

## RUMİNANLARDA SELÜLOZUN SİNDİRİMİ (DERLEME)

### Cellulose Digestion in Ruminants (A review)

Engin ÜNAY<sup>1</sup>

Sema YAMAN<sup>1</sup>

Vedat KARAKAŞ<sup>1</sup>

1. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü

Geliş Tarihi : 11.04.2008

Kabul Tarihi : 12.11.2008

#### ÖZET

Geviş getiren çiftlik hayvanları için birinci derecede enerji kaynağı şüphesiz karbonhidratlardır. Selüloz bir hayvan yemi olarak, karbonhidratların önemli bir bölümünü teşkil eder. Dünyada en fazla bulunan karbonhidrat ve bitki kuru maddesinin %20-40ını oluşturur. Selüloz keza bitki hücre duvarının en büyük oranını temsil eder ve başlıca lifli maddeyi oluşturur. Selülozun değerlendirilmesi lignifiye olma durumuna göre hiç sindirilememekten tam sindirilmeye kadar değerir. Selülozun sindirimini lignifiye olması yanında diğer inhibitörler ve kısıtlayıcı faktörler, selülozun kendi iç özellikleri etkiler. Bu kısıtlayıcı faktörler ve kendi iç özellikleri nedeniyle sindirim kanalında selülozun sindirimi halen tam olarak açıklanmış değerildir. Bu derleme, ruminantlarda selülozun mikrobiyal yıkımı ve selüloz sindiriminin nasıl gerçekteştiğini açıklamak için yapılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Ruminant, selüloz sindirimi, mikrobiyal yıkım

#### SUMMARY

The primary energy sources for ruminants are undoubtedly carbohydrates. As an animal feed cellulose is an important member of carbohydrates. It is the most abundant carbohydrate on the world, and 20-40% of dry matter of higher plants consists of cellulose. It also represents main part of plant cell wall and constitutes main fibrous substance. The nutritional utilization of cellulose varies from totally indigestible to completely digestible, depending largely upon lignifications. However, in addition to lignifications, there are other inhibitors and limiting factors and intrinsic properties which alter its digestibility. Because of these limiting factors and its intrinsic properties, digestibility of cellulose in the digestive system is still not cleared up enough. In this review, microbial degradation of cellulose and cellulose digestion were explained.

**Key words:** Ruminant, cellulose digest, microbial degradation

#### 1. GİRİŐ

Ruminantlar, doğanın kendilerine sunduğu avantajı iyi değerlendiren, neredeyse atık konumundaki kaba yem kaynaklarını dahi orta derecede sindirebilen ve bu sindirim sonunda elde ettikleri enerji ile hem yaşamlarını idame ettirebilen hem de, belli miktarda verim verebilen ender canlılardır. Bunun en önemli kanıtı selülozu sindirim kanallarında bulunan mikroorganizmalar vasıtası ile sindirebilmeleridir. Bu sindirim ortak bir yaşam döngüsünün sonucudur. Rumene gelen yem parçalarına saldırıan mikroorganizmalar, mekanik ve enzimatik yıkım sırasında ortaya çıkan ara ve son ürünlerden kendi yaşamsal ihtiyaçlarını karşılamak için, hayvan da arta kalan ürünler, yıkılmadan bağırsağa ulaşan yem partiküller ve ölen mikroorganizmalardan kendi ihtiyaçı olan enerjiyi sağlamaktadır. Bu

döngü bir müdahale olmaksızın süresiz bir döngüdür.

Selülozun rumende parçalanması ile uçucu yağ asitleri (UYA) oluşmaktadır. Bilindiği gibi uçucu yağ asitlerinden ruminant enerji ihtiyaçının %70i karşılanmaktadır. şöyle ki bir sđırda günlük 2000 ile 4000 g UYA sentezlenir. Bu da yaklaşık olarak 8400-20.000 kcal eşdeğer bir enerji demektir (18). 500 kg canlı ağırlıktaki ve 18 – 20 kg süt veren bir ineğin günlük toplam enerji gereksinimi ortalama (Yaşama payı+verim payı ) 22.000 kcal (4) olduğu göz önüne alındığında iyi bir kaba yem ve selüloz kaynağından elde edilebilecek enerjinin önemi daha kolay anlaşılabilecektir. Bu nedenledir ki birçok araştırmacı, doğanın bu cömert sunumunu daha ekonomik ve verimli hale getirerek kullanıla-

bilirliğini sağlamak için yoğun çaba ve büyük masraflarla binlerce araştırma yapmışlardır. Bu derleme, selülozun ruminantlar tarafından nasıl sindirildiğinin daha iyi anlaşılabilmesi için yapılmıştır. Ülkemizde, koyun ve yerli ırk sığırların beslenmesi neredeyse tamamen mera veya anız otlamasına dayalıdır. Bu durumda selüloz ve selülozun sindirilebilirliği ülkemiz hayvancılığı içinde önemli konulardan birisini oluşturmaktadır.

## 2. SELÜLOZ SİNDİRİMİ

Yem parçaları rumende rumen hareketleri ve mikrobiyal saldırı ile bir parçalanmaya uğramaktadır. Mikroorganizmalar parçalanmış yem partiküllerine saldırırlar. Mikroorganizmaların %70'i partikül yüzeyindeki fibrillerde bulunur ve buralara tutunurlar. Mikroorganizmaların faaliyetlerini gösterebilmeleri için tutunmaları gerekmektedir (Şekil 1).



Şekil 1. Mikrobiyal tutunmaya örnek

Mikroorganizmalarda 2 tip tutunma söz konusudur (9):

1. Gevşek tutunma: Dış yüzeyi fazla (-) yüke sahip bakteriler (bitki lektinleri ile 2 değerlikli katyonlar aracılığıyla köprü oluşturur)

2. Sıkı tutunma: Parçalayıcı enzimlerinin spesifik reseptörleri ile tutundukları sanılmaktadır.

Selülitik bakteriler, fungusların tutunmasını engellemektedirler. Yapılan bir çalışmada *R. flavefaciens* ve *R. albus* un ortamda varlığının *Neocallimastix frontalis* ve *Piromyces communis* mantar türlerinin selülitik aktivitesini engellediği tespit edilmiştir. Mikroorganizmalar çeşitli enzim sistemleri ile yem unsurlarını parçalayarak enzimatik bir sindirim gerçekleştirirler (5, 9).

Selülaz enzim sistemleri, oligo ve/veya polisakaritleri hidroliz eden glukozid hidrolaz enzim ailesinin üyeleridirler. Bütün selülazlar kimyasal olarak basit yapıdaki bir substratta tek bir bağı parçalarlar,  $\beta$ -1,4 glukozidik bağların hidrolizinden sorumludurlar. Selülozun yapısını oluşturan glukoz molekülleri arasındaki kapsamlı bağlanma deseni özellikle mikrobiyal parçalanmaya dirençli kristal bir yapı oluşturmaktadır.

Çizelge 1 de Selülaz enzim bileşenlerinin değişik substratlardaki etkisi ve Çizelge 2 de ise rumende bulunan ve bitki hücre duvarı polisakaritlerini hidrolize eden temel enzim aktiviteleri verilmiştir. Selülaz enzim bileşenlerinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada selüloz miyofibrilindeki kristal bölge üzerinde sadece sellobiyohidrolaz enziminin yavaş bir etkisinin olduğunu, kristal bölgeye göre daha yumuşak bir bölge olan amorf bölgede ise sellobiyohidrolaz ve endoglukanaz enzimlerinin aktif olduğu belirtilmektedir (17).

Çizelge 1. Selülaz bileşenlerinin değişik substratlar üzerine etkisi (17)

Substrat Enzim	Kristal selüloz	Amorf selüloz	Karboksi Metil Selüloz (CMC)	Sello-oligosakkaritler	Sellobiyoz
Sellobiyohidrolaz	Yavaş	Çok aktif	Hiç	Aktif	Hiç
Endoglukanaz	Hiç	Çok aktif	Çok aktif	Aktif	Hiç
$\beta$ -Glukozidaz	Hiç	Hiç	Hiç	Aktif	Aktif

Çizelge 2. Rumende bulunan ve bitki hücre duvarı polisakkaritlerinin hidrolizi için gerekli olan temel enzimlerin aktiviteleri (17)

Substrat polimer	Hidroliz için hedef bağ	Enzim
Selüloz	$\beta$ -1,4-glukoz bağı	Endo- $\beta$ -1,4-glukanaz
Sellobiyoz	$\beta$ -1,4-glukoz bağı	$\beta$ -1,4-glukanaz
Selüloz veya ksilan	$\beta$ -1,4-glukoz bağı veya ksiloz bağı	ksiloselülaz
Ksilan	$\beta$ -1,4-ksiloz	Endo- $\beta$ -1,4-ksilanaz
Likenan	$\beta$ -1,3 ve $\beta$ -1,4 heksoz bağı	$\beta$ -(1,3-1,4)-glukanaz
Pektin	$\beta$ -1,4-galakturonik bağlar	Pektin lizaz

Selülozu selülaz enzim sistemi ile parçalarlar. Bir polisakkarit olan selüloz, mikroorganizmaların salgıladıkları selülaz enzimi ile sellobiyoza yıkımlanır. Daha sonra sellobiyaz enzim sistemleri ile disakkarit olan sellobiyoz, monosakkarit olan glukozu yıkımlanır. Glukoz ise glukaz enzimleri ile önce pruvata, daha sonra son ürünler olan uçucu yağ asitleri, CO<sub>2</sub> ve metan oluşacak şekilde yıkımlanır. Mikroorganizmalar bu yıkım sırasında kendi enerjilerini sağlarken kendi organizmaları için gerekli olan mikrobiyal proteinleri üretir ve kullanırlar. Ancak ortama salınan UYA ve mikrobiyal proteinin bir kısmını kullanamazlar. Ruminantlar, UYA dan enerjilerini büyük oranda karşılarlar. Ayrıca mikrobiyal proteini de protein kaynağı olarak değerlendirirler (17).

### 2.1 Mikrobiyal selüloz parçalanması

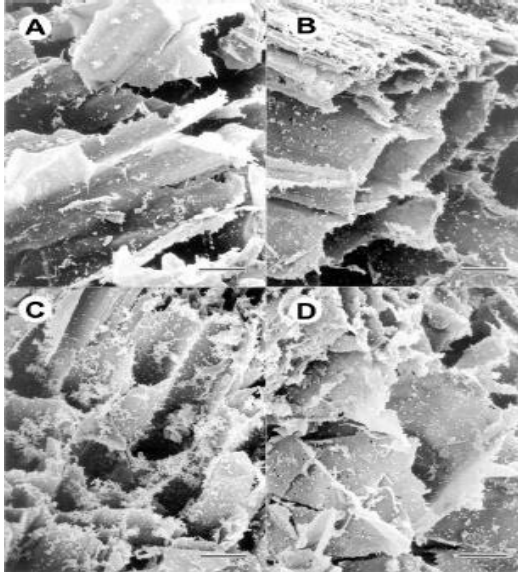
Bitki polisakkaritleri rumendeki enzimatik yıkımının gerçekleşme şeklini açıklığa kavuşturmak için bir araya gelen araştırmacılar; bakteri, fungus ve protozoalar tarafından üretilen polisakkaridaz ve glukozid hidrolaz

enzim gruplarının, polisakkaritlerin yıkımı için üretildiği konusunda ortak bir karara varmışlardır (15). Bitki polisakkaritleri, rumende, bakteri ve fungusların ekstraselüler enzim kompleksleri ile yıkılmakta ve oligosakkaritler oluşturulmaktadır (6). Selüloz, hemiselüloz, nişasta ve pektin ile ilgili sayısız çalışma yapılmıştır (1, 2, 3, 10, 11, 16). Bütün polisakkaritler içerisinde çözülebilir oligosakkaritler küçük oranda bulunmakta ve polisakkarit yıkımında etkili ve etkisiz birçok mikroorganizma görev almaktadır. Nişasta, hemiselüloz ve pektin hidrolizine muktedir gruplar sliatalı ve flagellatalı protozoalarda saptanmasına karşın selüloz yıkımında rol oynayanlar daha çok sliatalı protozoalardır.

Yoğun çalışmalara ve konunun önemine karşın mikrobiyal selüloz yıkımı ile ilgili konular hala net değildir. Bu durum, mikrobiyal selüloz kullanımının kendine özgü karmaşıklığı ve yöntemsel zorluklardan kaynaklanmaktadır. *Ruminococcus flavefaciens* tarafından üretilen ekstraselüler fibrolitik enzimlerin, kuru yonca otu yıkımındaki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada elde edilen

görüntüler şekil 2 de gösterilmiştir. Bu çalışmada  $\beta$ -glukanazın etkisi yüzeysel kalırken, ksilanazın etkisi daha fazla olmuştur. Bunun, selülozun gömülü olduğu hemiselüloz yapısından kaynaklandığı bildirilmiştir. Hemi-selülozun en çok bilineni ksilandır ve  $\beta$ -glukanaz aktivitesine engel teşkil eder. Ksilanaz ise aktivitesini göstererek ksilanı parçalar (12).

Enzim bileşenleri ve bu enzimlerin aktivitelerini gerçekleştirme yöntemleri ile ilgili açıklanamayan birçok konu olsa da enzimlerin yıkım aktiviteleri konusundaki aşağıda açıklanan gelişmeler incelendiğinde konu daha anlaşılır olacaktır.



Şekil 2. R. Flavefaciens 'in 48 saat in vitro inkubasyonu boyunca yonca kuru otunda ki yıkımına etkisi <sup>(1)</sup>

## 2.2 Selülozun enzimatik parçalanması

Selülozu parçalayan selüloz enzimleri ekzoglukanazlar, endoglukanazlar ve Betaglukozidazlar olmak üzere 3 gruba ayrılırlar (8).

**Ekzoglukanazlar (Sellobiyohidrolazlar (CelloBioHydrolase CBH); selüloz polime-**

rini bütün halinde veya endoglukanazlar tarafından parçalanmış bölgelerdeki ara ürünlerin uçlarından parçalamaya başlarlar (Şekil 3). Son ürünleri sellobiyozdur. Bu grup enzimlerin iç kısımlarında tüneli andıran bir boşluk bulunmaktadır ve selüloz polimerinin ucunu bu boşluk içine alarak aktivite gösterirler.

**Endoglukanazlar (EG) ; selüloz polimerinin orta kısmından (genelde amorf bölgeden) saldırır ve parçalarlar. Son ürünleri sellobiyozdur. Bu grup enzimlerin oyukları vasıtasıyla polimeri kavradıkları ve parçaladıkları bildirilmektedir. Bazı endoglukanazlar ise selüloz bağlayıcı modüller (CBM, Cellulose Binding Modül) vasıtasıyla selüloz polimerine bağlandıktan sonra polimeri parçalama işlemini gerçekleştirirler. Bu grubun aktivitesi daha yüksektir.**

**Betaglukozidazlar (BGL); ara ürün olan sellobiyozları glukoza parçalarlar. Aspergillus türlerinin  $\beta$ -glukozidazları, ortamda oluşan glukozla inhibe olmazken Trichoderma reesei  $\beta$ -glukozidazları ortamda oluşan glukoz ile inhibe olurlar (8).**

Selüloz enzim sistemleri 2 şekilde görev yaparlar:

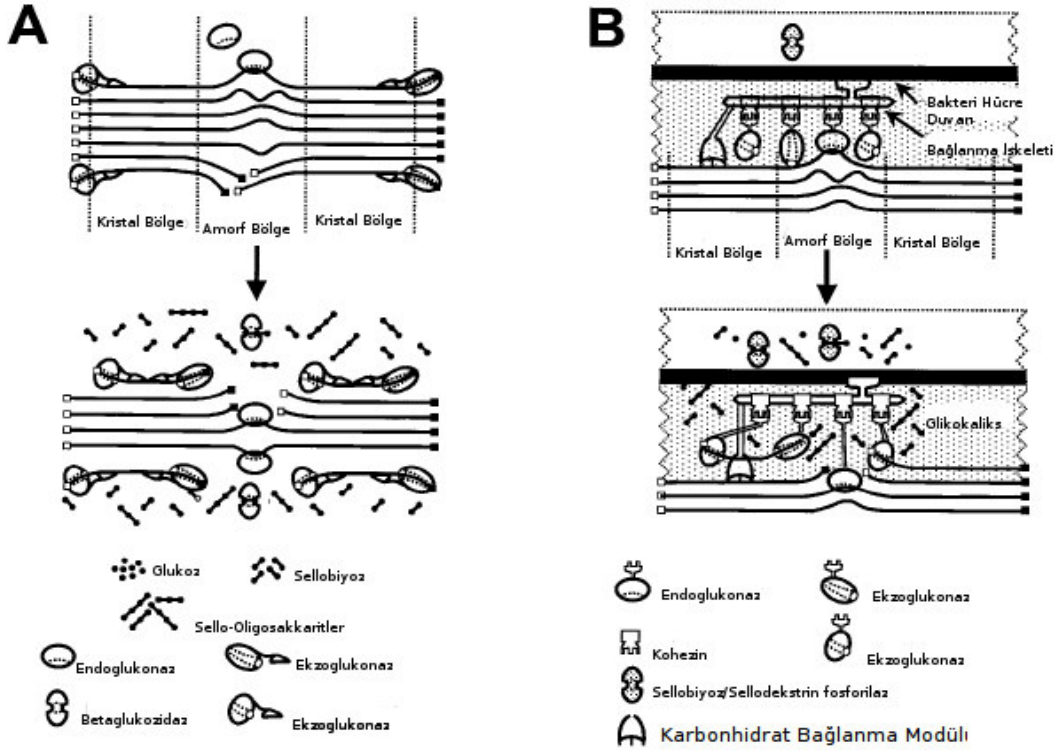
1. Kompleks olmayan selüloz enzim sistemleri: Bu sistemde, enzim grupları (ekzoglukanaz, endoglukanaz ve betaglukozidaz) bağımsız çalışır (Şekil 3). Genelde aerob ortamlarda görülür. *T. reesei*' nin 2 tip sellobiyohidrolazı vardır ( CBHI ve CBHII). Bunlar, polimerin indirgen olan ve indirgen olmayan uçlarına ayrı ayrı hücum ederler. *T. reesei*' nin tanımlanmış olan 5 endoglukanaz (EGI, EGII, EGIII, EGIV, EGV) ve 2  $\beta$ -glukozidaz enzimi (BGLI, BGLII) bulunmaktadır.

2. Kompleks enzim sistemleri: Kompleks selüloz sistemleri (selülozom) genelde anaerob

<sup>(1)</sup> A) Enzim Yok; B) 28 µg/mL  $\beta$ -glukanaz; C) 280 µg/mL  $\beta$ -glukanaz; D) 280 µg/mL  $\beta$ -ksilanaz. Çubuklar =  $10^5$  µm (12)

ortamlarda gözlenir. Bu enzim sistemini salgılayan mikroorganizmalar, ortamdaki diğer mikroorganizmalarla ortaklaşa (gerek selülitik gerekse selülitik olmayan) aktivite gösterirler. Bu enzim sistemleri, kompleks bir yapıda ve mikroorganizmanın hücre duvarına

tutunmuş olmaları nedeniyle hidroliz ürünleri kolayca hücre içine alınabilmektedir. Bakteriler, selülitik materyal üzerinde çoğalırken, selülozomlar çıkıntılar şeklinde hücre duvarında üretilirler (8).



Şekil 3. Amorf ve Kristal selülozun A: Kompleks olmayan B: Kompleks enzim sistemleriyle hidrolizi (8)

Bunlar hücre duvarına sıkı bir şekilde bağlıdır ve esneklikleri sayesinde selüloz kristaline de rahatlıkla bağlanabilirler (8).

Kompleks enzim sistemi üreten gruba dahil bir bakteri olan *C. thermocellum*' un tanımlanan enzim sisteminin yapısı aşağıdaki gibidir;

Bağlanma iskeleti (İskelet protein) (CipA) (Scaffolding Protein) üzerinde 22 adet katalitik modül mevcut olup bu modüller enzim aktivitesi gösterirler. Modüllerin selüloz polimerine sağlam bir şekilde bağlanmalarını sağlayan bir bağlayıcı modül (CBMIII) mevcuttur (Şekil 3).

Bağlanma iskelet üzerindeki 22 adet katalitik modülün en az 9 tanesi endoglukonaz, 4 tanesi ekzoglukanaz, 5 tanesi hemiselülaz, 1 tanesi kitinaz, 1 tanesi likenaz aktivitesi gösterir. Bu aktivite modülleri, sahip oldukları dokerin (dockerin) parçaları ile selülozom kompleksinde bulunan bağlanma iskeletinin kohezinlerine (cohesin) bağlıdır. Bu sistemde de enzimlerin çalışma şekilleri kompleks olmayan enzim sistemindeki ile aynıdır. Tek farklı tarafı ise,  $\beta$ -glukozidazlar mikroorganizma içerisinde bulunurlar ve oluşan sellobiyozlar hücre içine alınarak burada glukozaya çevrilir (8).

**Selülozom:** Doğal substratlar (selüloz, ksilan, pektin, sellobiyoz, likenan) çözünmezler, onları kullanan mikroorganizmalar, polisakkaritleri hücre içine taşınabilir ürünlere çevirmek için, hücre duvarına bağlı ya da serbest ekstraselüler enzimler kullanırlar (14). Çoklu enzim sistemleri bu yüzden selülozu etkin olarak parçalayabilmek için gereklidir. Bu durumdaki sistemler, ya serbest selülozların toplamından ya da çok bileşenli komplekslerden oluşur ki bunlara selülozom denir. Selülozom kavramı, selülazların yüksek moleküler ağırlıklı selüloolitik bir kompleks şeklinde organize olduğu bir yapı olarak yayınlanmıştır (7).

### 3.RUMEN DIŞI SELÜLOZ SİNDİRİMİ

Ruminantlarda selüloz sindirimi rumenle sınırlı değildir. Düşük miktarlarda da olsa rumen dışında da sindirim söz konusudur. Sindirim sistemine dışarıdan selüloz ilavesi yaparak, abomasum çıkışı, ileum öncesi ve sonrası takılan fistüller sayesinde toplanan örneklerin değerlendirildiği bir çalışmada; 400 g/gün verilen selüloz miktarının abomasum çıkışına kadar %38'inin, ileum öncesi fistüle kadar %13,4' ünün, ileum kısmında ise %25,4' ünün sindirildiği tespit edilmiştir (13).

### 4. SONUÇ

Ruminant beslemesinin en önemli ve temel besin kaynağı olan selüloz, protein kaynağı yemlere oranla daha ucuz olması ve doğada daha bol bulunması nedeniyle gerek yetiştiricilerin gerekse araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. Ancak uzun yıllardan beri yapılan çalışmalara rağmen hala selülozun yapısı, nasıl sindirildiği ve neden tam olarak sindirilemediği konuları netlik kazanmamıştır. Büyük oranda lignifikasyon ve rumen pH sı etkili olsa da bunların yanında daha birçok faktör selülozun sindirimini sınırlandırmak-

tadır. Son çalışmalar hücre duvarı unsurlarının tamamı üzerinden sindirimin artırılması veya lignini ortamdaki arındırma yönünde ilerlemektedir. Ancak bu konuda henüz somut bir veri yoktur. Özellikle gen mühendisliğindeki son gelişmeler ve genetik yapısı değiştirilmiş bakteriler üzerinde çalışmalar yoğunlaşsa da genlerde yapılan değişimlerin doğada nelere yol açacağı konusu henüz cevaplanmamış bir sorudur. Selüloz sindirilebilirliğinin artırılması ile ortaya çıkacak olan enerji sayesinde gerek hayvanın ihtiyaçlarının (yaşamsal ve verim) karşılanması gerekse besleme maliyetini düşüren etkisi nedeniyle üzerinde çalışılması gerekli bir konudur.

### 5. KAYNAKLAR

1. **Coen I A, Dehority B A** (1970) *Degradation and utilization of hemicellulose from intact forages by pure cultures of rumen bacteria*. Appl. Microbiol., 20:362
2. **Cotta M A** (1988) *Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria*. Appl. Environ. Microbiol. , 54:772
3. **Cotta M A** (1989) *Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of dextrans from soluble starch.*, Abst. 44 in proc. 20th Conf. Rumen Funcion. Chicago
4. **Çakır A, Aksoy A, Haşimoğlu S** (1995) *Çiftlik hayvanlarının uygulamalı beslenmesi ve yemlenmesi.*, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Of. Tes. Erzurum
5. **Fonty G, Joblin K N** (1991). *Rumen anaerobic fungi*. Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. , P:665. Academic press,Toronto
6. **Hoover W H, Stokes S R** (1991) *Balancing carbohydrates and proteins for optimum Rumenmicrobial yield*. J. Dairy Sci., 74:3630-3644
7. **Lamed R, Seter E, Kenig R, Bayer E A** (1983) *The cellulosome — a discrete cell surface organelle of Clostridium thermocellum which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities*, Biotechnol. Bioeng., 13,163-181.
8. **Lynd L R, Weimer P J, Van Zyl W H, Pretorius I S** (2002) *Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology*, Microbiology And Molecular Biology Reviews, 66, 506–577

9. **McAllister T A, Bae H D, Jones G A, Cheng K J** (1994) *Microbial attachment and feed digestion in the Rumen*. J. Anim. Sci., 72:3004-3018
10. **Morrison I M** (1976) *Xylanase (hemicellulase) activity in cell – free rumen fluid*. Carbohydr. Res., 47:129
11. **Osborn J M, Dehority B A** (1989) *Synergism in degradation and utilization of intake forage cellulose, hemicellulose, and pectin by three pure cultures of ruminal bacteria*. Appl. Environ. Microbiol., 55:2247
12. **Wang Y, McAllister T A, Yanke L J, Beauchemin K A, Morgavi D P, Rode L M, Yang W** (2001) *Effect of exogenous fibrolytic enzymes on the digestion of alfalfa hay and barley straw by cellulolytic ruminal bacteria*. J. Anim. Sci., 79, (Suppl. 1):285
13. **Warner R L, Mitchell G E, Little Jr C O** (1972) *Post Ruminant digestion of cellulose in wethers and steers*. J. of An. Sci., 34:1
14. **Warren R A J** (1996) *Microbial hydrolysis of polysaccharides*. Annu. Rev. Microbiol., 50,183–212
15. **Williams A G** (1988) *Pactom aflFecbhg the fomtion of polysaccharide-degrading enymes by Rumen micro-organisms*. Anim. Feed Sci. Technol., 21:191
16. **Wojciechowicz M** (1980) *A polygalacturonate. lyase produced by Lachnospira multiparus solated from the bovine rumen*. J. Gen. Microbiol., 117:193
17. **Wood T M, Garcia Campayo V** (1990) *Enzymology of cellulose degradation*. Biodegradation, 1,147–161
18. **Yıldız G** (2006) *Hayvan Beslemede Karbonhidratlar ve önemi* <http://veterinary.ankara.edu.tr/~yildiz/dersnotlari.htm>