. P., Rojas, A. L., Golubev, A. M., Korneeva, O. S., Eneyskaya, E. V., Kulminskaya, A. A., Polikarpov, I. (2004). Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition. *Journal of Molecular Biology*, 344(2), 471-480.
- Nakamura, T., Kuramori, K., Zaita, N., Akimoto, H., Ohta, K. (2001). Purification and properties of intracellular exo- and endoinulinases from *Aspergillus niger* strain 12. *Bulletin-Faculty of Agriculture Miyazaki University*, 48(1/2), 49-58.
- Nandi, A., Sharma, K., Puri, B. M., Puri, B. R., Bose, M. (2020). Bacteriophages: Genius Viruses Leading the Future of Biotechnology. *ScienceOpen Posters*.
- Narasimha, G., Sridevi, A., Ramanjaneyulu, G., Rajasekhar Reddy, B. (2016). Purification and characterization of β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *International Journal of Food Properties*, 19(3), 652-661.
- Neeraj, G., Ravi, S., Somdutt, R., Ravi, S. K., Kumar, V. V. (2018). Immobilized inulinase: a new horizon of paramount importance driving the production of sweetener and prebiotics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(3), 409-422.
- Nguyen, K. H. V., Dao, T. K., Nguyen, H. D., Nguyen, K. H., Nguyen, T. Q., Nguyen, T. T., ...Do, T. H. (2021). Some characters of bacterial cellulases in goats' rumen

- elucidated by metagenomic DNA analysis and the role of fibronectin 3 module for endoglucanase function. *Animal Bioscience*, 34(5), 867.
- Ni, D., Xu, W., Zhu, Y., Zhang, W., Zhang, T., Guang, C., Mu, W. (2019). Inulin and its enzymatic production by inulosucrase: Characteristics, structural features, molecular modifications and applications. *Biotechnology Advances*, 37(2), 306-318.
- O'Neill, M. A., York, W. S. (2003). The composition and structure of plant primary cell. *The plant cell wall*, 8, 1-54.
- Obeng, E. M., Adam, S. N. N., Budiman, C., Ongkudon, C. M., Maas, R., Jose, J. (2017). Lignocellulases: a review of emerging and developing enzymes, systems, and practices. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 1-22.
- Oddy, V. H., Donaldson, A. J., Cameron, M., Bond, J., Dominik, S., Robinson, D. L. (2018). Variation in methane production over time and physiological state in sheep. *Animal Production Science*, 59(3), 441-448.
- Ogata, T., Kim, Y. H., Masaki, T., Iwamoto, E., Ohtani, Y., Orihashi, T., ...Sato, S. (2019). Effects of an increased concentrate diet on rumen pH and the bacterial community in Japanese Black beef cattle at different fattening stages. *Journal of Veterinary Medical Science*, 19-0077.
- Ojwach, J., Kumar, A., Mutanda, T., Mukaratirwa, S. (2020). Fructosyltransferase and inulinase production by indigenous coprophilous fungi for the biocatalytic conversion of sucrose and inulin into oligosaccharides. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30, 101867.
- Orla-Jensen, S. (1919). *The lactic acid bacteria* (Vol. 3, No. 2). Høst.
- Orpin, C. G. (1975). Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Microbiology*, 91(2), 249-262.
- Orpin, C. G. (1976). Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. *Microbiology*, 94(2), 270-280.
- Orpin, C. G. (1977). Invasion of plant tissue in the rumen by the flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Microbiology*, 98(2), 423-430.
- Orpin, C. G. (1981). Isolation of cellulolytic phycomycete fungi from the caecum of the horse. *Microbiology*, 123(2), 287-296.
- Orpin, C. G. (1984). The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Animal Feed Science and Technology*, 10(2-3), 121-143.
- Orpin, C. G., Munn, E. A. (1986). *Neocallimastix patriciarum* sp. nov., a new member of the Neocallimasticaceae inhabiting the rumen of sheep. *Transactions of the British Mycological Society*, 86(1), 178-181.

- Orpin, C. G., and Joblin, K. N.(1997). The Rumen Anaerobic Fungi. In *The Rumen* Dordredot: Springer 140-195.
- Orpin, C. G., Bountiff, L. (1978). Zoospore chemotaxis in the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*. *Microbiology*, 104(1), 113-122.
- O'sullivan, A. C. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4(3), 173-207.
- Owens, F. N.,Basalan, M. (2016). Ruminal fermentation. In *Rumenology* (pp. 63-102). Springer, Cham.
- Ozkose, E., Kar, B., Akyol, I., Comlekcioglu, U., Ekinci, M. S. (2015). Phylogenetic analysis of anaerobic fungal isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Hayvansal Üretim (Journal of Animal Production)*, 56(2), 14-21.
- Ozkose, E., Thomas, B. J., Davies, D. R., Griffith, G. W., Theodorou, M. K. (2001). *Cyllamyces aberensis* gen. nov. sp. nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. *Canadian Journal of Botany*, 79(6), 666-673.
- Ozkose, E., Akyol, I., Kar, B., Comlekcioglu, U.,Ekinci, M. S. (2009). Expression of fungal cellulase gene in *Lactococcus lactis* to construct novel recombinant silage inoculants. *Folia microbiologica*, 54(4), 335-342.
- Ozkose, E., Kuloglu, R., Comlekcioglu, U., Kar, B., Akyol, I.,Ekinci, M. S. (2011). Effects of tannic acid on the fibrolytic enzyme activity and survival of some ruminal bacteria. *International Journal of Agriculture and Biology*, 13(3).
- Ozköse, E., Ekinci, M. S., Akyol, İ. (2003). Biyoteknolojik potansiyel olarak anaerobik funguslar: kültürü alınmaları ve morfolojileri. *KSU Fen ve Mühendislik Dergisi*, 6(1), 129-139.
- Oztürk, H. (2007). Küresel ısınmada ruminantların rolü. *Vet Hek Der Derg*, 78(1), 17-21.
- Paës, G., Berrin, J. G.,Beaugrand, J. (2012). GH11 xylanases: structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnology advances*, 30(3), 564-592.
- Pai, C. K., Wu, Z. Y., Chen, M. J., Zeng, Y. F., Chen, J. W., Duan, C. H., ...Liu, J. R. (2010). Molecular cloning and characterization of a bifunctional xylanolytic enzyme from *Neocallimastix patriciarum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(5), 1451-1462.
- Pal, A.,Khanum, F. (2010). Characterizing and improving the thermostability of purified xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 grown on solid-state-medium. *Journal of Biochemical Technology*, 2(4).
- Passarinho, A. T. P., Ventrin, R. Z., Maitan-Alfenas, G. P., de Oliveira, E. B.,Guimarães, V. M. (2019). Engineered GH11 xylanases from *Orpinomyces* sp. PC-2 improve techno-functional properties of bread dough. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(2), 741-747.

- Paswan, V. K., Kumar, K., Shehata, A. M. (2022). Rumen Microbiology and Microbial Degradation of Feedstuffs. In *Animal Manure* (pp. 45-60). Springer, Cham.
- Patterson, J. A. (1992). Rumen microbiology. in-Chief Lederberg, J. *Encyclopedia of Microbiology*. Academic press. Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers. New York, 3, 623-542.
- 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 diversity*, 89(1), 253-266.
- Paul, S. S., Kamra, D. N., Sastry, V. R. B., Sahu, N. P., Agarwal, N. (2004). Effect of anaerobic fungi on in vitro feed digestion by mixed rumen microflora of buffalo. *Reproduction Nutrition Development*, 44(4), 313-319.
- Pauly, M., Keegstra, K. (2008). Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant Journal*, 54(4), 559-568.
- Pearce, P. D., Bauchop, T. H. O. M. A. S. (1985). Glycosidases of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* grown on cellulosic substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(5), 1265-1269.
- Pegden, R. S., Larson, M. A., Grant, R. J., Morrison, M. (1998). Adherence of the gram-positive bacterium *Ruminococcus albus* to cellulose and identification of a novel form of cellulose-binding protein which belongs to the Pil family of proteins. *Journal of Bacteriology*, 180(22), 5921-5927.
- Pérez-Barbería, F. J. (2020). The Ruminant: Life History and Digestive Physiology of a Symbiotic Animal. In *Sustainable and Environmentally Friendly Dairy Farms* (pp. 19-45).
- Phillips, M. W., Gordon, G. L. (1988). Sugar and polysaccharide fermentation by rumen anaerobic fungi from Australia, Britain and New Zealand. *Biosystems*, 21(3-4), 377-383.
- Pitta, D. W., Indugu, N., Baker, L., Vecchiarelli, B., Attwood, G. (2018). Symposium review: Understanding diet–microbe interactions to enhance productivity of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 7661-7679.
- Poole, C. F. (2003). Thin-layer chromatography: challenges and opportunities. *Journal of Chromatography A*, 1000(1-2), 963-984.
- Prins, R. A. (1971). Isolation, culture, and fermentation characteristics of *Selenomonas ruminantium* var. bryanti var. n. from the rumen of sheep. *Journal of Bacteriology*, 105(3), 820-825.
- Pronobis, M. I., Deutch, N., Peifer, M. (2016). The Miraprep: A protocol that uses a Miniprep kit and provides Maxiprep yields. *PLoS One*, 11(8), e0160509.

- Puniya, A. K., Singh, R., Kamra, D. N. (Eds.). (2015). Rumen microbiology: *from evolution to revolution*. Springer. 97-113
- Qiu, X., Selinger, B., Yanke, L. J., Cheng, K. J. (2000). Isolation and analysis of two cellulase cDNAs from *Orpinomyces joyonii*. *Gene*, 245(1), 119-126.
- Rahmani, N., Kahar, P., Lisdiyanti, P., Lee, J., Prasetya, B., Ogino, C., Kondo, A. (2019). GH-10 and GH-11 Endo-1, 4- β -xylanase enzymes from *Kitasatospora* sp. produce xylose and xylooligosaccharides from sugarcane bagasse with no xylose inhibition. *Bioresource technology*, 272, 315-325.
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., ...Pandey, A. (2018). Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 16.
- Redondo-Cuenca, A., Herrera-Vázquez, S. E., Condezo-Hoyos, L., Gómez-Ordóñez, E., Rupérez, P. (2021). Inulin extraction from common inulin-containing plant sources. *Industrial Crops and Products*, 170, 113726.
- Reiffová, K., Podoloničová, J., Oriňák, A., Flórián, K., Gondová, T. Á. (2003). Preliminary TLC analysis of fructooligosaccharides as feed additives. *JPC—Journal of Planar Chromatography—Modern TLC*, 16(1), 52-57.
- Rennie, E. A., Scheller, H. V. (2014). Xylan biosynthesis. *Current opinion in biotechnology*, 26, 100-107.
- Reymond, P., Durand, R., Hebraud, M., Fevre, M. (1991). Molecular cloning of genes from the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: expression during hydrolase induction. *FEMS Microbiology Letters*, 77(1), 107-112.
- Roberfroid, M. B. (2005). Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*, 93(S1), S13-S25.
- Robert, C., Del'Homme, C., Bernalier-Donadille, A. (2001). Interspecies H₂ transfer in cellulose degradation between fibrolytic bacteria and H₂-utilizing microorganisms from the human colon. *FEMS Microbiology Letters*, 205(2), 209-214.
- Rode, L. M. (2000). Maintaining a healthy Rumen—An overview. *Advances in Dairy Technology*, 12, 101-108.
- Russell, J. B., Dombrowski, D. B. (1980). Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(3), 604-610.
- Ruiz, D. M., Turowski, V. R., Murakami, M. T. (2016). Effects of the linker region on the structure and function of modular GH5 cellulases. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.
- Ruiz-Aceituno, L., Hernandez-Hernandez, O., Kolida, S., Moreno, F. J., Methven, L. (2018). Sweetness and sensory properties of commercial and novel oligosaccharides of prebiotic potential. *Lwt*, 97, 476-482.

- Sadhu, S., Maiti, T. K. (2013). Cellulase production by bacteria: a review. *British microbiology research journal*, 3(3), 235-258.
- Sakaguchi, E. I. (2003). Digestive strategies of small hindgut fermenters. *Animal Science Journal*, 74(5), 327-337.
- Saleem, A., Waris, S., Ahmed, T., Tabassum, R. (2021). Biochemical characterization and molecular docking of cloned xylanase gene from *Bacillus subtilis* RTS expressed in *E. coli*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 168, 310-321.
- Samal, L., Behura, N. C. (2015). Prebiotics: an emerging nutritional approach for improving gut health of livestock and poultry. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(11), 724-739.
- Samanta, A. K., Jayapal, N., Senani, S., Kolte, A. P., Sridhar, M. (2013). Prebiotic inulin: Useful dietary adjuncts to manipulate the livestock gut microflora. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 1-14.
- Samanta, A. K., Senani, S., Kolte, A. P., Sridhar, M., Sampath, K. T., Jayapal, N., Devi, A. (2012). Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corn cobs. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 466-474.
- Sanal, F. E., Ertan, F., Aktac, T. (2005). Jerusalem Artichoke and Some Biochemical Properties. *Journal of Biological Sciences*, 5(4), 497-505.
- Santoso, B., Kume, S., Nonaka, K., Gamo, Y., Kimura, K., Takahashi, J. (2003). Influence of β 1-4 galacto-oligosaccharides supplementation on nitrogen utilization, rumen fermentation, and microbial nitrogen supply in dairy cows fed silage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16(8), 1137-1142.
- Sar, C., Santoso, B., Mwenya, B., Gamo, Y., Kobayashi, T., Morikawa, R., ...Takahashi, J. (2004). Manipulation of rumen methanogenesis by the combination of nitrate with β 1-4 galacto-oligosaccharides or nisin in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 115(1-2), 129-142.
- Sawanon, S., Kobayashi, Y. (2006). Synergistic fibrolysis in the rumen by cellulolytic *Ruminococcus flavefaciens* and non-cellulolytic *Selenomonas ruminantium*: evidence in defined cultures. *Animal Science Journal*, 77(2), 208-214.
- Saye, L. M., Navaratna, T. A., Chong, J. P., O'Malley, M. A., Theodorou, M. K., Reilly, M. (2021). The anaerobic fungi: Challenges and opportunities for industrial lignocellulosic biofuel production. *Microorganisms*, 9(4), 694.
- Scheller, H.V., Ulvskov, P. (2010) Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 263-289.
- Schweizer, H. P. (1991). *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19. *Gene*, 97(1), 109-112.

- Selinger, L. B., Forsberg, C. W., Cheng, K. J. (1996). The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. *Anaerobe*, 2(5), 263-284.
- Selvakumar, P., Pandey, A. (1999). Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*, 34(8), 851-855.
- Shallom, D., Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current opinion in microbiology*, 6(3), 219-228.
- Sharada, R., Venkateswarlu, G., Venkateshwar, S., Rao, M. A. (2013). Production of Cellulase- A Review. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical Biological Sciences*, 3(4).
- Sharma, S., Vaid, S., Bhat, B., Singh, S., Bajaj, B. K. (2019). Thermostable enzymes for industrial biotechnology. In *Advances in Enzyme Technology* (pp. 469-495). Elsevier.
- Sheng, J., Chi, Z., Gong, F., Li, J. (2008). Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 144(2), 111-121.
- Shet, A. R., Desai, S. V., Achappa, S. (2018). Pectinolytic enzymes: classification, production, purification and applications. *Res. J. Life Sci. Bioinform. Pharm. Chem. Sci*, 4, 337-348.
- Singh, K., Singh, D. P., Singh Barwa, M., Tyagi, P., Mirza, Y. (2006). Some bivalent metal complexes of Schiff bases containing N and S donor atoms. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 21(6), 749-755.
- Singh, R. S. (2011). Enzymatic preparation of high fructose syrup from inulin. *Bioprocessing of foods. New Delhi, India: Asiatech Publishing Inc*, 77-98.
- Singh, R. S., Chauhan, K., Pandey, A., Larroche, C. (2018). Biocatalytic strategies for the production of high fructose syrup from inulin. *Bioresource Technology*, 260, 395-403.
- Singh, R. S., Chauhan, K., Kennedy, J. F. (2017). A panorama of bacterial inulinases: production, purification, characterization and industrial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 312-322.
- Singh, R. S., Chauhan, K., Kennedy, J. F. (2019). Fructose production from inulin using fungal inulinase immobilized on 3-aminopropyl-triethoxysilane functionalized multiwalled carbon nanotubes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 41-52.
- Singh, R. S., Singh, R. P. (2017). Inulinases. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 423-446). Elsevier.

- Singh, R. S., Sooch, B. S., Puri, M. (2007). Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. *Bioresource technology*, 98(13), 2518-2525.
- Singh, R. S., Chauhan, K. (2018). Production, purification, characterization and applications of fungal inulinases. *Current Biotechnology*, 7(3), 242-260.
- Singh, R., Singh, R., Yadav, M. (2013). Molecular and biochemical characterization of a new endoinulinase producing bacterial strain of *Bacillus safensis* AS-08. *Biologia*, 68(6), 1028-1033.
- Singh, S., Ahmed, J., Gavande, P. V., Fontes, C. M., Goyal, A. (2022). Structural and functional insights into the glycoside hydrolase family 30 xylanase of the rumen bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Journal of Molecular Structure*, 134155.
- Smith, P. E., Waters, S. M., Gómez Expósito, R., Smidt, H., Carberry, C. A., McCabe, M. S. (2020). Synthetic sequencing standards: a guide to database choice for rumen microbiota amplicon sequencing analysis. *Frontiers in Microbiology*, 11, 606825.
- Solomon, R., Wein, T., Levy, B., Eshed, S., Dror, R., Reiss, V., ...Jami, E. (2021). Protozoa populations are ecosystem engineers that shape prokaryotic community structure and function of the rumen microbial ecosystem. *The ISME journal*, 1-11.
- Somerville, C. (2006). Cellulose synthesis in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22, 53-78.
- Stancik, I. A., Šestak, M. S., Ji, B., Axelson-Fisk, M., Franjevic, D., Jers, C., ...Mijakovic, I. (2018). Serine/threonine protein kinases from bacteria, archaea and eukarya share a common evolutionary origin deeply rooted in the tree of life. *Journal of Molecular Biology*, 430(1), 27-32.
- Steenbakkers, P. J., Harhangi, H. R., Bosscher, M. W., Hooft, M. M. V. D., Keltjens, J. T., DRIFT, C. V. D., ...CAMP, H. J. O. D. (2003). beta-Glucosidase in cellulosome of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 is a family 3 glycoside hydrolase. *Biochemical Journal*, 370(3), 963-970.
- Stewart, C. S., Flint, H. J., Bryant, M. P. (1997). The rumen bacteria. In *The Rumen Microbial Ecosystem* (pp. 10-72). Springer, Dordrecht.
- Stojanović, S., Ristović, M., Stepanović, J., Margetić, A., Duduk, B., Vujčić, Z., Dojnov, B. (2022). *Aspergillus welwitschiae* inulinase enzyme cocktails obtained on agro-material inducers for the purpose of fructooligosaccharides-production. *Food Research International*, 111755.
- Sujani, S., Seresinhe, R. T. (2015). Exogenous enzymes in ruminant nutrition: A review. *Asian Journal of Animal Sciences*, 9(3), 85-99.
- Sun, J., Tian, C., Diamond, S., Glass, N. L. (2012). Deciphering transcriptional regulatory mechanisms associated with hemicellulose degradation in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 11(4), 482-493.

- Suto, M., Yachi, M., Kamagata, Y., Sasaki, H., Takao, S., Tomita, F. (1991). Cellulase induction by soluble acetyl cellobioses in *Penicillium purpurogenum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 72(5), 352-357.
- Swift, C. L., Louie, K. B., Bowen, B. P., Hooker, C. A., Solomon, K. V., Singan, V., ...O'Malley, M. A. (2021). Cocultivation of anaerobic fungi with rumen bacteria establishes an antagonistic relationship. *Mbio*, 12(4), e01442-21.
- Takizawa, S., Asano, R., Fukuda, Y., Baba, Y., Tada, C., Nakai, Y. (2021). Shifts in xylanases and the microbial community associated with xylan biodegradation during treatment with rumen fluid. *Microbial Biotechnology*.
- Tan, C., Ramírez-Restrepo, C. A., Shah, A. M., Hu, R., Bell, M., Wang, Z., McSweeney, C. (2020). The community structure and microbial linkage of rumen protozoa and methanogens in response to the addition of tea seed saponins in the diet of beef cattle. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11(1), 1-10.
- Teather, R. M. (1982). Isolation of plasmid DNA from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(2), 298-302.
- Teather, R. M. (1992). Genetic engineering of rumen microorganisms. *Proceedings of the International Roundtable on Animal Feed Biotechnology—Research and Scientific Regulation*, 121-31.
- Teather, R. M., Wood, P. J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4), 777-780.
- Temkov, M., Brazkova, M., Grozdanov, P., Dimitrovski, D., Goushterova, A., Krastanov, A. (2018). Evaluation of the inulinase activity of new microbial isolates. *Exploring Microorganisms: Recent Advances in Applied Microbiology*, 192.
- Terrasan, C. R. F., Aragon, C. C., Masui, D. C., Pessela, B. C., Fernandez-Lorente, G., Carmona, E. C., Guisan, J. M. (2016). β -xylosidase from *Selenomonas ruminantium*: Immobilization, stabilization, and application for xylooligosaccharide hydrolysis. *Biocatalysis and Biotransformation*, 34(4), 161-171.
- Teunissen, M. J., Lahaye, D. H., Vogels, G. D. (1992). Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2. *Archives of Microbiology*, 158(4), 276-281.
- Thakur, V. K., Thakur, M. K., Gupta, R. K. (2014). Raw natural fiber-based polymer composites. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 19(3), 256-271.
- Thamblyn Lee, J., 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 *Escherichiacoli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(1), 134-139.

Thomas, G. J. (1960). Metabolism of the soluble carbohydrates of grasses in the rumen of the sheep. *The Journal of Agricultural Science*, 54(3), 360-372.

Thurston, J. P., Grain, J. (1971). Holotrich ciliates from the stomach of *Hippopotamusamphibius*, with descriptions of two new genera and four new species. *The Journal of Protozoology*, 18(1), 133-141.

Torres, D. P., Gonçalves, M. D. P. F., Teixeira, J. A.,Rodrigues, L. R. (2010). Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 438-454.

Tóth, S., Kovács, M., Bóta, B., Szabó-Fodor, J., Bakos, G.,Fébel, H. (2020). Effect of mannanoligosaccharide (MOS) and inulin supplementation on the performance and certain physiological parameters of calves reared on milk replacer. *Journal of Applied Animal Research*, 48(1), 228-234.

Trevizano, L. M., Ventorim, R. Z., de Rezende, S. T., Junior, F. P. S.,Guimarães, V. M. (2012). Thermostability improvement of *Orpinomyces* sp. xylanase by directed evolution. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 81, 12-18.

Tsai, C. F., Qiu, X.,Liu, J. H. (2003). A comparative analysis of two cDNA clones of the cellulase gene family from anaerobic fungus *Piromycesrhizinflata*. *Anaerobe*, 9(3), 131-140.

Tsai, K. P.,Calza, R. E. (1993). Optimization of protein and cellulase secretion in *Neocallimastixfrontalis* EB188. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39(4), 477-482.

Tsioptias, C., Karabinaki, O., Christofilos, D., Tzimpilis, E., Tsivintzelis, I.,Panayiotou, C. (2022). On polymer-polymer miscibility and cellulose ester blends: A case study. *Thermochimica Acta*, 714, 179265.

van Wyk, N., Den Haan, R.,Van Zyl, W. H. (2010). Heterologous production of NpCel6A from *Neocallimastixpatriciarum* in *Saccharomycescerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(5), 378-383.

Vandamme, E. J.,Derycke, D. G. (1983). Microbial inulinases: fermentation process, properties, and applications. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 29, pp. 139-176). Academic Press.

Vavra, J.,Joyon, L. (1966, January). Etude sur la morphologie le cycle evolutif et la position systematique de *Callimastixcyclopis* Weissenberg. In *Journal of Protozoology* (p. 41). 810 E 10th St, Lawrence, Ks 66044: Soc Protozoologists.

- Verdonk, J. M. A. J., Beelen, G. M., Jansman, A. J. M., Huisman, J. (1998). Effect of soya carbohydrate fractions on the ileal digestibility and endogenous flow of nitrogen in veal calves. *EAAP Publication (Netherlands)*.
- Voytas, D. (1992). Agarose gel electrophoresis. *Current protocols in immunology*, 2(1), 10-4.
- Vucinic, J., Novikov, G., Montanier, C. Y., Dumon, C., Schiex, T., Barbe, S. (2021). A comparative study to decipher the structural and dynamics determinants underlying the activity and thermal stability of GH-11 xylanases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5961.
- Vullo, D. L., Coto, C. E., Sineriz, F. (1991). Characteristics of an inulinase produced by *Bacillus subtilis* 430A, a strain isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Vell Rusby). *Applied and environmental microbiology*, 57(8), 2392-2394.
- Wajid, S., Latif, F., Afzal, S., Mukhtar, Z., Ghaffar, A., Mansoor, S., Rajoka, I. (2020). Cloning and expression of *Chaetomium thermophilum* xylanase 11-A gene in prokaryote. *The Nucleus*, 45(3-4), 149-156.
- Wang, H. C., Chen, Y. C., Huang, C. T., Hseu, R. S. (2013). Cloning and characterization of a thermostable and pH-stable cellobiohydrolase from *Neocallimastix patriciarum* J11. *Protein Expression and Purification*, 90(2), 153-159.
- Wang, H. C., Chen, Y. C., Hseu, R. S. (2014). Purification and characterization of a cellulolytic multienzyme complex produced by *Neocallimastix patriciarum* J11. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 451(2), 190-195.
- Wang, H., Li, Z., Liu, H., Li, S., Qiu, H., Li, K., ... Zhang, T. (2017). Heterologous expression in *Pichia pastoris* and characterization of a novel GH11 xylanase from saline-alkali soil with excellent tolerance to high pH, high salt concentrations and ethanol. *Protein expression and purification*, 139, 71-77.
- Wang, L., Zhang, K., Zhang, C., Feng, Y., Zhang, X., Wang, X., Wu, G. (2019). Dynamics and stabilization of the rumen microbiome in yearling Tibetan sheep. *Scientific Reports*, 9(1), 1-9.
- Wang, Q., Luo, Y., He, B., Jiang, L. S., Liu, J. X., Wang, J. K. (2015/a). Characterization of a novel xylanase gene from rumen content of Hu sheep. *Applied biochemistry and biotechnology*, 177(7), 1424-1436.
- Wang, T. Y., Chen, H. L., Lu, M. Y. J., Chen, Y. C., Sung, H. M., Mao, C. T., ... Shih, M. C. (2011). Functional characterization of cellulases identified from the cow rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* W5 by transcriptomic and secretomic analyses. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), 1-16.
- Wang, X., Li, X., Zhao, C., Hu, P., Chen, H., Liu, Z., ... Wang, Z. (2012). Correlation between composition of the bacterial community and concentration of volatile

- fatty acids in the rumen during the transition period and ketosis in dairy cows. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), 2386-2392.
- Wang, Y., Li, X., Chen, Y., Wu, Y. (2015/b). Expression of a xylanase gene originated from rumen anaerobic fungi *Neocallimastix frontalis* in *Pichiapastoris*. *Biotechnology Bulletin*, 31(5), 186.
- Warchol, M., Perrin, S., Grill, J. P., Schneider, F. (2002). Characterization of a purified β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. *Letters in Applied Microbiology*, 35(6), 462-467.
- Warren, R. A. J. (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annual review of microbiology*, 50, 183-213.
- Weary, D. M., Chua, B. (2000). Effects of early separation on the dairy cow and calf: 1. Separation at 6 h, 1 day and 4 days after birth. *Applied Animal Behaviour Science*, 69(3), 177-188.
- Webb, J., Theodorou, M. K. (1991). *Neocallimastix hurleyensis* sp. nov., an anaerobic fungus from the ovine rumen. *Canadian journal of botany*, 69(6), 1220-1224.
- Weimer, P. J. (1996). Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster?. *Journal of Dairy Science*, 79(8), 1496-1502.
- Wen, S., Wu, G., Wu, H. (2021). Biochemical characterization of a GH10 xylanase from the anaerobic rumen fungus *Anaeromyces robustus* and application in bread making. *3 Biotech*, 11(9), 1-12.
- Whitehead, T. R., Cotta, M. A. (2001). Identification of a broad-specificity xylosidase/arabinosidase important for xylooligosaccharide fermentation by the ruminal anaerobe *Selenomonas ruminantium* GA192. *Current Microbiology*, 43(4), 293-298.
- Wilken, S. E., Monk, J. M., Leggieri, P. A., Lawson, C. E., Lankiewicz, T. S., Seppälä, S., ... O'Malley, M. A. (2021). Experimentally validated reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic model of an anaerobic *Neocallimastigomycota* fungus. *Msystems*, 6(1), e00002-21.
- Williams, A. G. (1986). Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiological reviews*, 50(1), 25-49.
- Williams, A. G., Withers, S. E., Joblin, K. N. (1991). Xylanolysis by cocultures of the rumen fungus *Neocallimastix frontalis* and ruminal bacteria. *Letters in applied microbiology*, 12(6), 232-235.
- Williams, A. G., Coleman, G. S. (1985). Hemicellulose-degrading enzymes in rumen ciliate protozoa. *Current Microbiology*, 12(2), 85-90.

- Williams, A. G., Orpin, C. G. (1987). Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi grown on a range of carbohydrate substrates. *Canadian journal of microbiology*, 33(5), 418-426.
- Williams, A. G., Joblin, K. K., Fonty, G., (1994). Interactions between the rumen chytrid fungi and other microorganisms. In: *The Anaerobic Fungi*. Ed. C. G. Orpin, D. O. Mountfort. Marcel Dekker, New York, 191-228
- Wilson, C. A., Wood, T. M. (1992). The anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: isolation and properties of a cellulosome-type enzyme fraction with the capacity to solubilize hydrogen-bond-ordered cellulose. *Applied microbiology and biotechnology*, 37(1), 125-129.
- Winterhalter, C., Heinrich, P., Candussio, A., Wich, G., Liebl, W. (1995). Identification of a novel cellulose-binding domain the multidomain 120 kDa xylanase XynA of the hyperthermophilic bacterium *Thermotogamaritima*. *Molecular Microbiology*, 15(3), 431-444.
- Wong, D. W. (2006). Feruloyl esterase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 133(2), 87-112.
- WS Wong, D., Takeoka, G., J Chan, V., Liao, H., T Murakami, M. (2015). Cloning of a novel feruloyl esterase from rumen microbial metagenome for substantial yield of mono- and diferulic acids from natural substrates. *Protein and Peptide Letters*, 22(8), 681-688.
- Ximenes, E. A., Chen, H., Kataeva, I. A., Cotta, M. A., Felix, C. R., Ljungdahl, L. G., Li, X. L. (2005). A mannanase, ManA, of the polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain PC-2 has carbohydrate binding and docking modules. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(7), 559-568.
- Xing, H., Zou, G., Liu, C., Chai, S., Yan, X., Li, X., ...Zhou, Z. (2021). Improving the thermostability of a GH11 xylanase by directed evolution and rational design guided by B-factor analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 143, 109720.
- Xiong, K., Xiong, S., Gao, S., Li, Q., Sun, B., Li, X. (2018). Improving hydrolysis characteristics of xylanases by site-directed mutagenesis in binding-site subsites from *Streptomyces* L10608. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 834.
- Xu, Q., Zang, Y., Zhou, J., Liu, P., Li, X., Yong, Q., Ouyang, J. (2016). Highly efficient production of D-lactic acid from chicory-derived inulin by *Lactobacillus bulgaricus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(11), 1749-1757.
- Xue, G. P., Gobius, K. S., Orpin, C. G. (1992/a). A novel polysaccharide hydrolase cDNA (celD) from *Neocallimastix patriciarum* encoding three multi-functional catalytic domains with high endoglucanase, cellobiohydrolase and xylanase activities. *Microbiology*, 138(11), 2397-2403.

- Xue, G. P., Orpin, C. G., Gobius, K. S., Aylward, J. H., Simpson, G. D. (1992/b). Cloning and expression of multiple cellulase cDNAs from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 138(7), 1413-1420.
- Yang, Q., Pan, X. (2021). Introducing hydroxyl groups as cellulose-binding sites into polymeric solid acids to improve their catalytic performance in hydrolyzing cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 261, 117895.
- Yanke, L. J., Bae, H. D., Selinger, L. B., Cheng, K. J. (1998). Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. *Microbiology*, 144(6), 1565-1573.
- Yanke, L. J., Dong, Y., McAllister, T. A., Bae, H. D., Cheng, K. J. (1993). Comparison of amylolytic and proteolytic activities of ruminal fungi grown on cereal grains. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(8), 817-820.
- Yano, T., Funamizu, Y., Yoshida, N. (2016). Intracellular accumulation of trehalose and glycogen in an extreme oligotroph, *Rhodococcus erythropolis* N9T-4. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(3), 610-613.
- Yarlett, N., Orpin, C. G., Munn, E. A., Yarlett, N. C., Greenwood, C. (1986). Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochemical Journal*, 236(3), 729-739.
- Yazdıç, C.F., (2011). *Anaerobik fungus Orpinomyces sp.'ye ait selüloz geninin klonlanması karakterizasyonu ve enzim aktivitesinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş, 27-29s.
- Yazdıç, F. C., Yazdıç, F., Bülent, K., Özköse, E., Ekinci, M. S. (2021) Anaerobik funguslarda hidrojenozomlar: hidrojen üreten organeller. *Mantar Dergisi*, 12(2), 190-208.
- 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*. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 33(1), 87-94.
- Yi, Y., Xu, S., Kovalevsky, A., Zhang, X., Liu, D., Wan, Q. (2021). Characterization and structural analysis of a thermophilic GH11 xylanase from compost metatranscriptome. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(20), 7757-7767.
- Yoshida, S., Hespen, C. W., Beverly, R. L., Mackie, R. I., Cann, I. K. (2010). Domain analysis of a modular α -L-arabinofuranosidase with a unique carbohydrate binding strategy from the fiber-degrading bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85. *Journal of Bacteriology*, 192(20), 5424-5436.
- Yun, J. W., Kim, D. H., Kim, B. W., Song, S. K. (1997). Production of inulo-oligosaccharides from inulin by immobilized endoinulinase from *Pseudomonas* sp. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(4), 369-371.

- Yücel, H., Ekinci, K. (2022). Carbohydrate active enzyme system in rumen fungi: *International Journal of Secondary Metabolite*, 9(3), 320-334.
- Yücel, H., Ekinci, K., Karaman, A., (2022). Endüstriyel potansiyeli olan *Selenomonas ruminantium*'un iki farklı in vitro besi ortamındaki enzim aktivitelerinin kıtaslanması. ISPEC 9th International Conference on Agriculture, Animal Science and Rural Development 19-20 March 2022-Burdur/Turkey
- Zhang, X., Hu, P., Zhang, X., Li, X. (2020/a). Chemical structure elucidation of an inulin-type fructan isolated from *Lobelia chinensis* flour with anti-obesity activity on diet-induced mice. *Carbohydrate Polymers*, 240, 116357.
- Zhang, Y., Li, F., Chen, Y., Wu, H., Meng, Q., Guan, L. L. (2020/b). Metatranscriptomic profiling reveals the effect of breed on active rumen eukaryotic composition in beef cattle with varied feed efficiency. *Frontiers in Microbiology*, 11, 367.
- Zhang, Z., Wei, W., Yang, S., Huang, Z., Li, C., Yu, X., ...Zhang, X. (2022). Regulation of dietary protein solubility improves ruminal nitrogen metabolism in vitro: role of bacteria–protozoa interactions. *Nutrients*, 14(14), 2972.
- Zhao, L. C., Wang, Y., Lin, J. F., Guo, L. Q. (2012). Adsorption and kinetic behavior of recombinant multifunctional xylanase in hydrolysis of pineapple stem and bagasse and their hemicellulose for Xylo-oligosaccharide production. *Bioresource Technology*, 110, 343-348.
- Zhao, S., Wang, J., Bu, D., Liu, K., Zhu, Y., Dong, Z., Yu, Z. (2010). Novel glycoside hydrolases identified by screening a Chinese Holstein dairy cow rumen-derived metagenome library. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19), 6701-6705.
- Zherebtsov, N. A., Shelamova, S. A., Abramova, I. N. (2002). Biosynthesis of inulinases by *Bacillus bacteria*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38(6), 544-548.
- Zhong, R., Cui, D., Ye, Z. H. (2019). Secondary cell wall biosynthesis. *New Phytologist*, 221(4), 1703-1723.
- Zhong, Y., Xue, M., Liu, J. (2018). Composition of rumen bacterial community in dairy cows with different levels of somatic cell counts. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3217.
- Zhou, J., Peng, M., Zhang, R., Li, J., Tang, X., Xu, B., ...Huang, Z. (2015). Characterization of *Sphingomonas* sp. JB13 exo-inulinase: a novel detergent-, salt-, and protease-tolerant exo-inulinase. *Extremophiles*, 19(2), 383-393.
- Zhu, D., Liu, X., Xie, X., Yang, S., Lin, H., Chen, H. (2020). Characteristics of a XIP-resistant xylanase from *Neocallimastix* sp. GMLF 1 and its advantage in barley malt saccharification. *International Journal of Food Science Technology*, 55(5), 2152-2160.

Zhu, Z., He, J., Liu, G., Barba, F. J., Koubaa, M., Ding, L., ...Vorobiev, E. (2016). Recent insights for the green recovery of inulin from plant food materials using non-conventional extraction technologies: A review. *Innovative Food ScienceEmerging Technologies*, 33, 1-9.

