

## ***Neocallimastix* sp. ve *Orpinomyces* sp.'nin Enzim Üretimleri Üzerine Karbon Kaynaklarının Etkisi <sup>[1]</sup>**

Uğur ÇÖMLEKCİOĞLU \*  Ferit Can YAZDIÇ \*\* Sevtap KESER \*  
Bekir Mehmet KELLEÇİ \* Gülay BATTALOĞLU \* Emin ÖZKÖSE \*\*

[1] Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2010/3-11M)

\* Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı, TR-46100 Kahramanmaraş - TÜRKİYE

\*\* Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği Laboratuvarı, TR-46100 Kahramanmaraş - TÜRKİYE

**Makale Kodu (Article Code): KVFD-2012-6476**

### **Özet**

*Neocallimastix* sp. ve polisentrik *Orpinomyces* sp. 12 ticari karbon kaynağı ve 11 bitkisel karbon kaynağı üzerinde geliştirilerek  $\beta$ -1,4-endoglukanaz,  $\beta$ -1,4-endoksilanaz,  $\beta$ -glukosidaz,  $\beta$ -ksilosidaz üretimleri belirlenmiştir. Enzimler üçüncü günden itibaren besi ortamında toplanmış, en yüksek selüloz aktivite değerleri *Neocallimastix* sp. ve *Orpinomyces* sp.'de sırasıyla karboksimetil selüloz ve tekstil atığından elde edilmiştir. Kolay fermente edilebilen şekerler selüloz üretimini 0.5 U/ml altında kalmasına neden olmuştur. Ksilanaz en yüksek *Neocallimastix* sp.'nin karboksimetil selüloz kültüründe, *Orpinomyces* sp.'nin fruktoz, maltoz, sükroz, laktoz ve avisel kültürlerinde tespit edilmiş, ayrıca yonca her iki fungus içinde ksilanaz aktivitesini en üst düzeye çıkarmıştır. *Neocallimastix* sp.'de  $\beta$ -glikosidaz ve  $\beta$ -ksilosidaz üretimi *Orpinomyces* sp.'ye göre daha fazla olmuştur. İnulin her iki fungus tarafından fermente edilse de fungal gelişimleri dolayısıyla da enzim üretimlerini olumsuz etkileyen tek substrat olmuştur. Ksilanazın sürekli salgılanma doğası anaerobik fungusların konak hayvanın hemiselülozdan faydalanmasında önemli rol oynadığını göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:** *Neocallimastix*, *Orpinomyces*, Selüloz, Ksilanaz,  $\beta$ -glukosidaz,  $\beta$ -ksilosidaz

## **Effects of Carbon Sources on Enzyme Production of *Neocallimastix* sp. ve *Orpinomyces* sp.**

### **Summary**

*Neocallimastix* sp. and *Orpinomyces* sp. was grown by using 12 commercial carbon sources and 11 plant carbon sources.  $\beta$ -1,4-endoglucanase,  $\beta$ -1,4-endoxylanase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase synthesis by these fungi were determined. Enzymes accumulated on culture medium after three days. The maximum cellulase activities of *Neocallimastix* sp. and *Orpinomyces* sp. was observed in the cultures of carboxymethyl cellulose and textile waste, respectively. In the cultures of readily fermentable sugars, cellulase activity was under 0.5 U/ml. Xylanase activity was found to be maximum in carboxymethyl cellulose culture of *Neocallimastix* sp. However maximum xylanase activities of *Orpinomyces* sp. was found in fructose, maltose, sucrose, lactose and avicel cultures. Xylanase production of both fungi was also induced by alfalfa hay. *Neocallimastix* sp. produced more  $\beta$ -glicosidase and  $\beta$ -xylosidase than *Orpinomyces* sp. Inulin was fermented by both fungi, however inulin was the only substrate that caused poor growth and enzyme production. The continuous secretion of xylanase reflected the role of anaerobic fungi in hemicellulose degradation in host animal.

**Keywords:** *Neocallimastix*, *Orpinomyces*, Cellulase, Xylanase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase

### **GİRİŞ**

Bitkisel materyaller pek çok ruminantın temel besini oluşturmaktadır <sup>1</sup> ve doğadaki temel depolanmış karbon kaynağını bitki hücre duvarları oluşturmaktadır <sup>2</sup>.

Ruminantların sindirim kanalı bitkisel materyalin fermentasyonu için çok uygundur ve selüloz ile diğer bitkisel fibrillerin mikrobiyal sindirimi ruminant hayvanlarda do-



### **İletişim (Correspondence)**



+90 344 2191433



cugur@ksu.edu.tr

ğal diyetlerin kullanımında merkezi bir role sahiptir <sup>3</sup>. Rumen ekosistemi içerisinde hücre duvarlarına ait polisakarit parçalayan enzim aktivitesi diğer bilinen fermentasyon sistemlerinden 10 kat daha fazladır <sup>4</sup>. Rumen bakterilerinin sayısal üstünlüğü ve metabolik çeşitliliğinden dolayı rumendeki besin sindiriminin büyük bölümünden sorumlu olduğu düşünülse de <sup>5</sup>, bitki hücre duvarının parçalanmasında rumen fungal enzimlerin etkinliği rumen bakterilerinden oldukça fazladır <sup>4</sup>. İnek ve koyun rumenlerinde fibrilli diyetler üzerinde büyük anaerobik fungal popülasyonların varlığı bilinmektedir ve bu fungusların özellikle fibrilli bitki parçalarını kolonize ettiği bilinmektedir <sup>6</sup>. Lignoselüloz sindiriminde anaerobik fungusların öncelikli kolonizasyonu diğer rumen mikroorganizmaları tarafından ulaşılamayan dokulara fungal misellerin penetrasyonu ile gerçekleştirilmektedir <sup>3</sup>.

Rumen funguslarının selüloolitik enzim aktiviteleri, bas-kın ruminal selüloolitik bakterilerden 5 kat daha fazla olduğu ve rumen bakterilerinin yokluğunda otlardan oluşan materyalin %62'sinin rumen fungusları tarafından parçalandığı bildirilmiştir <sup>6</sup>. Bununla birlikte rumen funguslarının sentezlediği selüloz ve ksilanaz enzimlerinin endüstride geniş ölçüde kullanılan *Trichoderma reesei* <sup>7</sup>, *Aspergillus oryzae* ve *Saccharomyces cerevisiae* <sup>4</sup> enzimlerinden daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Buna göre rumen fungusları tarafından üretilen selüloz ve ksilanaz enzimleri bilinen en aktif fibrolitik enzimleri oluşturmaktadır <sup>8</sup>. Rumen endoglukanaz ve ekzoglukanaz gibi polisakarit parçalayan enzimler hücre yüzeyinde veya sitoplazmada bulunabilirken, glikozid parçalayan  $\beta$ -glukosidaz ve  $\beta$ -fukosidaz gibi enzimler çoğunlukla rumen sıvısında bulunmaktadır ki bu enzimlerin rumen mikroorganizmalarının parçalanmasıyla hücre içeriğinin rumen sıvısına çıkmasından kaynaklandığı bildirilmiştir <sup>4</sup>. Diğer rumen mikroorganizmaları ile karşılaştırıldığında anaerobik fungusların  $\beta$ -glukosidaz ve  $\beta$ -ksilosidaz enzimlerinin spesifik aktiviteleri oldukça yüksektir <sup>9</sup>.

Bu çalışmada inek dışkısından izole edilmiş olan anaerobik rumen fungusları monosentrik *Neocallimastix* sp. ve polisentrik *Orpinomyces* sp.'nin selüloolitik ve hemiselülitik enzim üretimleri üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda 12 hazır karbon kaynağının yanı sıra 11 bitkisel karbon kaynağı kullanılarak bu fungusların  $\beta$ -1,4-endoglukanaz (selüloz; EC 3.2.1.4)  $\beta$ -1,4-endoksilanaz (ksilanaz; EC 3.2.1.8),  $\beta$ -glukosidaz (EC3.2.1.21),  $\beta$ -ksilosidaz (EC 3.2.1.37) üretimleri belirlenmiştir.

## MATERYAL ve METOT

### Anaerobik Fungal İzolatlar ve Kültür Koşulları

Bu çalışmada kullanılan anaerobik rumen fungusları *Neocallimastix* ve *Orpinomyces* cinslerine ait izolatlar Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Zootekni Bölümü, Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği Laboratuvarında bulunan Ana-

erobik Fungus Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir <sup>10</sup>. Bu çalışmada kullanılan bazal anaerobik besiyeri Orpin'e göre <sup>11</sup> hazırlanmıştır. Besiyeri 150 ml/L rumen sıvısı, 6 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 g/L maya özütü, 10 g/L peptone, 1 g/L L-sistein hidroklorür, ve 1 mg/lit rezazurin içermektedir. Besiyerinde kullanılan mineral solusyonlar ayrı hazırlanmıştır ve 150 ml/L oranında ilave edilmiştir. Mineral Solusyon I: %0.3 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; Mineral Solution II: %0.3 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, %0.6 NaCl, %0.6 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, %0.06 CaCl<sub>2</sub>, ve %0.06 MgSO<sub>4</sub> içermektedir. Bazal besi ortamına enerji kaynağı olarak buğday samanı ilave edilmiştir. Besiyeri içerisindeki oksijenin uzaklaştırılması amacıyla bir yandan CO<sub>2</sub> ile muamele edilirken aynı zamanda kaynama noktasına kadar ısıtılarak yine CO<sub>2</sub> (%99) gazı altında Hungate tüplerine aktarılmış ve otoklav ile steril edilmiştir. Bütün inkübasyonlar 39°C'de ve durağan kültürlerde gerçekleştirilmiştir.

### Anaerobik Fungusların Enzim Üretimlerinin Belirlenmesi

Anaerobik fungusların enzim üretimleri için kullanılacak besi ortamı temel olarak yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Test edilecek hazır karbon kaynakları glikoz, fruktoz, ksiloz, maltoz, sükröz, laktöz, sellobiyoz, ksilan, karboksimetil selüloz (KMS), avisel, nişasta ve inulin olarak belirlenmiş, anaerobik besi ortamlarına %0.5 oranında ilave edilmiştir. Bitkisel materyaller; buğday (*Triticum aestivum*) samanı, yonca (*Lucerne alfalfa*), arpa (*Hordeum vulgare*) samanı, yulaf (*Avena sativa*) samanı, mısır (*Zea mays*) koçanı, defne (*Laurus nobilis*) yaprakları, kiraz (*Prunus avium*) yaprakları, sandal (*Santalum album*) yaprakları ve keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua*) meyveleri değirmende (Ika; MF10) öğütülmüş ve 2 mm'lik elekten geçirilerek ayrıştırılmıştır. Yer elması (*Helianthus tuberosus*) liyofilize edildikten sonra toz haline getirilmiş ayrıca tekstil endüstrisinin atığı olan pamuk lifleri de bitkisel materyal kategorisinde denlenmiştir. Bitkisel materyaller Hungate tüplerine ~100 mg olacak şekilde ilave edilmiş ve anaerobik besi ortamı tüplere 10 ml hacimde dağıtılmıştır. Çözünabilir karbon kaynaklarını içeren besi ortamları 110°C'de 15 dk, çözünmeyen karbon kaynaklarını içeren besi ortamları 121°C'de 15 dk otoklav edilmiştir <sup>11</sup>. Fungal izolatların 2 gecelik glikozlu kültürleri, önceden 39°C'ye ısıtılmış besi ortamlarının inokülasyonu için kullanılmıştır. Fungusların enzim üretimleri takip etmek için 3, 5 ve 7. günlerde örnekler alınmıştır.

### Enzim Ekstraktlarının Hazırlanması

Enzim üretimi araştırılacak kültür 1.200 g'de 10 dk santrifüjlenmiş ve besi ortamı ile hücre/bitkisel materyal birbirinden ayrılmıştır. Hücre dışına salgılanan enzimlerin aktivitesini belirlemek için elde edilen üst sıvı sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

### $\beta$ -1,4-Endoglukanaz ve $\beta$ -1,4-Endoksilanaz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Selüloz ve ksilanaz aktivitelerinin belirlenmesi için Miller'e

ait <sup>12</sup> yöntem kullanılmıştır. Reaksiyon, ependorf tüpleri içerisinde enzim ekstraktı ve substratın (%0.5 substrat, 50 mM sodyum fosfat tamponu, pH 6.0) 40°C'de 45 dk inkübasyona bırakılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Selülaz ve ksilanaz enzimleri için substrat olarak sırasıyla Karboksimetilselüloz (Sigma) ve Oat Spelts Ksilan (Sigma) kullanılmıştır. Karışım üzerine 3-5 dinitrosalisilik asit (DNS) solusyonu (%30 sodyum potasyum tartarat, 2 N NaOH, %1 DNS) eklendikten sonra 5 dk kaynar su banyosunda bekletilerek enzim reaksiyonu durdurulmuştur. Kontrol ve deney grubu karışımları saf su ile seyreltilmiş ve reaksiyon karışımından çözünmeyen maddelerin uzaklaştırılması için 14.000 g'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Enzimatik reaksiyon sonucunda ortaya çıkan indirgenen şeker miktarının belirlenmesi için spektrofotometrede (Perkin Elmer Lambda EZ 150) 540 nm'de absorbanları ölçülmüştür. Enzim aktivitelerinin hesaplanmasında kullanılan standart çözeltilerinde selülaz ve ksilanaz enzimleri için sırasıyla glikoz ve ksiloz kullanılmıştır. Bir ünite enzim aktivitesi 1 dk içerisinde salınan 1 mmol indirgenen şeker miktarı olarak tanımlanmıştır.

### ***β*-Glikosidaz ve *β*-Ksilosidaz Aktivitelerinin Belirlenmesi**

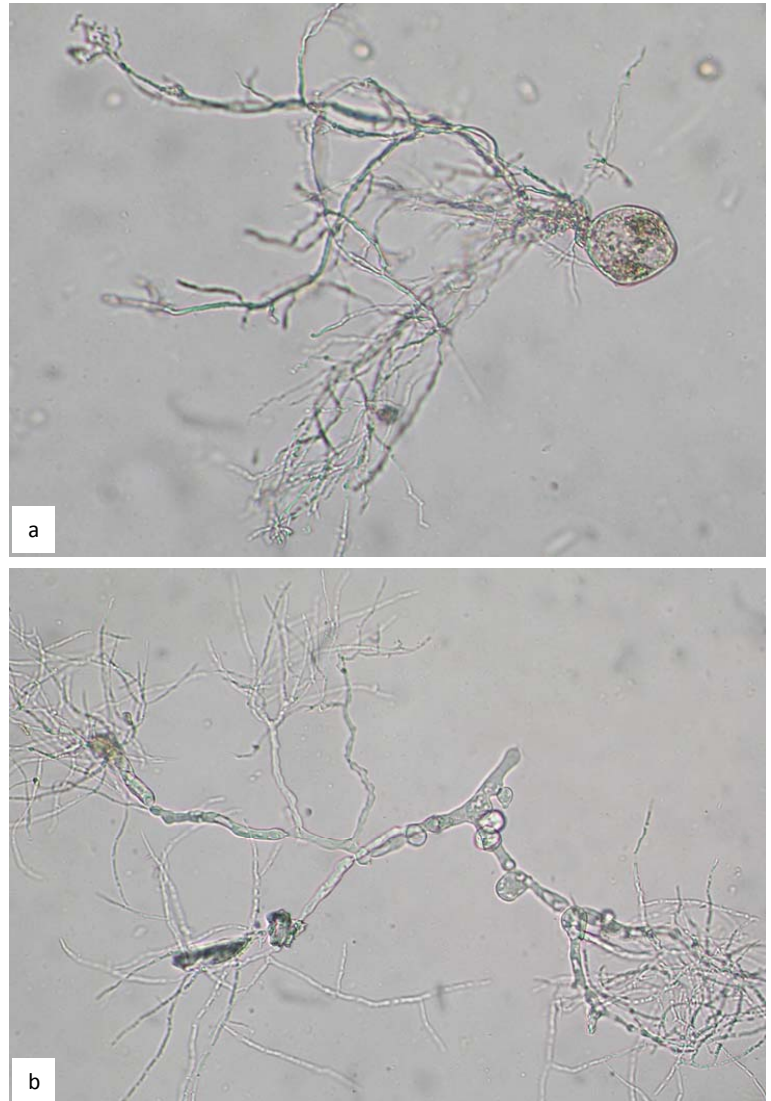
Enzim ekstraktlarında *β*-glikosidaz ve *β*-ksilosidaz aktivitelerini belirlemek için sırasıyla kromojenik substratlar *p*-nitrophenyl-*β*-D-glucopyranoside (Sigma) ve *p*-nitrophenyl-*β*-D-xylopyranoside (Sigma) kullanılmıştır. Enzim ekstraktı ile 3 mM pNP-şeker türevleri (50 mM sodyum fosfat tamponu, pH 6.0) 40°C sıcaklıkta 60 dk inkübasyona bırakılmıştır. Enzimatik reaksiyon 2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solusyonu ile durdurulmuştur. *β*-glikosidaz ve *β*-ksilosidaz aktivitelerinin tespit edilmesi için substrattan salınan *p*-nitrophenyl (pNP) spektrofotometrede 420 nm'de ölçülmüştür. Standart çözeltilerinde pNP kullanılmış ve bir ünite enzim aktivitesi 1 dk içerisinde salınan 1 mmol pNP miktarı olarak tanımlanmıştır <sup>13</sup>.

## **BULGULAR**

Bu çalışmada kullanılan ruminal funguslardan *Neocallimastix* sp. monosentrik, *Orpinomyces* sp. ise polisentrik karakterde olan funguslardır (Şekil 1). Her iki fun-

**Şekil 1.** Bu çalışmada kullanılan *Neocallimastix* sp. (a) ve *Orpinomyces* sp.'ye (b) ait spor keseleri ve rizomiseliumları

**Fig 1.** Sporangia and rhizomycelium of *Neocallimastix* sp. (a) and *Orpinomyces* sp. (b) used in this study



Tablo 1. Neocallimastix sp. ve Orpinomyces sp.'nin farklı karbon kaynaklarında endo 1,4 β-glukanaz ve endo 1,4 β-kılanaz üretimleri																												
Table 1. Endo 1,4 β-glucanase and endo 1,4 β-xylanase production of Neocallimastix sp. ve Orpinomyces sp. on different carbon sources																												
Karbon Kaynakları	Endo 1,4 β-glukanaz Aktivitesi (U/ml)							Endo 1,4 β-kılanaz Aktivitesi (U/ml)																				
	Neocallimastix sp.				Orpinomyces sp.			Neocallimastix sp.				Orpinomyces sp.																
	3. Gün	5. Gün	7. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün													
Ticari Karbon Kaynakları	Glikoz	0.41±0.06	0.43±0.02	0.46±0.04	0.24±0.02	0.28±0.12	0.15±0.08	3.27±0.14	3.44±0.07	3.63±0.04	3.30±0.04	3.42±0.08	3.51±0.27	Fruktoz	0.37±0.10	0.44±0.03	0.33±0.05	0.32±0.02	0.38±0.03	0.29±0.01	0.45±0.04	1.24±0.36	2.77±0.55	1.48±0.40	3.85±0.21	5.25±0.15	6.45±0.18	
	Ksiloz	0.34±0.04	0.32±0.01	0.32±0.02	0.23±0.06	0.19±0.03	0.13±0.02	1.01±0.09	3.73±0.15	2.00±0.62	2.94±0.14	6.28±0.09	6.21±0.15	4.56±1.48	Maltoz	0.52±0.05	0.54±0.04	0.50±0.02	0.38±0.02	0.42±0.02	0.34±0.01	0.43±0.02	1.41±0.27	2.85±0.12	4.34±0.07	6.28±0.09	6.21±0.15	6.35±0.04
	Sükroz	0.10±0.01	0.12±0.02	0.36±0.03	0.43±0.04	0.30±0.02	0.43±0.02	1.50±0.13	2.35±0.11	3.41±0.47	6.14±0.05	5.47±0.16	7.08±0.34	Laktöz	0.31±0.02	0.39±0.07	0.39±0.02	0.04±0.01	0.34±0.05	0.49±0.10	1.43±0.13	1.77±0.04	3.08±0.23	5.37±0.22	6.97±0.13	6.43±0.92		
	Sellobiyoz	0.39±0.03	0.46±0.05	0.43±0.03	0.24±0.02	0.29±0.06	0.41±0.12	1.00±0.20	2.39±0.19	1.01±0.12	1.72±0.41	2.42±0.12	2.41±0.01	Ksilan	0.63±0.03	0.79±0.08	0.54±0.06	0.41±0.03	0.56±0.01	0.47±0.02	3.03±0.12	4.58±0.02	3.87±0.05	1.55±0.12	3.03±0.02	3.32±0.03		
	KMS	1.09±0.09	1.31±0.06	1.30±0.11	0.20±0.03	0.91±0.03	0.34±0.01	4.75±0.12	5.66±0.12	5.60±0.14	2.59±0.04	3.70±0.08	4.00±0.39	Avisel	0.06±0.01	0.59±0.01	1.08±0.04	0.23±0.06	0.71±0.04	0.87±0.01	1.56±0.11	3.20±0.16	4.76±0.36	1.25±0.20	7.02±0.22	4.35±0.55		
	Nişasta	0.37±0.05	0.43±0.02	0.44±0.01	0.42±0.03	0.32±0.01	0.32±0.09	3.40±0.20	3.96±0.11	4.20±0.14	3.16±0.08	2.66±0.09	2.36±0.23	İnulin	0.08±0.01	0.04±0.01	0.03±0.01	TE	TE	TE	0.60±0.20	0.84±0.12	0.67±0.16	0.59±0.03	1.22±0.06	1.46±0.07		
	Triticum aestivum	0.34±0.01	0.86±0.01	0.81±0.01	0.11±0.01	0.58±0.04	1.02±0.01	1.93±0.28	2.06±0.23	2.80±0.40	1.81±0.09	2.20±0.24	1.94±0.02	Lucerne alfalfa	0.76±0.02	0.76±0.02	1.14±0.16	0.40±0.01	0.74±0.07	0.39±0.03	7.21±0.08	7.76±0.17	8.14±0.09	0.73±0.10	5.35±0.15	6.79±0.55		
	Hordeum vulgare	0.71±0.06	0.88±0.01	0.50±0.03	0.72±0.09	0.71±0.01	0.63±0.03	1.48±0.14	2.12±0.42	2.14±0.18	1.68±0.15	2.27±0.26	1.58±0.01	Avena sativa	0.21±0.01	0.62±0.02	0.71±0.01	0.13±0.02	0.51±0.02	0.56±0.01	1.40±0.32	2.22±0.51	2.68±0.51	2.03±0.05	2.70±0.41	3.03±0.18		
	Zea mays	0.49±0.03	0.5±0.05	0.55±0.02	0.09±0.02	0.60±0.03	0.62±0.05	4.36±0.34	4.27±0.26	4.64±0.24	0.81±0.25	3.21±0.06	2.00±0.53	Laurus nobilis	0.70±0.12	0.71±0.01	0.67±0.05	0.22±0.02	0.30±0.04	0.61±0.02	5.12±0.19	7.14±0.26	7.59±0.60	4.95±0.11	5.07±0.21	5.79±0.38		
	Prunus avium	0.50±0.13	0.41±0.02	0.32±0.06	0.13±0.01	0.26±0.01	0.45±0.10	2.57±0.09	5.22±0.13	3.88±0.24	2.68±0.13	4.23±0.27	4.15±0.22	Santalum album	0.35±0.06	0.48±0.04	0.43±0.01	0.34±0.03	0.39±0.09	0.36±0.04	4.16±0.21	3.50±0.60	2.79±0.03	0.59±0.15	2.71±0.28	2.94±0.23		
	Ceratonia siliqua	0.25±0.04	0.31±0.06	0.30±0.06	0.33±0.05	0.58±0.12	0.38±0.11	1.13±0.12	0.99±0.08	1.59±0.40	1.02±0.11	2.11±0.36	1.88±0.45	Helianthus tuberosus	0.21±0.01	0.33±0.02	0.49±0.07	0.67±0.02	0.85±0.08	0.73±0.02	3.90±0.16	5.64±0.29	5.82±0.14	3.87±0.15	5.13±0.54	7.13±0.35		
	Tekstil Atığı	0.54±0.02	0.85±0.04	1.01±0.01	0.81±0.02	0.63±0.01	1.36±0.02	3.32±0.07	3.72±0.16	5.82±0.23	0.58±0.08	4.21±0.32	5.80±0.11															

Briksel Karbon Kaynakları

**Tablo 2.** *Neocallimastix sp.* ve *Orpinomyces sp.*'nin farklı karbon kaynaklarında  $\beta$ -glukosidaz ve  $\beta$ -ksilosidaz üretimleri  
**Table 2.**  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -xylosidase production of *Neocallimastix sp.* ve *Orpinomyces sp.* on different carbon sources

Karbon Kaynakları	$\beta$ -glukosidaz Aktivitesi (U/ml)							$\beta$ -ksilosidaz Aktivitesi (U/ml)								
	Neocallimastix sp.				Orpinomyces sp.				Neocallimastix sp.				Orpinomyces sp.			
	3. Gün	5. Gün	7. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün	
Glikoz	0.26±0.00	0.17±0.00	0.44±0.03	0.19±0.01	0.26±0.02	0.35±0.01	0.24±0.01	0.24±0.01	0.31±0.03	0.14±0.02	0.17±0.02	0.16±0.01	0.14±0.02	0.17±0.02	0.16±0.01	
Fruktoz	0.02±0.01	0.13±0.01	0.03±0.01	0.35±0.03	0.37±0.03	0.50±0.03	0.03±0.01	0.29±0.01	0.05±0.01	0.32±0.02	0.25±0.03	0.27±0.06	0.32±0.02	0.25±0.03	0.27±0.06	
Ksiloz	0.03±0.00	0.20±0.00	0.03±0.01	0.21±0.02	0.25±0.02	0.27±0.01	0.15±0.01	0.53±0.02	0.16±0.01	0.32±0.02	0.36±0.03	0.37±0.04	0.32±0.02	0.36±0.03	0.37±0.04	
Maltoz	0.41±0.14	0.59±0.12	0.82±0.15	0.37±0.01	0.42±0.02	0.57±0.04	0.20±0.06	0.61±0.15	0.75±0.09	0.20±0.01	0.17±0.03	0.17±0.01	0.20±0.01	0.17±0.03	0.17±0.01	
Sükroz	0.10±0.00	0.17±0.01	0.31±0.11	0.48±0.01	0.51±0.02	0.62±0.06	0.05±0.01	0.11±0.01	0.20±0.01	0.13±0.02	0.11±0.01	0.10±0.01	0.13±0.02	0.11±0.01	0.10±0.01	
Laktöz	0.07±0.00	0.15±0.03	0.42±0.06	0.13±0.00	0.28±0.02	0.38±0.01	0.07±0.01	0.16±0.01	0.31±0.05	0.07±0.01	0.16±0.02	0.28±0.01	0.07±0.01	0.16±0.02	0.28±0.01	
Sellobiyoz	0.03±0.01	0.21±0.03	0.08±0.00	0.39±0.01	0.49±0.03	0.62±0.00	0.09±0.02	0.30±0.01	0.15±0.01	0.13±0.01	0.11±0.01	0.12±0.01	0.13±0.01	0.11±0.01	0.12±0.01	
Ksilan	0.61±0.10	0.96±0.01	0.86±0.07	0.09±0.00	0.22±0.01	0.20±0.02	0.32±0.01	1.16±0.01	1.02±0.12	0.04±0.01	0.14±0.01	0.19±0.01	0.04±0.01	0.14±0.01	0.19±0.01	
KMS	1.22±0.04	1.54±0.06	1.59±0.11	0.14±0.01	0.21±0.04	0.21±0.00	0.22±0.01	0.36±0.01	0.40±0.03	0.06±0.01	0.05±0.01	0.07±0.00	0.06±0.01	0.05±0.01	0.07±0.00	
Avisel	0.14±0.05	0.87±0.04	1.49±0.06	0.02±0.00	0.55±0.08	0.31±0.04	0.03±0.01	0.14±0.01	0.28±0.01	0.02±0.00	0.15±0.02	0.05±0.01	0.02±0.00	0.15±0.02	0.05±0.01	
Nişasta	0.58±0.01	0.57±0.02	0.73±0.03	0.22±0.04	0.45±0.03	0.48±0.06	0.34±0.02	0.30±0.01	0.39±0.06	0.08±0.02	0.06±0.01	0.14±0.04	0.08±0.02	0.06±0.01	0.14±0.04	
İnulin	0.04±0.00	0.06±0.01	0.09±0.03	0.03±0.00	0.05±0.00	0.04±0.00	0.04±0.01	0.10±0.01	0.08±0.01	0.02±0.00	0.03±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.03±0.00	0.02±0.00	
<i>Triticum aestivum</i>	0.49±0.02	1.30±0.05	1.14±0.03	0.02±0.00	0.25±0.01	0.41±0.00	0.15±0.01	0.69±0.07	0.47±0.03	0.03±0.00	0.07±0.00	0.12±0.02	0.03±0.00	0.07±0.00	0.12±0.02	
<i>Lucerne alfalfa</i>	0.33±0.12	0.81±0.03	1.03±0.07	0.06±0.01	0.22±0.02	0.37±0.02	0.24±0.07	0.66±0.05	0.71±0.06	0.03±0.00	0.09±0.01	0.09±0.01	0.03±0.00	0.09±0.01	0.09±0.01	
<i>Hordeum vulgare</i>	0.54±0.02	1.04±0.05	0.55±0.01	0.25±0.01	0.41±0.01	0.41±0.00	0.42±0.03	0.78±0.01	0.46±0.01	0.12±0.08	0.13±0.00	0.27±0.05	0.12±0.08	0.13±0.00	0.27±0.05	
<i>Avena sativa</i>	0.34±0.02	0.64±0.01	0.89±0.03	0.05±0.01	0.27±0.00	0.34±0.01	0.11±0.01	0.60±0.03	0.60±0.06	0.03±0.00	0.12±0.01	0.16±0.01	0.03±0.00	0.12±0.01	0.16±0.01	
<i>Zea mays</i>	0.49±0.01	0.75±0.01	0.77±0.01	0.08±0.00	0.64±0.19	0.01±0.00	0.38±0.07	0.53±0.02	0.53±0.03	0.06±0.01	0.25±0.02	0.02±0.00	0.06±0.01	0.25±0.02	0.02±0.00	
<i>Laurus nobilis</i>	0.56±0.06	0.69±0.03	0.66±0.08	0.19±0.01	0.25±0.01	0.27±0.00	0.61±0.10	0.81±0.04	0.80±0.06	0.11±0.01	0.12±0.01	0.12±0.00	0.11±0.01	0.12±0.01	0.12±0.00	
<i>Prunus avium</i>	0.24±0.03	0.26±0.00	0.20±0.03	0.12±0.01	0.15±0.02	0.16±0.01	0.08±0.00	0.18±0.01	0.35±0.03	0.05±0.01	0.09±0.01	0.06±0.01	0.05±0.01	0.09±0.01	0.06±0.01	
<i>Santalum album</i>	0.44±0.03	0.43±0.01	0.48±0.00	0.13±0.01	0.23±0.01	0.22±0.02	0.33±0.03	0.36±0.01	0.20±0.02	0.06±0.01	0.08±0.01	0.07±0.00	0.06±0.01	0.08±0.01	0.07±0.00	
<i>Ceratonia siliqua</i>	0.18±0.01	0.19±0.01	0.21±0.03	0.11±0.02	0.13±0.03	0.10±0.03	0.14±0.00	0.16±0.01	0.14±0.01	0.07±0.01	0.14±0.03	0.10±0.03	0.07±0.01	0.14±0.03	0.10±0.03	
<i>Helianthus tuberosus</i>	0.30±0.03	0.41±0.01	0.64±0.11	0.12±0.01	0.18±0.01	0.27±0.04	0.16±0.01	0.23±0.02	0.26±0.09	0.07±0.01	0.11±0.01	0.14±0.02	0.07±0.01	0.11±0.01	0.14±0.02	
Tekstil Atığı	0.11±0.03	0.83±0.03	1.53±0.03	0.03±0.00	0.38±0.03	0.06±0.01	0.10±0.01	0.06±0.01	0.48±0.07	0.03±0.00	0.20±0.02	0.03±0.00	0.03±0.00	0.20±0.02	0.03±0.00	

Ticarit Karbon Kaynakları

Bitkisel Karbon Kaynakları

gusunda rizoidal yapıları ışık mikroskobu altında incelemek için kontrol edilmiştir. *Neocallimastix* sp.'nin karakteristik özellikleri olan tek sporangiuma bağlı filamentli rizomizelyumları, *Orpinomyces* sp.'nin ise yoğun rizomizelyumları içerisindeki birden fazla sporangiumları gözlenmiştir. *Neocallimastix* sp. bol miktarda çok kamçılı zoosporu gözlenebilirken, *Orpinomyces* sp.'nin ise çok kamçılı zoosporları nadiren gözlenebilmiştir.

Farklı karbon kaynaklarının *Neocallimastix* sp. ve *Orpinomyces* sp.'nin enzim üretimleri üzerine etkilerini zamanla bağlı olarak belirlemek için inkübasyonun 3, 5 ve 7. günlerinde kültürlerden örnekler alınmış ve enzim üretimi bakımından analiz edilmiştir. Enzimlerin genel olarak 3. günden itibaren besi ortamında toplandıkları görülmüştür. En yüksek selülaz aktivite değerleri *Neocallimastix* sp. ve *Orpinomyces* sp.'de sırasıyla KMS (1.30 U/ml) ve tekstil atığı (1.36 U/ml)'nden elde edilmiştir. KMS, anaerobik fungusların endoglukanazlarının üretiminde etkili bir substrat olduğu bilinmekle beraber, diğer selülozik karbon kaynakları da test edilen anaerobik fungusların KMS'az üretimini arttırmıştır. *Neocallimastix* sp. için KMS, *Orpinomyces* sp.'ye göre daha etkili bir substrat olduğu görülmektedir. Bununla beraber *Neocallimastix* sp. tarafından kristalin selüloz özelliğinde olan avisel (1.08 U/ml), *Orpinomyces* sp. tarafından ise tekstil atığı (1.36 U/ml) daha etkili kullanılan substratlar olmuştur. Bu çalışmada glikoz vb. kolay fermente edilebilen şekerler selüloz üretiminin genel olarak 0.5 U/ml altında kalmasına neden olmuştur. İnülin ise *Orpinomyces* sp.'de selülaz üretimini tamamen durdururken, *Neocallimastix* sp.'de de oldukça düşük bulunmuştur (0.03-0.08 U/ml). Elde edilen sonuçlar çalışılan funguslarda selülaz üretiminin substrata bağlı olarak düzenlendiğini göstermiştir (Tablo 1).

Ksılanaz aktivitesinin bütün karbon kaynaklarında selülaz aktivitesinin çok üzerinde olduğu görülmüştür (Tablo 1). En düşük ksılanaz aktiviteleri inülin içeren besi ortamlarında görülmüş olmasına rağmen inülin kültüründe selülaz aktivitesine göre daha fazla ksılanaz aktivitesi elde edilmiştir (0.59-1.46 U/ml). Ksılanaz üretimi hazır karbon kaynakları içerisinde *Neocallimastix* sp. için en yüksek KMS içeren kültür ortamında (5.66 U/ml) gerçekleşirken, *Orpinomyces* sp. için fruktoz (6.45 U/ml), maltoz (6.35 U/ml), sükroz (7.08 U/ml), laktoz (6.97 U/ml) ve avisel (7.02 U/ml) besi ortamlarında yüksek düzeyde ksılanaz aktivitesi tespit edilmiştir. Yukarıda sayılan karbon kaynaklarının *Orpinomyces* sp.'nin gelişimini de oldukça artırması bu sonucun çıkmasında önemli bir etken olduğu düşünülmüştür. Diğer taraftan yonca her iki fungus içinde ksılanaz aktivitesini en üst düzeye çıkarmıştır (*Neocallimastix* sp. ve *Orpinomyces* sp. için sırasıyla, 8.14 ve 6.79 U/ml). Benzer etki ayrıca *Neocallimastix* için defnede (7.59 U/ml) ve *Orpinomyces* için de yer elmasında (7.13 U/ml) kaydedilmiştir. Ksılanaz üretiminin ksılan yerine selülozik substratlar üzerinde artması, anaerobik funguslarda selülazlar ile beraber ksılanaz enzimlerinin üre-

tildiğini ve bu enzimlerin sinerjistik olarak çalıştığını düşündürmektedir. Ayrıca ksılanaz üretiminin ksılanın monomeri olan ksiloz ile baskılanmaması, ksılanazın sürekli olarak salgılanabilmesi için önemli bir faktördür.

*Neocallimastix* sp. ve *Orpinomyces* sp.'ye ait  $\beta$ -glikosidaz ve  $\beta$ -ksilosidaz üretimleri Tablo 2'de verilmiştir. *Neocallimastix* sp. özellikle KMS (1.59 U/ml), avisel (1.53 U/ml) ve tekstil atığı (1.53 U/ml) gibi selülozik kaynaklarda yüksek düzeyde  $\beta$ -glikosidaz sentezlerken, buğday samanı, yonca ve arpa içeren besi ortamlarında da 1.0 U/ml üzerine çıkmıştır. *Orpinomyces* sp.'nin mısır koçanı (0.64 U/ml), sellobiyoz (0.62 U/ml), sükroz (0.62 U/ml), maltoz (0.57 U/ml) ve avisel (0.55 U/ml) kültürlerinde diğer karbon kaynaklarına göre daha fazla  $\beta$ -glikosidaz aktivitesi görülmüştür. Elde edilen sonuçlar *Neocallimastix* sp.'nin  $\beta$ -glikosidaz üretiminin *Orpinomyces* sp.'den daha yüksek olduğunu göstermektedir.  $\beta$ -ksilosidaz aktivitesinde  $\beta$ -glikosidaz ile benzer olarak *Neocallimastix* sp.'de daha yüksek çıkmıştır. *Neocallimastix* sp. için ksılanın,  $\beta$ -ksilosidaz enziminin en iyi indükleyicisi olduğu görülmüştür (1.16 U/ml). Maltoz, sükroz, arpa ve defne de  $\beta$ -ksilosidazın üretilmesini teşvik edici substratlardandır (0.61-0.81 U/ml). *Orpinomyces* sp.'nin  $\beta$ -ksilosidaz üretiminde ksiloz diğer karbon kaynaklarına göre daha etkili olmuştur (0.32-0.37 U/ml).

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Anaerobik funguslar monosentrik ve polisentrik olmak üzere farklı üreme özellikleri gösterirler. Monosentrik fungus sadece bir adet sporangiyum (spor kesesi) içerirken polisentrik funguslar birden fazla spor kesesi içermekte, ayrıca monosentriklerin ve polisentriklerin spor keseleri boyut ve şekil bakımından farklılıklar göstermektedir. Monosentrik ve polisentrik fungusların bitki hücre duvarının yıkımı sırasında bitkisel materyalleri kolonizasyonunda da farklılıklar arz etmektedir. Polisentrik funguslar rizomizelyumları ile bitki parçalarını sıkı bir şekilde sarması dirençli lignoselülozik materyalin degradasyonunda avantaj sağlayabilir. Bununla birlikte monosentrik funguslar daha kolay yayılabilen ve bitki hücre duvarını kolonize edebilmektedirler<sup>14</sup>. Bu çalışmada monosentrik funguslardan *Neocallimastix* sp. ve polisentrik funguslardan *Orpinomyces* sp.'nin enzim üretimleri incelenmiştir.

Anaerobik fungusların selülaz enzim üretiminin ortamda bulunan substrat çeşidinden etkilendiği önceki çalışmalarda bildirilmiştir<sup>15</sup>. Yanke ve ark.<sup>16</sup>, çalıştıkları anaerobik fungusların endoglukanaz aktivitelerinin selülozik substratlarda, ksılanaz aktivitesinin ise ksılan üzerinde daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Williams ve Orpin<sup>17</sup> de benzer olarak çalışmalarında ksılan üzerinde gelişen fungusun glikozda gelişen fungusdan daha fazla ksılanaz ürettiği bildirilmiştir. *Piromyces* sp. E2'nin enzim üretimleri en yüksek sellobiyoz, laktoz, fruktoz ve nişasta içeren kültürlerde gerçekleşmiş, ksılan üzerinde ksılanaz üretimi selülozik substrat filtre kağıdı üzerinde gelişen kültüre göre %40

daha az bulunmuştur<sup>18</sup>. *Neocallimastix* R1'in ksilanlı kül-türünde ksilan üretimi ise avisel üzerindeki daha fazla bulunmuştur<sup>19</sup>. Yapılan çalışmalar anaerobik fungal suşlar arasında enzim üretim düzeyi ve düzenlenmesi bakımından farklılık gösterse de cins düzeyinde selülitik ve ksilanolitik enzim aktivite profillerinde benzerlik olduğu bildirilmiştir<sup>20</sup>. *Neocallimastix* sp. ve *Orpinomyces* sp. ile yapılan bu çalışma da selülaz üretiminin substrata bağlı olduğunu ve KMS, avisel ve tekstil atığı gibi selülozik substratların, çözünebilir şekerlerden daha etkili bir uyarıcı olduğunu göstermiştir. Bitki hücre duvarlarında bulunan lignin içeriği selüloz kullanımını büyük ölçüde sınırlandıran faktör olması, mikroorganizmaların erişimi zor olan selülozu parçalayacak enzimleri üretmek yerine ortamda bulunan hazır şekerleri kullanmasını teşvik edecek metabolik düzenleme mekanizmaları olduğunu akla getirmektedir.

Ksilanaz, anaerobik fungusların çalışılan tüm endopolisakkarit hidrolaz enzimleri içerisinde en aktif olan enzimdir<sup>21</sup>. Bu çalışmada *Neocallimastix* sp. KMS üzerinde, *Orpinomyces* sp. KMS ve özellikle avisel üzerinde ksilanlı kültürlerinden daha fazla ksilanaz üretimi gerçekleştirmiştir. *Neocallimastix* sp. ve *Orpinomyces* sp. tarafından bütün karbon kaynakları üzerinde ksilanaz üretilmesi bu iki fungus için ksilanaz üretiminin temel olduğunu ortaya koymaktadır. Buna benzer sonuç *Neocallimastix* R1'den elde edilmiş ve glikoz, ksiloz, sellobiyoz ve ksilan'da sırasıyla 1.19, 2.29, 1.32 ve 3.2 U/ml ksilanaz aktivitesi tespit edilmiştir<sup>19</sup>. Çalışmada kullanılan her iki fungusun bütün bitkisel materyaller üzerinde gelişebilmesi ve ksilanaz enzimlerinin süreklilik arz eden salgılanma doğası bu anaerobik fungusların özellikle ksilan degradasyonunda önemli bir rol aldığını ve konak hayvanın hemiselülozdan faydalanmasına katkı sağladığını göstermektedir. *Neocallimastix* sp. R1'in inulin içeren ortamda geliştiği fakat KMS içeren ortamda gelişemediği, laktoz içeren ortamda ise zayıf geliştiği bildirilirken<sup>19</sup>, bu çalışmada inulin her iki fungus tarafından fermente edilse de fungal gelişimleri dolayısıyla da enzim üretimlerini olumsuz etkilemiş ancak KMS ve laktoz içeren ortamlarda iyi geliştikleri gözlenmiştir. İnulin, *Neocallimastix* sp. izolatları tarafından kullanıldığı ancak *Caecomyces* sp. ve *Piromyces* sp. izolatları tarafından kullanılmadığı bildirilmiştir<sup>22</sup>. Paul ve ark.<sup>23</sup>, inulinin *Piromyces* sp. tarafından fermente edilmediğini, *Neocallimastix* sp. ve *Orpinomyces* sp. tarafından fermente edildiğini bildirmiştir.

Selülitik enzimler tarafından parçalanmış selülozun ana ürünü olan sellobiyozun birikmesi selüloz hidrolizini durdurmaktadır. Anaerobik fungusların β-glikosidaz enzimi ekstrasellülerdir ve rumen sıvısı içerisinde enzimi bırakırlar<sup>24</sup>. Rumen bakterilerinin β-glikosidazları temel olarak hücrelidir, bu nedenle fungal β-glikosidazlar rumen sıvısından sellobiyozun uzaklaşmasında önemli rol oynamakta ve selüloz hidrolizi sonucunda biriken sellobiyozun meydana getireceği inhibisyonun önüne geçilmektedir<sup>25</sup>.

Bu çalışmada sellobiyozun hidrolizini gerçekleştiren β-glikosidaz enziminin üretimi sellobiyoz içeren ortamda KMS içeren kültür kadar uyarılmamıştır. Bu durum β-glikosidazın sinerjistik çalıştığı diğer selülaz enzimleri ile beraber aynı anda salgılandığını düşündürmektedir. Böylelikle rumen içerisinde selüloz degradasyonunun başlaması ile beraber anaerobik funguslar tarafından β-glikosidaz enziminin bırakılması rumende sellobiyozun birikmesini önemli derecede engelleyecektir. Aynı durumun β-ksilosidaz üretiminde de görülmesi rumen içerisinde ksilobiyoz birikiminin de önüne geçildiğini göstermektedir. Bugüne kadar çalışılan anaerobik fungusların yüksek selülitik ve ksilanolitik aktiviteleri bilinse de, fungal genuslar ve suşlar arasında farklı deney koşullarının uygulanmasından dolayı karşılaştırmalar yapmak çok güçtür. Ancak benzer noktalar belirlenecek olursa enzim üretimi genel olarak zamana bağlı olarak artmaktadır. Bütün anaerobik funguslar bazal düzeyde endoglukanaz üretebilir fakat selülozik substratlar enzim üretimini arttırmaktadır. Ksilanaz enzimleri anaerobik funguslar için temel enzimlerdir ve yüksek düzeyde sentezlenir. Ekstrasellüler β-glikosidaz ve β-ksilosidaz enzimleri rumen ortamından sellobiyoz ve ksilobiyozun uzaklaştırılmasında önemli rol oynamaktadır. Anaerobik fungal cinsler arasında geliştikleri substratlarda enzim üretimlerinin farklılık göstermesi genetik düzenleme mekanizmalarındaki farklılığı göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- Canbolat Ö:** Potential nutritive value of field Binweed (*Convolvulus arvensis* L) Hay harvested at three different maturity stages. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18 (2): 331-335, 2012.
- Thomson JA:** Molecular biology of xylan degradation. *FEMS Microbiol Rev*, 104, 65-82, 1993.
- Pearce PD, Bauchop T:** Glycosidases of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* grown on cellulosic substrates. *Appl Environ Microbiol*, 49, 1265-1269, 1985.
- Lee SS, Shin KJ, Kim WY, Ha JK, Han IK:** The rumen ecosystem: As a fountain source of noble enzymes. *Asian-Aus J Anim Sci*, 12 (6): 988-1001, 1999.
- Cheng KJ, Forsberg CW, Minato H, Costerton JW:** Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. In, Tsuda T, Sasaki H, Kawahima R (Eds): *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. pp. 595-624, Academic Press, New York, 1991.
- Akin DE, Gordon GLR, Hogan JP:** Rumen bacterial and fungal degradation of *Digiteria pentzii* grown with or without sulfur. *Appl Environ Microbiol*, 46, 738-748, 1983.
- Wood TM, Wilson CA, McCrear SI, Joblin KN:** A highly active extracellular cellulase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 34, 37-40, 1986.
- Trinci APJ, Davis DR, Gull K, Lawrence MI, Nielsen BB, Rickers A, Theodorou MK:** Anaerobic fungi in herbivorous animals. *Mycol Res*, 98, 129-152, 1994.
- Williams AG, Orpin CG:** Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative growth stages of the rumen fungi *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and an unidentified isolate grown on a range of carbohydrate substrates. *Can J Microbiol*, 33 (5): 427-434, 1987.
- Çömlekçioğlu U, Akyol İ, Kar B, Özköse E ve Ekinci MS:** Anaerobik rumen funguslarının izolasyonu, tanımlanması ve kültür koleksiyonunun oluşturulması. *Hayvansal Üretim*, 49 (2): 29-35, 2008.

- 11. Orpin CG:** Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. *J Gen Microbiol*, 94, 270-280, 1976.
- 12. Miller GL:** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem*, 31, 426-428, 1959.
- 13. Comlekcioglu U, Ozkose E, Yazdic FC, Akyol I, Ekinci MS:** Polysaccharidase and glycosidase production of avicel grown rumen fungus *Orpinomyces sp.* GMLF5. *Acta Biol Hung*, 61 (3): 333-343, 2010.
- 14. Borneman WS, Akin DE, Ljungdahl LG:** Fermentation products and plant cell wall degrading enzymes produced by monocentric and polycentric ruminal fungi. *Appl Environ Microbiol*, 9, 285-296, 1989.
- 15. Comlekcioglu U, Aygan A, Yazdic FC, Ozkose E:** Effects of various agro-wastes on xylanase and  $\beta$ -xylosidase production of anaerobic ruminal fungi. *J Sci Ind Res*, 70, 293-299, 2011.
- 16. Yanke LJ, Selinger LB, Lynn JR, Cheng KJ:** Comparison of the influence of carbon substrates on the fibrolytic activities of anaerobic rumen fungi. *Anaerobe*, 2, 373-378, 1996.
- 17. Williams AG, Orpin CG:** Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi on a range of carbohydrate substrates. *Can J Microbiol*, 33, 418-426, 1987.
- 18. Teunissen MJ, Hermans JMH, Huis In't Veld JHS, Vogels GD:** Purification and characterisation of a complex-bound and a free  $\beta$ -1,4-endoxylanase from the culture fluid of the anaerobic fungus *Piromyces sp.* Strain E2. *Arch Microbiol*, 159, 265-271, 1993.
- 19. Lowe SE, Theodorou MK, Trinci APJ:** Cellulases and xylanases of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose and xylan. *Appl Environ Microbiol*, 53, 1216-1223, 1987.
- 20. Williams AG, Withers SE, Orpin CG:** Effect of the carbohydrate growth substrate on polysaccharolytic enzyme formation by anaerobic fungi isolated from the foregut and hindgut of nonruminant herbivores and the forestomach of ruminants. *Lett Appl Microbiol*, 18, 147-151, 1994.
- 21. Mountfort DO, Asher RA:** Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl Environ Microbiol*, 55, 1016-1022, 1989.
- 22. Phillips MW, Gordon GLR:** Sugar and polysaccharide fermentation by anaerobic fungi from Australia, Britain and New Zealand. *BioSystems* 21, 377-383, 1988.
- 23. Paul SS, Kamra DN, Sastry VRB:** Fermentative characteristics and fibrolytic activities of anaerobic gut fungi isolated from wild and domestic ruminants. *Arch Anim Nutr*, 64, 279-292, 2010.
- 24. Li X, Calza RE:** Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from the rumen fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. *Enz Microbial Technol*, 13, 1-7, 1991.
- 25. Chen H, Xinliang L, Ljungdahl LG:** Isolation and Properties of an Extracellular  $\beta$ -glucosidase from the polycentric rumen fungus *Orpinomyces sp.* Strain PC-2. *Appl Environ Microbiol*, 60 (1): 64-70, 1994.