



T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANAEROBİK GUT FUNGUSU İZOLASYONU,
MOLEKÜLER TANIMLAMASI VE LİNOLEAT
İZOMERAZ ENZİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMA**

SÜMEYYE KARACA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2019

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANAEROBİK GUT FUNGUSU İZOLASYONU, MOLEKÜLER
TANIMLANMASI VE LİNOLEAT İZOMERAZ ENZİMİ ÜZERİNE
ARAŞTIRMA**

SÜMEYYE KARACA

Bu tez,
Zootekni Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS
derecesi için hazırlanmıştır

KAHRAMANMARAŞ 2019

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Sümeyye KARACA tarafından hazırlanan “ANAEROBİK GUT FUNGUSU İZOLASYONU, MOLEKÜLER TANIMLANMASI VE LİNOLEAT İZOMERAZ ENZİMİ ÜZERİNE ARAŞTIRMA” adlı bu tez, jürimiz tarafından 08 / 08 / 2019 tarihinde oy birliği ile Zootekni Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Sait EKİNCİ (DANIŞMAN)

Zootekni Anabilim Dalı, Kahramanmaraş

Sütçü İmam Üniversitesi

Prof. Dr. Emin ÖZKÖSE (ÜYE)

Zootekni Anabilim Dalı, Kahramanmaraş

Sütçü İmam Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Bülent KAR (ÜYE)

Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Munzur Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Mustafa YAZICI

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

Sümeyye KARACA



Bu çalışma KSÜ BAP tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2016 / 3-31 YLS

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

**ANAEROBİK GUT FUNGUSU İZOLASYONU, MOLEKÜLER TANIMLANMASI
VE LİNOLEAT İZOMERAZ ENZİMİ ÜZERİNE ÇALIŞMA**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SÜMEYYE KARACA

ÖZET

Rumen mikroorganizmaların hayvanların tüketmiş oldukları bitkisel materyalin enzimatik yollarla parçalanmasında aldıkları rolün yanı sıra son yıllarda bu grubun rumen içerisindeki olası diğer fonksiyonları yoğun ilgi alanı oluşturmaktadır. Bu fonksiyonlardan birini de linoleik asitten konjuge linoleik asit sentezinde almış olduğu roldür. Linoleik asitten stearik aside kadar olan transformasyonda rumen bakterilerinin biyohidrojesnasyon faaliyetleri yoğun olarak çalışılmış olmasına karşın rumen funguslarının bu işlemde aldıkları görev hakkındaki bilgiler henüz oldukça kısıtlıdır. Bu çalışmada rumen funguslarının linoleik asitten konjuge linoleik asite transformasyonu araştırılmıştır.

Bu amaçla KSÜ BİGEM laboratuvarında inek dışkısından anaerobik gut fungusu izolasyonu yapılmış ve saflaştırılan izolatlar morfolojik ve moleküler olarak tanımlanmıştır. İzolatlardan saflaştırılmış ve GMLF54 olarak isimlendirilen fungus *Neocallimastix sp* olarak tanımlanmıştır. Elde edilen anaerobik gut fungusu fungal genomik DNA'dan PZR amplifikasyonu yapılmış ve moleküler kimliği oluşturulmuştur. Bu izolat *Neocallimastix frontalis sp.* fungusu olarak tanımlanmıştır. Daha sonra bu fungusun linoleat izomeraz enzim üretimi üzerine çalışma yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Anaerobik gut fungusları, Linoleik asit, Konjuge linoleik asit, *Neocallimastix*, Linoleat izomeraz enzim.

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Zootekni Anabilim Dalı, Ağustos / 2019

Danışman: Prof. Dr. M. Sait EKİNCİ

Sayfa sayısı: 58

ISOLATION AND MOLECULAR DETERMINATION OF ANAEROBIC GUT FUNGUS AND STUDY ON THE LINOLEATE ISOMERASE ENZYME

(M.Sc. THESIS)

SÜMEYYE KARACA

ABSTRACT

Besides of their roles in enzymatic biodegradation of plant material, anaerobic gut fungi (AGF) have been subjected to extensive studies about their possible functions in the gastro intestinal tracts of various mammals, such as formation of conjugated linoleic acid from dietary linoleic acid. The role of rumen bacteria on the biohydrogenation process of the linoleic acid to the stearic acid has been extensively studied. However, search on the role of AGF in this unique niche has been, hitherto, neglected. In this work, an anaerobic gut fungal isolate has been purified from freshly voided faecal sample of cow, designated as GMLF54 and deposited in the culture collection of Biotechnology and Gene Engineering Laboratory of KSÜ. Isolate GMLF54 was putatively identified as *Neocallimastix* sp according to its morphological characters and supporting molecular data (ITS region sequence). Moreover Linoleate isomerase enzyme of this isolate, responsible for the formation of conjugated linoleic acid (CLA) from linoleic acid, was partially characterised.

Keywords: Anaerobic gut fungi, Conjugated linoleic acid, Linoleic acid, , Neocallimastix, Linoleate isomerase enzyme

Kahramanmaraş Sütçü İmam University

Institute for Graduate Studies in Science and Technology

Department of Animal Science, August / 2019

Supervisor: Prof. Dr. M. Sait EKİNCİ

Page number: 58

TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőması sűresince engin bilgi ve tecrűbelerinden faydalandıđım, çalıőmamın her aőamasında sađladıđı bilimsel katkılarından dolayı danıőman hocam Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ'ye ve yine kıymetli tecrűbelerinden faydalandıđım hocam Prof. Dr. Emin ŐZKŐSE'ye, her fırsatta bana yardımcı olan Kűbra EKİNCİ, Halit YŪCEL ve Tolga TOLUN'a çalıőmalarım boyunca bana destek olan laboratuvar arkadaşlarıma ve bu gűnlere gelmemde her tűrlű maddi ve manevi desteklerini gűrdűđűm aileme teőekkűrlerimi sunarım.

Sűmeyye KARACA

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR	X
1. GİRİŞ	1
1.1. Ruminantlar ve Sindirim Sistemleri	1
1.1.1. Rumen	2
1.1.2. Retikulum	2
1.1.3. Omasum	2
1.1.4. Abomasum	2
1.2. Rumen Mikroorganizmaları	3
1.2.1. Rumen Bakterileri	3
1.2.2. Rumen Arkea Grubu	4
1.2.3. Rumen Protozoa Grubu	4
1.2.4. Rumen Bakteriyofajları	4
1.2.5. Anaerobik Gut-Fungusları	5
1.2.5.1. Tarihçesi	5
1.2.5.2. Morfolojisi	5
1.2.5.3. Taksonomisi	5
1.2.5.4. Yaşam Döngüsü	6
1.2.5.5. Ekolojisi	7
1.2.5.6. Rumen Açısından Önemi	7
1.2.5.8. Moleküler Kimliği	7
1.3. Lipitler	8
1.3.1. Lipitlerin Genel Özellikleri	8
1.3.2. Lipitlerin Sınıflandırılması	8
1.3.3. Yağ Asitlerinin İsimlendirilmesi	9

1.3.4. Yağ Asitlerinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	9
1.3.5. Yağ Asitlerinin Sınıflandırılması	9
1.3.5.1. Doymuş Yağ Asitleri	9
1.3.5.2. Doymamış Yağ Asitleri	10
1.3.5.3. Trans Yağ Asitleri	11
1.4. Konjuge Linoleik Asit (KLA).....	11
1.4.1. KLA'nın Yapısı.....	12
1.4.2. KLA'nın Biyosentezi	12
1.4.3. Rumende KLA Biyohidrojenasyonu.....	12
1.4.4. Dokularda KLA Sentezi	13
1.4.5. Gıdalarda KLA Varlığı	13
1.4.6. KLA'nın Biyolojik Etkileri	13
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	15
3. TEZİN AMACI VE ÖNEMİ.....	18
4. MATERYAL VE METOD	19
4.1. Materyal	19
4.1.1. Kullanılan Kimyasallar	19
4.1.3. Kullanılan Anaerobik Gut Fungus	19
4.2. Metod	19
4.2.1. Fungus İzolasyonu İçin Gerekli Dışkı Örneklerinin Toplanması ve Saklanması	19
4.2.2. Rumen Sıvısının Hazırlanması ve Muhafaza Edilmesi.....	19
4.2.3. Anaerobik Besiyerinin Hazırlanması	20
4.2.3.1. Mineral Solüsyon I	20
4.2.3.2. Mineral Solüsyon II	21
4.2.3.3. Anaerobik Besiyerinin Hazırlanması	21
4.2.4. Anaerobik Koşullarda Dışkıdan Fungus İzolasyonu ve İnkübasyonu	23
4.2.5. Anaerobik Gut Funguslarının Alt Kültür Çalışması	24
4.2.6. Fungal izolatların Saflaştırılması.....	24
4.2.7. Geliştirilen Fungusların Görüntülenmesi	24
4.2.8. Antibiyotik Muamelesi ile Bakteri İnhibisyonu.....	24
4.2.9. Anaerobik Fungusların Cins Düzeyinde Sınıflandırılması	25
4.2.10. Anaerobik Gut Funguslarının Stoğa Alınması	26
4.3. Moleküler Metodlar	27

4.3.1. DNA İzolasyonu.....	27
4.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulaması.....	28
4.3.3. Jel Elektroforez Uygulaması	29
4.4. Anaerobik Gut Funguslarında KLA Sentez Metodları	29
4.4.1. LA Stok Solüsyon Hazırlaması	29
4.4.2. Anaerobik Mikroorganizmaların KLA Sentez Süreci.....	29
4.4.3. KLA'nın Spektrofotometrik Analizi	30
4.4.4. Anaerobik Mikroorganizmaların Farklı pH 'larda KLA Sentez Süreci.....	30
4.4.5. Farklı pH'larda KLA'nın Spektrofotometrik Analizi	32
5. BULGULAR ve TARTIŞMA	33
5.1. İzolasyon İçin Gerekli Dışkınn Toplanması ve AGF İzolasyonu.....	33
5.2. İzolatın Morfolojik Tanımlanması.....	33
5.3. Tanımlanmış AGF'nin Kültüre Alınması	34
5.4. DNA İzolasyonu ve PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	35
5.6. Linoleik Asitin Farklı Sürelerde AGF Gelişimi Üzerine Etkileri.....	39
5.5. Farklı pH ve Linoleik Asitin AGF Gelişimi Üzerine Etkileri	45
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Cis ve Trans izomerlerinin açık formülleri	11
Şekil 4.1 Kahramanmaraş mezbanesinde kesilen ruminant hayvanardan elde edilen rumen sıvısının anaerobik koşullarda gerekli aşamalardan geçirilerek temin edilmesi.....	20
Şekil 4.2. kahramanmaraş ili çevresinden elde edilen inek dışkılarından yapılan fungus izolasyonunda dışkının izlasyona hazırlanması.....	23
Şekil 4.3. CTAB metoduna göre DNA izolasyonu yapılırken hücre duvarının kırılarak DNA 'nın elde edilebilmesi amacıyla hücre kırma işlemi.....	28
Şekil 4.4. Erlenmayer şişelerine dağıtılarak 5 farklı şekilde pH düzeyi ayarlanacak enerji kaynağı glikozlu kullanılarak hazırlanan besiyeri çözeltisi.....	31
Şekil 4.5. pH düzeyleri ayarlanmak üzere erlenmayer şişelerine alınan besiyer çözeltisine HCL ve NaOH eklenerek pH ölçer ile ayarlanması (a), pH düzeyi ayarlanmış çözeltinin anaerobik koşullarda Hungate tüplerine dağılması (b).....	31
Şekil 5.1. GMLF54 <i>Neocallimastix frontalis</i> suşunun mikroskop görüntüsü	34
Şekil 5.2. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi BİGEM kültür koleksiyonunun sıvı azot (-196°C) tankı içerisinde muhafaza edilmesi	35
Şekil 5.3.N.frontalis'e (a,b,c ve d aynı izolat) ait 5.8S(185 bç) , ITS1(215bç), ITS2(225bç) ve 18S(175bç) bölgelerini içeren ITS adı verilen kapsamlı primer yardımı ile toplamda yaklaşık olarak 800 bç uzunluğundaki bölgenin PZR görüntüsü.	36
Şekil 5.4. GMLF54 (<i>Neocallimastix frontalis</i>) DNA'sına ait PZR işlemi sonucunda kısmen ITS1 bölgesine ait kromotogram	37
Şekil 5.5. GMLF54'e ait sekans diziliminin NCBI veri tabanında blast sonucu <i>N.frontalis</i> 'e ait olduğunu göstermektedir.	37
Şekil 5.6. GMLF54 (<i>Neocallimastix frontalis</i>) suşunun ITS bölgesi DNA dizileme sonucu.	38
Şekil 5.8. AGF'da 5.dk'da linoleik asitin KLA ya dönüşme grafiği.....	41
Şekil 5.9. AGF'da 15.dk'da linoleik asitin KLA ya dönüşme grafiği.....	41
Şekil 5.10.AGF'da 30.dk'da linoleik asitin KLA ya dönüşme grafiği.....	42
Şekil 5.11. AGF'da 45.dk'da linoleik asitin KLA ya dönüşme grafiği.....	43
Şekil 5.12. 60.dk'da linoleik asitin KLA ya dönüşme grafiği.....	43
Şekil 5.13. 90.dk'da linoleik asitin KLA ya dönüşme grafiği.....	44
Şekil 5.14. 120.dk'da linoleik asitin KLA ya dönüşme grafiği.....	44

Şekil 5.15. AGF'larında sabit sıcaklıkta farklı sürelerde ve farklı substrat düzeylerinde linoleik asitin KLA'ya dönüşme grafiği	45
Şekil 5.16. Besiyeri pH5.6 düzeyinde linoleik asitin KLA ya dönüştürme grafiği.....	46
Şekil 5.17 Besiyeri pH6.0 düzeyinde linoleik asitin KLA ya dönüştürme grafiği.....	47
Şekil 5.18 Besiyeri pH6.4 düzeyinde linoleik asitin KLA ya dönüştürme grafiği.....	47
Şekil 5.19 Besiyeri pH6.8 düzeyinde linoleik asitin KLA ya dönüştürme grafiği.....	48
Şekil 5.20 Besiyeri pH7.2 düzeyinde linoleik asitin KLA ya dönüştürme grafiği.....	49
Şekil 5.21 AGF'larında besiyerinin farklı pH düzeylerinde ayarlanması sonucu linoleik asitin KLA'ya dönüşme grafiği	49



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Morfolojik ve moleküler tanımlaması yapılmış anaerobik fungusların taksonomi	6
Çizelge:1.2 Karbon sayısına göre yağ asitlerinin sınıflandırılması.....	9
Çizelge: 1.3 Önemli doymuş yağ asitlerinin bazı özellikleri	10
Çizelge:1.4 Önemli doymamış yağ asitlerinin bazı özellikleri	10
Çizelge 2.1 Bazı çiğ et türlerindeki ortalama KLA miktarı	16
Çizelge.4.1. Anaerobik besiyeri hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları	22
Çizelge.4.2. Anaerobik gut fungusların bakteriyel kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak için hazırlanan antibiyotik karışım içeriği	25
Çizelge.4.3 Anaerobik gut fungusların sınıflandırılması için kullanılan bazı morfolojik özellikler	26
Çizelge 4.4 ITS bölgesine ait primer dizisi	28
Çizelge .4.5 Kullanılan PZR çalışma şartları	28
Çizelge 5.1. GMLF54 (<i>Neocallimastix frontalis</i>) suşunun soy ağacı çizelgesi	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGF	: Anaerobik Gut Fungusları
BİGEM	: Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği Laboratuarı
CTAB	: Hexadecyltrimethylammonium bromide
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dH₂O	: Distile su
gr	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
kb	: Kilobaz
KLA	: Konjuge Linoleik Asit
lt	: Litre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
nm	: Nanometre
sp.	: Tür
U.Y.	: Uçucu Yağ
UYA	: Uçucu yağ asiti

1. GİRİŞ

1.1. Ruminantlar ve Sindirim Sistemleri

Ruminantlar, anatomik yapıları bakımından tek mideliler (kedi, köpek, domuz), kanatlı hayvanlar (tavuk, hindi, deve kuşu) ve ruminant olmayan herbivorlardan (at, tavşan) farklı olarak 4 bölümden oluşan bir mide yapısına ve bu özellikleri nedeni ile farklı bir sindirim sistemine sahiptirler. Ruminantlar tükettikleri yemler bakımından herbivor (otla beslenen) hayvanlar olmakla birlikte sindirim sistemindeki mikrobiyal aktivite bakımından da ön midelerini kullanmaları nedeniyle pregastrik fermentörler grubunda yer alırlar. Ruminantların sindirim sistemi sırasıyla ağızdan başlayarak, ösefagus 4 bölümlü yapıya sahip mideleri (rumen, reticulum, omasum, abomasum), devamında ince, kalınbağırsaklar ve anüs ile son bulur. Ruminant hayvanlardaki ağız yapısı diğer memelilerden farklı biçimdedir. Beslenmeleri sırasında yemleri alabilmek için dil ve dudaklarının yanı sıra, alt çenelerindeki kesici dişleri ve üst çenelerinde kesici dişleri bulunmadığından diğer diş bloğunu kullanmak zorundadırlar. Ayrıca çok az sayıda ruminant köpek dişlerine sahiptir. Ruminant hayvanlar sahip oldukları güçlü azı dişleri ve alt çenelerinin hareketli oluşu sayesinde alınan yemlerin en verimli şekilde çiğnenmesini sağlar (Kutlu ve ark., 2005).

Yabani hayatta ruminant hayvanlar ekosistemdeki avcı düşmanlarından korunmak amacıyla yemlerini tam olarak çiğneyip sindiremeden yutmak zorunda kaldıkları için aldıkları bu besinleri güvende olduklarını hissettikleri anlarda tekrar sindirmeye ihtiyaç duyarlar. Dolayısıyla ruminant hayvanların sindiremedikleri bu besinleri tam olarak sindirebilmek için bir tür kontrollü kusma refleksi göstererek, yarı sıvı mide içeriğinde bulundukları farklı büyüklükteki katı partikülleri tekrar çiğneyip yutmak üzere ağızlarına getirdikleri bu olay ruminasyon olarak tanımlanır (Kutlu ve ark., 2005). Geviş getirme olarak da bilinen bu işlem, sindirim sisteminde ağızdan başlayarak yemek borusu, diyafram ve ön midelerin eş zamanlı olarak gerçekleştirdiği bir olaydır. Alınan besin içeriklerine bağlı olarak ergin hayvanlarda ruminasyon işlemi, ortalama günlük 8 saat olarak gerçekleşmektedir. Kaba ve selüloz içeriği yüksek olan yemlerin sindirimi zor olduğundan ruminasyon süreleri de uzundur (Kutlu ve ark., 2005).

Ruminant hayvanların sindirim mekanizması, aldıkları besinleri tek seferde sindirememeleri ve geviş getirmeleri nedeniyle diğer hayvanlardan daha etkili bir şekilde gerçekleşmektedir. Sindirim mekanizmasının gerçekleştiği bölümler; rumen (işkembe),

retikulum (börkenek), omasum (kırkbayır) ve abomasum (şirden) olarak 4 kısımdan oluşmaktadır (Hungate, 1966).

1.1.1. Rumen

Midenin oransal açıdan en büyük kısmını oluşturan rumen; bakteri, protozoa, fungus, arkea, mikoplazma ve bakteriyofaj içeriği bakımından da büyük bir mikroorganizma yaşam alanına sahiptir. Bu mikroorganizmalar temel olarak kaba yemlerin sindirilmesinde, proteinlerin yanı sıra B grubu vitaminler ve K vitamininin de sentezlenmesinde görev alırlar. Yapısı itibari ile normal yaşamsal faaliyetlerini sürdüren bir hayvanın rumen içi sıcaklığı 38-41°C ve pH'sı 5,5-7,0 arasında değişmektedir. Sahip olduğu sıcaklık ve pH değerleri sayesinde rumen; anaerobik mikroorganizmaların %95-99'u için elverişli bir yaşam alanı sunmaktadır. Çiğnemeye kısmen sindirime uğrayan yemler rumende fermentasyona uğratarak retikulum, omasum, abomasumdan geçerek ince bağırsaklara ulaşırlar (Patterson, 1992).

1.1.2. Retikulum

Rumenden herhangi bir yapıyla tam olarak ayrılmamış olan retikulum, yapısı itibari ile rumenle benzer nitelikte mikroorganizmalar açısından verimli bir yaşam alanına sahip olmasının yanı sıra alınan yemlerin ruminasyon sırasında ağıza getirilmesini ruminasyon sonrasında ise rumen ve omasuma taşınmasını sağlamaktadır. Ayrıca yemlerle alınan çivi, plastik, taş vb. gibi yabancı cisimlerin ruminasyon sırasında ağıza götürülmeden bu bölümde saklanması sağlanır (Kutlu ve ark., 2005).

1.1.3. Omasum

Omasum, öncelikle alınan yemlerin parçalanıp ufalanması ile birlikte, başta su emilimi olmak üzere bazı emilim olaylarının da gerçekleştiği, sonrasında bu yemlerin sindirim sisteminin aşağı kısımlarına aktarılmasının sağlandığı bölümdür. Bu fonksiyonlarının dışında bazı fonksiyonları hala tam anlamıyla bilinmemektedir (Kutlu ve ark., 2005).

1.1.4. Abomasum

Abomasum, midenin pepsinojen ve HCl asit salgılanmasını sağlayan bölümüdür. Sindirim sisteminde pH değerlerinin en düşük olduğu ve kısmi gastrik yıkımın gerçekleştiği bölme konumundadır. Ergin ruminantlarda ön mide görevini üstlenen rumen,

preruminantlarda gelişmemiş olduğundan abomasum aktif mide görevini üstlenmektedir. Bu nedenle genç ruminantlarda emilen sütün, rumen fermantasyonuna uğramadan doğrudan abomasuma ulaşması sağlanır. Preruminantlarda kaba ve kesif yem alımının başlaması ile birlikte ön mide olan rumen gelişmeye başlar. Gelişim sürecinin kuzu ve oğlaklarda 9 haftalık dönemde, buzağılarda ise 6-9 aylık dönemden sonra tamamlandığı gözlenmektedir (Kutlu ve ark., 2005).

1.2. Rumen Mikroorganizmaları

Kompleks bir mikroorganizma yaşam alanına sahip olan rumen, büyük miktarda bitkisel materyalin tutulmasını ve bu materyalin bünyesinde bulundurduğu mikroorganizmalar tarafından parçalanmasını sağlar. Ayrıca rumen, mikroflorasında barındırdığı anaerobik mikroorganizmalar tarafından kullanılan enerjinin korunmasına yardımcı olan anaerobik bir yaşam alanı formatındadır (Selinger ve ark., 1996).

1.2.1. Rumen Bakterileri

Rumen mikroflorasının en büyük bölümünü oluşturan bakterilerin bugüne kadar yaklaşık olarak yarısı kültüre alınabilmiş olmasına rağmen kültüre alınamayan bakterilerle ilgili bilimsel veriler sınırlıdır (Kobayashi, 2006). Morfolojik açıdan şekillerine göre çubuk, kok, kokobasil ve spiral olarak ayrılan bakterilerin boyutları 0.3-50 µm arasında değişmektedir (Krause ve Russell, 1996).

Rumende fakültatif anaeroblar da bulunmasına rağmen rumen bakterilerinin çoğu zorunlu anaerob olup, fakültatif anaerob bakterilerin sayıları 10^7 - 10^8 arasında değişmektedir (Özel ve Sarıççek, 2009). İkiyüzden fazla bakteri türü rumenden izole edilmiştir. Bakteriler, etki ettikleri substrata, gram boyası ile boyanma durumlarına, şekillerine, ürettikleri son ürün çeşidine göre sınıflandırılmaktadırlar (Alataş ve Umucalılar, 2011).

Rumen bakterilerinin bazıları, selüloz gibi polimerleri hidrolizlerinin sonucunda oluşan şekerleri de uçucu yağ asitlerine fermente ederler. Rumende en yaygın olarak bulunan iki selülitik anaerob; *Fibrobacter succinogenes* ve *Ruminococcus albus*' tur. Her iki bakterinin de selülaz üretmesine rağmen, *F. succinogenes* gram negatif bir bakteridir ve selülozu parçalamak için yapısında periplazmik bir selülaz bulundurmaktadır. Bunun için selülozu sindirirken *Fibrobacter* hücreleri selüloz fibriline tutunmalıdır. *R. albus* ise selülaz enzimini hücre dışına yani rumene salgılar ve selülozu sindirir. Her iki durumda da serbest

glikoz üretilir ve bundan da fermentatif anaeroblar faydalanır (Madigan ve Martinko, 2010).

1.2.2. Rumen Arkea Grubu

Arkea grubu yapısal özellikleri nedeni ile bakterilerden ve ökaryotik canlılardan ayrı şekilde sınıflandırılmaktadır (Eckburg ve ark., 2003). Arkea grubu 28 cins ve 113 tür olarak sınıflandırılmıştır ancak bunun yalnızca 5 cinse bağlı 7 tür kadar az bir kısmı rumenden izole edilmiş ve kültüre alınmıştır (Janssen, PH, ve Kirs, M., 2008). Rumende fermantasyon sırasında açığa çıkan ve hidrojenin uzaklaştırılmasında görev alan metanojenler arkea grubu bünyesinde yer alır. Metanojenler rumen fermantasyonunun sürekliliğini sağlarken, ruminantlar tarafından kullanılabilen bir enerji kaynağı olmadığı için ruminantlar açısından enerji kaybına sebep olur (Kamra, 2005).

1.2.3. Rumen Protozoa Grubu

Protozoa grubu 10^5 - 10^6 ml⁻¹ populasyon büyüklüğü ile ruminantların canlı ağırlık artışında ve alınan besinlerin sindirimini kolaylaştırılmasında pozitif bir etkiye sahiptir (Williams, 1986). Protozoa grubunda kamçı yoğunluğu 10^3 - 10^4 ml⁻¹ olan kamçılı protozoa bulunmakla birlikte büyük çoğunluğu silli protozoa olup sillerin miktarı 10^5 - 10^6 ml⁻¹ dir ve bu siller patojen olmayıp anaerobdurlar (Ogimoto ve İmai, 1981). Ayrıca protozoa grubu, bakterileri sindirebilme özelliğinden dolayı bakteri varlığının istenilen seviyede tutulmasını sağlamada görev alır (Coleman, 1975; Dehority, 1998). Protozoaların gruplarından aminio asitleri iyi dengelenmiş silli grup konak hayvanın beslenmesinde önemli rol oynarken bunun nedeninin bakterilere göre kıyasla daha önemli azot kaynağı olmasıdır (Hungate, 1978). uygun koşullar sağlandığında siller toplam fermentasyon ürünlerinin %60'ını meydana getirirken mikrobiyal azotun %40'ını oluşturmaktadır (Hungate, 1966)

1.2.4. Rumen Bakteriyofajları

Rumen bakteriyofajları besinlerin parçalanmasını sağladıkları için zorunlu patojen olarak da bilinen ve farklı bakterilere etki eden aynı zamanda hem rumen içerisinde bakteri varlığının istenilen seviyede tutulmasını hem de rumen için gerekli olmayan bakterilerin azaltılmasını sağlayan virüslerdir. Bakteriyofaj sayısı her hayvan için spesifiktir ve bu sayı beslenme sırasında ve sonrasında değişkenlik göstermektedir (Kamra, 2005).

1.2.5. Anaerobik Gut-Fungusları

1.2.5.1. Tarihçesi

İlk olarak Liebetanz (1910) ve Braune (1913) tarafından ruminal sıvıda gözlemlenen bir grup küçük hareketli mikroorganizma kamçılı protozoa olarak tanımlanmıştır ve Sırasıyla *Sphaeromonas communis* ve *Callimastix frontalis* olarak rapor edilmiştir. Anaerobik gut-fungusların ilk geçerli tanımı Orpin (1974-1975) *Neocallimastix frontalis* ismiyle yapılmıştır. Orpin'in devam niteliğindeki çalışmalarında bu yapının hücre duvarında kitin varlığının gözlemlenmesi sonucunda bu mikroorganizmaların fungus olduğu netleşmesine rağmen rumenin diğer önemli populasyonlarıyla kıyaslandığında cins ve türlerinin belirlenmesinde kullanılacak olan kriterler üzerinde bilimsel bir fikir birliği sağlanamamıştır (Ho ve Barr, 1995). Cins ve türlerin belirlenmesindeki bu kriterler hala tartışma konusudur.

1.2.5.2. Morfolojisi

Morfolojik olarak anaerobik gut funguslar filamentli ve küresel olmak üzere iki temel gruba ayrılırken monosentrik ve polisentrik olmak üzere iki gruba da ayrılmaktadır. Monosentrik funguslar bir tane spor kesesi içerirken polisentrikler ise birden fazla spor kesesi yani üreme bölgesi içermektedirler (Li ve ark., 1997). Rizoid yapılarının filamentli veya küresel olması dışında zoosporlarının tek kamçılı veya çok kamçılı olması anaerobik gut funguslarını birbirinden ayırmada da kullanılır (Theodorou, 1996).

1.2.5.3. Taksonomisi

Anaerobik fungusların cins düzeyinde tanımlanabilmesi için ışık mikroskobu kullanılarak yapılan görüntüleme yeterlidir (Orpin, 1994). Yapılan morfolojik görüntüleme ve moleküler tanımlama sonucu elde edilen anaerobik gut fungusların taksonomisi çizelge 1.1'deki şekilde belirlenmiştir.

Çizelge 1.1 Morfolojik ve moleküler tanımlaması yapılmış anaerobik fungusların taksonomi (Joshi ve ark., 2018)

Alem	Fungi
Filum	<i>Neocallimastigomycota</i>
Sınıf	<i>Neocallimastigomycetes</i>
Takım	<i>Neocallimastigales</i>
Familya	<i>Neocallimastigaceae</i>
Cinsler	<i>Caecomycetes</i> (monosentrik, tek kamçılı zoospor) <i>Neocallimastix</i> (monosentrik, çok kamçılı zoospor) <i>Piromyces</i> (monosentrik, tek kamçılı zoospor) <i>Orpinomyces</i> (polisentrik, çok kamçılı zoospor) <i>Anaeromyces</i> (polisentrik, tek kamçılı zoospor) <i>Cyllamyces</i> (polisentrik, tek kamçılı zoospor) <i>Feramyces</i> (monosentrik, çok kamçılı zoospor) <i>Pecoramyces</i> (monosentrik, tek kamçılı zoospor) <i>Oontomyces</i> (monosentrik, tek kamçılı zoospor) <i>Buwchfawromyces</i> (monosentrik, tek kamçılı zoospor) <i>Liebetanzomyces</i> (monosentrik, tek kamçılı zoospor)

1.2.5.4. Yaşam Döngüsü

Yaşam döngüsü hareketli bir zoospor safhası ve yaşam döngüsü üzerine hareketsiz vejetatif tallus safhası olmak üzere 2 aşamadan oluşan anaerobik gut-funguslarının dışkı ve rumendeki miktarlarının belirlenmesi rumen bakterilerinden daha güçtür. Fungus miktarının tespiti için yapılan sayım işlemi zoosporlarını sayarak (birimi tallus oluşturma ünitesi; TFU) ve bir seri dilüsyon işlemi (birimi en muhtemel sayı; MPN) uygulanarak 2 metotla yapılır (Orpin, 1975; Theodorou ve ark., 1990).

Anaerobik gut-fungusları, yaşam döngülerinin hareketli döneminde bitki parçasına flagellar kutuptan tutunup (Munn ve ark., 1981) sonrasında çimlenerek spor kesesi ile rizoidleri içeren büyük vejetatif bir yapı (fungal tallus) oluştururlar. Zoospor çimlenmesi

endojen veya eksojen olabilir. Yani çekirdek tallus'a göç eder yada sporangia'da kalır. Bu çimlenme şekli *Neocallimastix* funguslarında gözlenmektedir (Ozkose ve ark., 2001). Anaerobik gut-funguslarının yaşam döngülerini tamamlamaları besiyeri çözeltisinde kullanılan enerji kaynağına bağlı olarak kültüre alındıktan sonra yaklaşık 18-32 saati kapsamaktadır (Ozkose ve ark., 2001).

1.2.5.5. Ekolojisi

Anaerobik gut funguslar ruminant hayvanın sindirim kanalında (rumen, retikulum, omasum vb.) bulunan bitki parçalarının üzerinde yayılış göstermektedir (Gruninger ve ark. 2014).

1.2.5.6. Rumen Açısından Önemi

Beslenme şekli açısından herbivor olan hayvanlarda sindirim sistemleri beslenmek için aldıkları bitkisel materyallerin yapısına ve sindirim sırasında parçalanan besinlerin biyokütle büyüklüklerine bağlıdır. Ruminant hayvanlar aldıkları besinleri uzun süre sindirime uğratırlar. Sindirim işleminin büyük kısmı alınan besinlerin yaklaşık 60-90 saat sindirime uğratıldığı rumen kısmıdır. Alınan bitkileri etkin bir şekilde sindirebilen herbivorların başında gelen rumenintlar Rumenlerindeki mikroorganizmalar sayesinde fermentasyona uğratarak asetik asit bütirik asit metan ve CO₂ 'e dönüştürülmekte olup fermentasyon sonucunda enerji ve karbon kaynağı olarak kullanılmak üzere uçucu yağ asitlerinin kana emilimi sağlanmaktadır (Bergman, 1990).

Ruminantların beslenmesinde alınan bitkisel besinlerin lif bakımından zengin olan bitki hücre duvarları bu hayvanların sindirim sisteminde özellikle Rumenlerinde barındırdıkları mikroorganizmalar sayesinde parçalanmaktadır. Rumenin barındırdığı mikroorganizmalardan anaerob gut fungusları salgıladıkları enzimler sayesinde bitki hücre duvarları ve selülozun sindirimi sağlamaktadır.

1.2.5.8. Moleküler Kimliği

Anaerobik funguslar Neocallimastigomycota 'nın dallarında farklı gruplar içeren, Neocallimasticaceae familyasının morfolojik ve moleküler verilerle iyi desteklenen anaerobik fungus grupları içeren benzersiz bir filogenetiği kapsamaktadır (Li ve Heath, 1992). *Neocallimasticaceae* familyasına yerleştirilen tüm cinsler tallus, rizoid ve zoosporlarına göre sınıflandırmaya alınmıştır.

1.3. Lipitler

1.3.1. Lipitlerin Genel Özellikleri

Lipitler, canlıların yaşam döngüsünün devamı için en önemli yapı taşı ve enerji kaynağıdır. Lipitler, enerji depolamaya uygun, yüksek düzeyde enerji ihtiva eden insan ve hayvan beslemede önemli ana unsurlardandır. Genellikle suda çözünemeyen ancak bazı organik çözücüler ile (eter, benzen, kloroform gibi) çözünebilen yapılar lipit (veya yağ) olarak isimlendirilmektedir (Özdemir ve Denkbaş, 2003). Katı ve sıvı formda bulunabilen lipitler, trigliserit bakımından zengin bileşiklerdir. Lipitlerin içerdiği yağ asidi miktarı o lipide ait fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirlemek için önemlidir (Karaca ve Aytaç, 2007). Hücre zarının yapısal içeriği konumunda olan lipitler, genellikle canlı mikroorganizmaların dışında koruyucu bir kalkan gibi görev yaparlar.

Gliserol ve yağ asitleri lipitleri oluşturan 2 temel ögedir. Gliserol hem yağları hem de yağ asitlerinin yapısında gözlenmektedir. Tüm yağlarda aynı formda yer alan gliserol, yağ asitlerinde ise farklı bir formdadır (Baydar, 2000). Yağ asidi için en önemli unsur ise yapısında bulundurduğu karboksil grubu (-COOH) taşıyan düz bir hidrokarbon zinciridir. Yağlarda dominant karakterdeki yağ asitleri, çift karbon atom sayılı ve karboksil ihtiva eden yağ asitleridir (Nas ve ark., 2001).

1.3.2. Lipitlerin Sınıflandırılması

Lipitler, basit ve bileşik (kompleks) lipitler olmak üzere ikiye ayrılır:

1. Basit Lipitler: Yağlar (yağ asitlerinin gliserol ile yaptıkları esterler olarak bilinen trigliserit veya nötr yağlar) ve Mumlar (yağ asitlerinin gliserolden başka alkollerle yaptıkları esterler) basit lipitleri oluşturmaktadır.

2. Bileşik Lipitler: Alkol ve yağ asidinden başka grupları bünyesinde bulunduran ve yağ asitlerinin esterleri olan lipitlerdir. Bileşik lipitler ise 4 gruba ayrılmaktadır:

- a) **Fosfolipitler:** Fosforik asit ve nitrojen içeren lipitlerdir.
- b) **Glikolipitler:** Yağ asitleri ile bir karbonhidrat ve nitrojenin birleşmesiyle oluşan fosforik asit içermeyen lipitlerdir.
- c) **Lipoproteinler:** Lipitlerin kanda taşınma şekli olan ve lipit-protein bileşimi yağlardır.
- d) **Steroidler (Steroller):** Alkol fonksiyonu büyük moleküllü bir alkol olan lipitlerdir. En önemli bilinen steroid kolesteroldür.

1.3.3. Yağ Asitlerinin İsimlendirilmesi

Yağ asitlerinin isimlendirilmelerinde 3 önemli kriter bulunmaktadır:

1. Yağ asidinin taşıdığı karbon atomu sayısı
2. Yağ asidine ait zincir uzunluğu
3. Yağ asidinin içerdiği çift bağ sayısı

Doymuş yağ asitleri için karbon sayısını belirten ismin sonuna –anoik eki, doymamış yağ asitlerinde ise karbon sayısını belirten ismin sonuna –enoik eki getirilir.

Yağ asitlerinin numaralandırılması ise ya karbon atomları karboksilik gruptan başlayarak (Δ numaralama sistemi) ile ya da karboksilik uca en uzakta bulunan metil grubundan başlayarak (ω veya n numaralama sistemi) yapılır.

1.3.4. Yağ Asitlerinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Doymuş ve doymamış yağ asitlerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri birbirinden tamamen farklıdır.

Fiziksel açıdan; doymuş yağ asitlerinin merkezindeki tek bağlar kendi etrafında hareket edebilme yeteneğine sahip olduğundan dolayı esnek bir yapıda bulunmakta ve sayıca birçok form kazanabilmiş durumdadır. Doymamış yağ asitleri merkezlerinde ise bir veya birden fazla çift bağ bulundurduklarından dolayı, doymuş yağlar gibi esnek hareket yeteneğine sahip olmayan rijit bölgeleri vardır.

1.3.5. Yağ Asitlerinin Sınıflandırılması

Yağ asitleri ya karbon zincirlerine göre ya da doymuş-doymamışlık özelliklerine göre ayrılmaktadır (Çizelge:1.2).

Çizelge:1.2 Karbon sayısına göre yağ asitlerinin sınıflandırılması

İsimlendirme	Karbon Sayısı
Kısa Zincirliler	2 ve 4
Orta Zincirliler	6-12 arasında
Uzun Zincirliler	14-22 arasında
Çok Uzun Zincirliler	24-26 arasında

1.3.5.1. Doymuş Yağ Asitleri

Genellikle $C_nH_{2n}O_2$ şeklinde formülize edilirler. Doymuş yağlarda molekül ağırlığının değişimi (zincir uzunluğunun değişimi) yağ asidinin viskozite, kırılma indisi ve

erime noktası gibi özelliklerine de etki ettiğinden, bir yağın fiziksel halini (katı veya sıvı) ve sertliğini de belirleyici rodedir (Oysun 1987, Metin 1996). Önemli doymamış yağ asitleri ve özelliklerinden bazıları çizelgede verilmektedir (Çizelge:1.3).

Çizelge: 1.3 Önemli doymuş yağ asitlerinin bazı özellikleri (Nas ve ark. 2001, Demirci 2006)

Yağ Asidi	Zincir Uzunluğu / Çift Bağ Sayısı	Erime Noktası	Kaynağı
Bütirik Asit	4:0	-8	Süt yağı
Kapronik Asit	6:0	-2	Süt yağı
Palmitik Asit	16:0	63	Hayvansal ve bitkisel
Stearik Asit	18:0	70	Hayvansal ve bitkisel

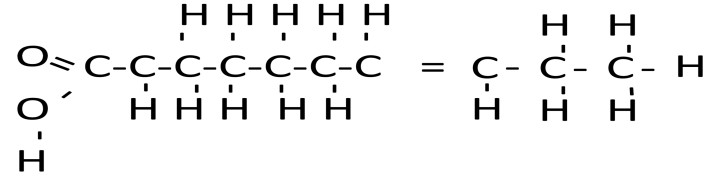
1.3.5.2. Doymamış Yağ Asitleri

Yapılarında bir veya birden fazla çift bağ içeren doymamış yağ asitleri genellikle bitkisel kaynaklıdır ve oda sıcaklığında sıvı halde bulunurlar. Hidrojenize yöntemiyle katı yada sıvı hale dönüştürülebilme özellikleri bulunmakta olup erime noktalarını çift bağ sayıları etkilemektedir (Çizelge:1.4).

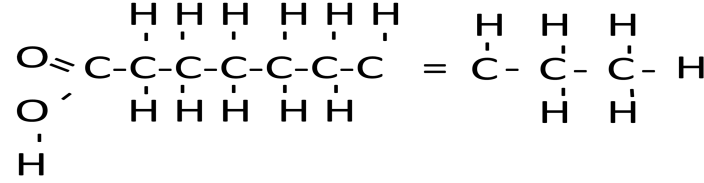
Çizelge:1.4 Önemli doymamış yağ asitlerinin bazı özellikleri (Nas ve ark. 2001, Demirci 2006)

Yağ Asidi	Zincir Uzunluğu / Çift Bağ Sayısı	Erime Noktası	Kaynağı
Palmitoleik Asit	16:1	1	Balık ve hayvansal yağlar
Oleik Asit	18:1	13	Hayvan ve bitki yağları
Linoleik Asit	18:2	-6	Soya yağı
Linolenik Asit	18:3	-11	Keten ve soya yağı
Araşidonik Asit	20:4	-50	Hayvansal yağlar
Vaksenik Asit	18:1	40	Hayvansal

Yağ asitlerinin açık formülünde bulunan karbon atomları arasında, çift bağ bulunması doymamış yağ asidi olduğunu göstermekte ve bu bağlarda bulunan hidrojen atomunun konumu ise cis ve trans izomerini göstermektedir (Şekil 1.1).



a) Trans izomer



b) Cis izomer

Şekil 1.1 Cis ve Trans izomerlerinin açık formülleri

1.3.5.3. Trans Yağ Asitleri

Trans yağ asitleri, trans yapılarında en az bir çift bağ bulundurmaktadır. Çift bağ açısı cis izomerlere göre daha küçük yapıda, açıl zinciri daha doğrusal olan trans yağlar; eşit sayıda karbon, hidrojen ve oksijen atomlarına sahip iki farklı izomer yapıdadır (Larque ve ark, 2001). Trans yağ asitleri sert bir kimyasal yapıya sahiptir. Trans yağ asitleri süt kaynaklı yağlardan, hayvansal etlerden ya da hidrojenasyon gibi 3 farklı kaynaktan meydana gelebilmektedir (Taşan ve Dağlıoğlu, 2005).

Doymamış yağ asitlerinin biyohidrojenasyonu için bakterilerin tarafından hayvansal yağlardaki ester bağlarının hidrolizi gereklidir. Bu sayede doymamış yağ asitlerinin doymuş yağ asitlerine dönüşmesine ve trans yağ asitlerinin meydana gelmesi gözlemlenmektedir (Sanders, 1988).

1.4. Konjuge Linoleik Asit (KLA)

Konjuge Linoleik Asit (KLA) geniş getiren hayvanların ürünlerinden elde edilmiş olup özellikle süt ürünleri başta olmak şartıyla birçok gıdada bulunmaktadır (Chin ve ark., 1992). Ruminant hayvanların rumenlerindeki mikroorganizmaların çoklu doymamış yağ asitlerini (PUFA) biyohidrojenasyona uğratılmasıyla açığa çıkmaktadır (Watkins ve Li, 2002). KLA antikanserojenik etkisinin yanı sıra metabolizmanın yağ oranının düşürülmesi

ve kas oranının artırılması (Park ve ark., 1997),başıklık sistemin düzenlenmesi (Cook ve ark., 1993) gibi birçok fonksiyonun gerçekleşmesini rol oynamaktadır.

1.4.1. KLA'nın Yapısı

İki çift bağ içeren (C18:2, c-9, c-12) ve 18 karbona sahip aynı zamanda esansiyel bir omega-6 yağ asidi olan linoik asit konjuge forma dönüşerek KLA yı oluşturmaktadır. Cis yada trans formda olan çift bağlar KLA'nın biyolojik aktivasyonunu göstermekteyken (Jenson, 2002) konjuge olan çift bağlar karbon zincirinde 9-10, 11-12 yada 11 ve 13 bağlarda ve farklı cis-trans yapılar halinde bulunmaktadır (Pariza ve Hargraves, 1985; Chamruspollert ve Sell, 1999; Bölükbaşı ve ark, 2005; Köknaroğlu, 2007) ve bilinen 28 izomerden yalnızca c-9, t-11 ve t-10, c-12 izomerlerinin biyolojik aktivitesi belirlenmiş (Banni, 2002) olup yiyeceklerde en fazla bulunan oktadekadienoik asit c-9, t-11 biyolojik aktivitesi en yüksek izomerdir (Aydın, 2005; Turhaner ve Özdoğan, 2007).

1.4.2. KLA'nın Biosentezi

KLA'nın biosentezi özellikle ruminant hayvanlarda, Rumen mikroorganizmalarının linoleik asitle biyohidrojenasyonu sonucu oluşan oktadekadienoik asite ve linolenik asitle biyohidrojenasyonu sonucu trans formdaki vaksenik asite dönüşmesi olarak iki yolla olmaktadır. Eser miktarda denecek kadar sınırlı olan ve biyohidrojenasyona uğramayan kısım ise Δ desaturaz enzimi salgılanarak konjuge forma dönüşmüş oktadekadienoik asite dönüşmektedir (Grinari ve Bauman, 1999; Khanol, 2004).

1.4.3. Rumende KLA Biyohidrojenasyonu

Ruminant hayvanların rumenlerine aldığı besinlerin içerdikleri doymamış yağ asitlerinin rumenlerinde barındırdıkları mikroorganizmalar aracılığıyla doymuş yağ asitlerine dönüştürülmesi işlemine biyohidrojenasyon olarak tanımlanmaktadır (Weimer, 1998). İlk olarak Kepler ve Tove (1967) tarafından yapılan araştırmalarda biyohidrojenasyon *cis*-9, *trans*-11-KLA izomerinin *Butyrivibrio fibrisolvens* isomeraz aktivitesi sonucu olduğu bulunmakta olup daha sonraki araştırmalarda biyohidrojenasyon sürecinin tek bir mikroorganizma tarafından gerçekleştirilmediği bulunmuştur (Kepler ve ark., 1966, Lawson ve ark., 2001). Biyohidrojenasyon sürecinde A ve B olmak üzere iki grup Rumen bakterisi görev alırken linoleik asit ve linolenik asit katılımı ile ara ürünler meydana gelmekle birlikte doymamış yağ asitlerinin biyohidrojenasyon işleminde her iki

grup görev almaktadır (Bauman ve ark., 2003). Linoleik asitin son ürün olan α -linolenik asite hidrojenize edilmesini sağlayan A grubu bakteriler olarak bilinirken trans-11 C18:1 son ürünü olan stearik asitin oluşmasında görev alan ise B grubu bakterileri olarak bilinmektedir (Bauman ve ark.,1999).

Rumen gut fungusları biyohidrojenasyonda A grubu bakteriler ile aynı görevi üstlenmekte olduğu ilk kez Nam ve Garnsworthy (2007b) tarafından yapılan bir çalışma ile belirtilmiştir. Rumen funguslarının gelişim gösterirken aynı zamanda linoleik asiti sırasıyla KLA ve vaksenik asite dönüştürdükleri gözlenmekle beraber fungusların gelişimleri sırasında besi ortamında büyüme faktörlerinin artırılmasının biyohidrojenasyon sürecini durdurduğuda gözlenmiştir (Nam ve Garnsworthy, 2007a).

1.4.4. Dokularda KLA Sentezi

KLA' dokulardaki biosentezi Δ^9 -desaturaz aracılığıyla *trans*-11 C18:1'in birçok enzim kompleksinin katılmasıyla oluşan desaturasyon ile olup dokularda dağılımı türden türe değişmektedir. Gelişme dönemindeki ruminantlarda adipoz dokular sentez bölgesi iken laktasyon döneminde meme bezleri sentez bölgesi olarak belirlenmiştir (Bauman ve ark., 1999).

1.4.5. Gıdalarda KLA Varlığı

Geviş getiren hayvanlardan elde edilen tüketime uygun gıdalar yüksek miktarlarda KLA içermektedir ve biyolojik olarak aktif olan *c9-t11* izomerini barındırmaktadır. Geviş getiren hayvanlardan elde edilen süt ürünlerinde KLA miktarı oldukça yüksek olup özellikle peynir KLA bakımından oldukça zengin içeriğe sahiptir. Süt ürünlerindeki KLA yoğunluğu 2.9-11.3 mg/g düzeyinde ve aktif izomeri toplam KLA'nın % 73-93 oluştururken sığır yağında KLA yoğunluğu 3.1-8.5 mg/g olarak aktif izomeri toplam KLA'nın %57-85 oluşturmaktadır. Geviş getirmeyen hayvanlarda bu oranlar oldukça düşük seyretmektedir (Chin ve ark., 1992).

1.4.6. KLA'nın Biyolojik Etkileri

Doymamış yağ asidi olan linoleik farklı izomerlerinden oluşan ve sentez yeri geviş getiren hayvanların rumeni ve meme dokuları olan KLA özellikle meme, deri , mide kolon, göğüs ve prostat kanserlerinin önlediği yönünde deneysel çalışmalar söz konusudur (Mir ve ark.,1999; Cherian ve ark., 2002). Birçok bilimsel araştırmada KLA izomerlerinin vucuttaki yağ oranını azaltarak protein, mineral oranını artırarak kas doku oranını artırdığı

gözlemlenmiştir (Cherian ve ark., 2002; Lee ve ark., 2006). Keza, Blankson ve arkadaşları (2000) yapılan bir çalışmada KLA alımının vücuttaki yağ kitlesini kabul edilebilir oranda azalttığını ve 12 hafta süren bu çalışmayla en uygun yağ oranının 3.4gr/gün olduğunu belirlemişlerdir. KLA'nın doku ve ürünlerde oksidasyonun inhibe edildiği antioksidan özelliği olduğu bildirilmiş olup devam eden çalışmalarda KLA'nın pişmiş etlerde de antioksidan özelliği sayesinde oksidasyona karşı direncin artırıldığı bildirilmiştir (Mir ve ark., 1999; Du ve Ahn, 2000).



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Rumenik asit olarak da bilinen ve biyohidrojenasyonun ara ürünlerinden biri olan konjuge linoleik asit (Conjugated linoleic acid, KLA) linoleik asidin pozisyonel ve geometrik izomeridir. KLA'daki konjuge olmuş çifte bağlar 9. ile 11., 10. ile 12., yada 11. ile 13. karbon arasında cis yada trans konfüğürasyonunda olabilir. Linoleik asidin cis-9, trans-11 izomeri daha çok antikarsinogenik özelliği ile tanınmaktadır (Devery ve ark., 2001; Durgam ve Fernandes, 1997).

Daha önceki bilgilerin aksine yapılan son araştırmalar, ruminant olmayan hayvanların ve insanların bağırsaklarında bulunan mikroorganizmaların da linoleik asitten çok sınırlı düzeyde de olsa KLA sentezleyebildiğine rastlanılmıştır (Aydın, 2005).

Et ve süt ürünlerinden elde edilen KLA miktarları bir gram yağda 2.9 ile 5.6 mg arasında değişirken bu miktarlar, yumurta ve tavuk etinde sırasıyla, 0.6 ve 0.9 mg civarında olduğu bildirilmiştir (Aydın ve Özsan, 2003).

KLA'nın çift bağları cis yada trans formunda olabilir. Ancak bu bağlardan bir tanesinin trans formunda bulunması bu bileşiğin biyolojik olarak aktif olduğunu belirtir (Jenson, 2002).

KLA, birçok gıdada doğal olarak sınırlı miktarlarda bulunmakla birlikte insan vücudunda sentezlenemediği bildirilmiştir (Fritsche ve ark.,1999). Bu yüzden ruminant hayvanlardan elde edilen et, süt ve özellikle süt ürünleri insan diyetleri için KLA'nın ana kaynaklarını teşkil ederler (Chin ve ark., 1992; Benito ve ark., 2001). KLA izomerleri ruminant hayvanların rumenlerinde linoleik ve linolenik gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin rumen bakterileri tarafından biyohidrojenasyonu esnasında meydana gelen ara ürünleri olduğu saptanmıştır. Ancak yapılan son çalışmalar, c-9,t-11 ve t-10, c-12 izomerlerinin dokulardaki $\Delta 9$ desaturaz enzimi vasıtasıyla trans-vaksenik (C18:1, t-11) asitten de sentezlenebildiğini bildirmiştir (Mir ve ark., 1999; Grinari ve ark., 2000; Chouinard ve Van, 2006).

Ruminant hayvanların rumeninde oluşan ve bağırsaklardan emilerek dokularda depo edilen KLA'nın insanlar tarafından et, süt ve ürünleri olarak tüketilmesi sonucunda insan sağlığı üzerindeki olumlu etkisi son yıllarda ilgi odağı haline gelmiştir. Bu teorinin çıkış noktası KLA'nın deney hayvanlarında kanser oluşumu ve gelişimini önleme özelliğinin ispatıdır (Pariza ve ark., 1990).

KYA (konjuge yağ asidi)'lar arasında en çok bilinen ve üzerinde çalışmalar yapılanları linoleik asidin KYA formu olan KLA izomerleridir. Yine bitki tohumu yağlarında mevcut olan linolenik asitin konjuge izomeri olan konjuge linolenik asitin de (KLNA) biyolojik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Kishino ve ark. 2003).

KLA rumendeki *Butyrivibrio fibrisolvens* ve başka rumen bakterileri (*Ruminococcus albus*) gibi tarafından linoleik asitin stearik asite biyohidrejenasyonu sırasında ara madde olarak veya t11 C18:1'in endojen dönüşümünden oluşmaktadır (Chin ve ark. 1992, Lin ve ark. 1995, Parodi 1997).

KLA'nın sentezi temel olarak rumendeki mikrobiyal flora ile linoleik asitten ve meme bezlerindedeki vaksenik asitten (VA) sentezi şeklinde olduğu için en temel kaynağı ruminantlardan sağlanan süt ve süt ürünleri olduğu tespit edilmiştir (Griinari ve Bauman 1999).

Linoleik asitten rumende oluşan KLA'nın çok büyük bir kısmı vaksenik asit ve stearik aside biyohidrojene şeklinde gözlemlenmiştir (Palmquist 1993).

Çizelge 2.1 Bazı çiğ et türlerindeki ortalama KLA miktarı (Schmid ve ark., 2006)

REFERANS	KUZU	SİĞİR	DANA	DOMUZ	TAVUK	HİNDİ	AT
Chin ve ark (1992)	5,6	2,9-4,3 ^b	2,7	0,6(mg/g yağda)	0,9	2,5	
Shantha ve ark (1994)		5,8-6,8 ^b					
Dufey (1999)	11,0 ^c	3,6-6,2 ^{a,c}		0,7 ^c			0,6 ^c
Ma ve ark (1999)		1,2-3,0 ^{b,c}					
Raes ve ark (2003)		4,0-10,0 ^{a,c}					
Badiani ve ark (2004)	4,32						
Fritsche ve Steinhardt (1998)	12,0 ^c	6,5 ^c		1,2/ 1,5 ^{b,c} mg/g YAME	1,5 ^c	2,0 ^c	
Rule ve ark (2002)		2,7-5,6 ^{a,b,d}			0,7 ^d		
Wachira ve ark (2002)	8,8- 10,8 ^e						
Knight ve ark (2004)	19,0 ^c						

YAME : yağ asidi metil ester, aFarklı üretim sistemlerinin/ülkelerinin eti, bFarklı hayvanlardan farklı karkas-gövde parçaları, cyalnız c9t11-18:2 ölçülmüştür,dyalnız c9t11-18:2 ve t10c12-18:2 ölçülmüştür

Etteki KLA miktarını etkileyen çok sayıda besin ögesi bulunmaktadır (Çizelge 2.1). Genellikle, kaslardaki KLA miktarının yüksek olması intramasküler yağ miktarının yüksek olmasına neden olduğu düşünülmüştür (Raes ve ark. 2004)



3. TEZİN AMACI VE ÖNEMİ

İnsanların fizyolojik ve zihinsel gelişimleri tükettikleri besin madde içeriklerine bakıldığında yeterli ve dengeli ölçüde olmalıdır. Metabolizmanın metabolik aktivitesinin normal ölçülerde sağlanabilmesi için protein, enerji, vitamin, mineral mikro ve makro besin içeriklerine sahip ve besleyici özelliği dışında metabolizmaya fizyolojik yarar sağlayabilecek fonksiyonel gıdalar tüketilmesi gerekmektedir. Fonksiyonel gıdaları oluşturan bileşiklerden biriside üzerinde birçok bilimsel çalışma yapılan ve özellikle geviş getiren hayvanların ürünlerinde bulunan konjuge linoleik asit (KLA) izomerleridir.

Bu çalışmada yeni bir anaerobik gut fungus izole ederek izole edilen fungusun mikroskopik ve morfolojik özelliklerinin tespiti araştırılarak moleküler tanımlaması yapılması amaçlanmıştır. izole edilen anaerobik gut fungusunun cins düzeyindeki tanımlanması yapılarak, elde edilen izolatin konjuge linoleik asit üretimindeki etkisi ve ürettiği linoleat izomeraz enzimi üzerinde çalışma amaçlanmıştır.

4. MATERYAL VE METOD

4.1. Materyal

4.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Ticari olarak yüksek saflık derecesine sahip olan kimyasal maddeler Sigma (Almanya) ve Merck (Almanya)'den tedarik edilmiştir. Moleküler çalışmalar için kullanılan farklı kimyasal maddeler gerekli yerlerde gösterilmiştir.

4.1.3. Kullanılan Anaerobik Gut Fungus

Üniversitemizin (Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü) Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği Laboratuvarı (BİGEM) da yapılan izolasyon çalışması sonucu elde edilen anaerobik gut fungus saflaştırıldıktan sonra GMLF54 kodu ile kültüre alınmıştır. Bu çalışmada kullanılmak üzere izole edilen ve kültüre alınan GMLF54 kodu ile adlandırılan anaerobik gut fungus inek dışkısından elde edilmiş olup çok kamçılı zoosporlu filamentli rizoidal gelişim gösteren monosentrik *Neocallimastix* cinsi olarak belirlenmiştir.

4.2. Metod

4.2.1. Fungus İzolasyonu İçin Gerekli Dışkı Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Kahramanmaraş çevresinden toplanan inek dışkı örnekleri kese kağıtlarına konularak 1 saat içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen dışkı örneklerinden izolat elde edilmek üzere örnekler bekletilmeden izolasyon işleminde kullanılmıştır ve kalan dışkı örnekleri tekrar kullanılabilmesi için -20°C'de mufaza edilmiştir.

4.2.2. Rumen Sıvısının Hazırlanması ve Muhafaza Edilmesi

Kullanılan besiyeri için gerekli olan rumen sıvısı Kahramanmaraş mezbanesinde kesilen ruminant hayvanların rumen içeriği alınarak temin edilmiştir.

Elde edilen rumen içeriği öncelikle iki katlı tülbentten süzülerek içerisindeki partiküllerden arındırılarak oksijen almayan ve içerisine konulan sıvının sıcaklığını uzun süre koruyan kapalı bir kap içerisine alınmıştır. Laboratuvara getirilen rumen sıvısı öncelikle erlenmayerlerin içerisine bırakılarak yaklaşık 60 dk boyunca çökmesi

beklenmiştir. Çökeltme gözlenen kısım alınarak 50 ml'lik plastik falkon tüpleri içerisinde 3500g'de 10 dk santrifüj (Hermle; Z 200A) işlemine tabi tutulmuştur.

Santrifüj işleminden sonra çökeltme gözlenen sıvının üst tabakası çökeltme kısmı karıştırılmadan temiz bir erlenmayere alınmıştır. Bu işlem elde edilen rumen sıvısının berraklığına göre üç defa tekrar edilmiştir. Son işlem 50 ml olacak şekilde plastik falkonlara bölünerek -20°C'de depolanarak muhafaza edilmiştir (Şekil 4.1)



Şekil 4.1 Kahramanmaraş mezbanesinde kesilen ruminant hayvanardan elde edilen rumen sıvısının anaerobik koşullarda gerekli aşamalardan geçirilerek temin edilmesi

4.2.3. Anaerobik Besiyerinin Hazırlanması

Anaerobik besiyeri hazırlamada kullanılmak üzere ön hazırlık olarak iki farklı solüsyon hazırlanmıştır. Farklı bileşim ve miktarlarda kimyasallar kullanılarak hazırlanan mineral solüsyon I ve mineral solüsyon II (+4°C) de saklanmıştır.

4.2.3.1. Mineral Solüsyon I

Mineral Solüsyon I, 3gr K_2HPO_4 (di-Potasyum hidrojen ortofosfat) , 1 lt'ye tamamlanacak şekilde dH_2O ile manyetik karıştırıcı yardımı ile homojen bir şekilde karıştırılarak (Velp-2040 Vortex) hazırlanıp +4°C de muhafaza edilmiştir.

4.2.3.2. Mineral Solüsyon II

Mineral solüsyon II, 3gr KH_2PO_4 (Potasyum di-hidrojen ortofosfat) , 6 gr $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Amonyum Sülfat) , 6 gr NaCl (Sodyum Klorür), 0.6gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Magnezyum Sülfat) , 0.6gr $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (kalsiyum klorür) 1 lt'ye tamamlanacak şekilde dH_2O (saf su) ile manyetik karıştırıcı yardımı ile homojen bir şekilde karıştırılarak (Velp-2040 Vortex) hazırlanıp $+4^\circ\text{C}$ de muhafaza edilmiştir.

4.2.3.3. Anaerobik Besiyerinin Hazırlanması

Orpin (1976) esas alınarak hazırlanmış anaerobik besiyerinde, besiyeri yoğunluğunun 5mg/ml enerji kaynağı olacak şekilde, elenmiş tozlarından arındırılmış buğday samanı ve glikoz kullanılmıştır. Enerji kaynağı olarak buğday samanı kullanılan besiyerinde buğday samanı ön hazırlık olarak Hungate tüplerine (16 x 125 mm, Bellco Glass Inc., Vineland, NJ. U.S.A) eklenmiştir, enerji kaynağı glikoz olan besiyerinde glikoz hazırlanan besiyeri içerisine eklenmiştir. Enerji kaynağı olarak buğday samanı kullanılan besiyeri 121°C 'de 15 dk, glikoz kullanılan besiyeri karamelizasyona neden olmamak amacıyla 110°C 'de 10 dk. Otoklav (Nüve OT 4060) işlemine tabi tutulmuştur (Orpin , 1976).

Çizelge.4.1. Anaerobik besiyeri hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları

		Sıvı Besi Yeri (1000 ml)	Katı Besi Yeri (1000 ml)
Mineral Solusyon I	ml	150	150
Mineral Solusyon II	ml	150	150
Resazurin (% 0,1)	ml	1	1
Rumen Sıvısı	ml	150	150
Saf Su	ml	550	550
NaHCO ₃	gr	6	6
Pepton	gr	10	10
L-Sistein HCl	gr	1	1
Maya Ekstraktı	gr	2.5	2.5
Agar	gr	---	20
Enerji Kaynağı	gr	2-5	2-5
Mineral Solusyon I	K ₂ HPO ₄	gr	3.0
	Saf Su	ml	1000
Mineral Solusyon II	NaCl	gr	6.0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	gr	6.0
	KH ₂ PO ₄	gr	3.0
	CaCl ₂	gr	0.6
	MgSO ₄ .7H ₂ O	gr	0.6
	Saf Su	ml	1000

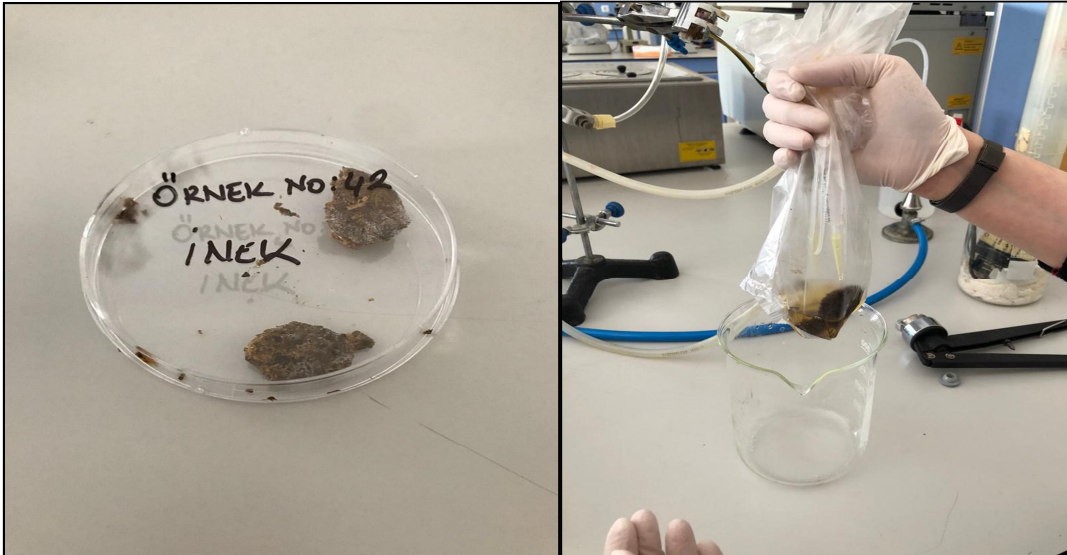
Besiyeri hazırlanırken 2-5gr (1< için) enerji kaynağı (glukoz) , 2.5 gr maya ekstraktı, 10 gr pepton, 6 gr NaHCO₃ (sodyum Hidrojen Karbonat), 1 gr L-sistein HCl tartılmış ve L-sistein dışında tartılan bütün bileşenler erlen içerisine konulmuştur.

Şişe içerisine 150 ml mineral solüsyon I , 150 ml mineral solüsyon II ve 150 ml rumen sıvısı ilave edilmiş ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde 1 lt saf suda çözdürülmüştür. Besiyeri ortamından çözülmüş oksijenin uzaklaştırılması karbondioksit gazı ile sağlanmıştır. Hazırlanan besiyeri kaynama noktasına ulaşıncı 1 gr L-sistein ve son olarakta oksijen indikatörü olan 1 ml Rezazurin çözeltisi besiyeri karışımına eklenmiştir (Çizelge 4.1).

Rezazurin ile hazırlanan çözeltilerin rengi sırasıyla mor, mavi, pembe ve soluk sarı renge dönüşmektedir. Tamamen sarı renge dönen besiyeri karbondioksit gazı altında 8 ml olarak Hungate tüplerine dağıtılmıştır. Tüpler sterilizasyon için otoklav işlemine tabi tutulmuştur (Orpin, 1976).

4.2.4. Anaerobik Koşullarda Dışkıdan Fungus İzolasyonu ve İnkübasyonu

Theodorou ve ark. (1993)'nin seyreltme yönteminden yararlanılarak yapılan anaerobik fungus izolasyonu, 5 gr dışkı örneği anaerobik ortamda enerji kaynağı olmayan 40ml besiyeri içerisinde çözülürerek başlanmıştır (Şekil 4.2). Hazırlanan karışımdan %10'luk kısım olacak şekilde karışım alınarak içerisinde saman konulmuş Hungate tüplerine anaerobik ortamda aktarılarak birinci dilüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Birinci dilüsyon için kullanılan toplam karışımdan %10'luk kısım olacak şekilde karışım alınarak anaerobik ortamda yeni 40 ml besiyeri (enerji kaynağı olmayan) içerisine eklenmiştir ve samanlı Hungate tüplerine dağıtma işlemi tekrarlanarak ikinci dilüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İkinci dilüsyon için kullanılan toplam karışımdan %10'luk kısım olacak şekilde karışım alınarak anaerobik ortamda tekrar 40 ml besiyeri (enerji kaynağı olmayan) içerisine eklenmiştir ve yine samanlı Hungate tüplerine anaerobik ortamda eklenerek üçüncü son dilüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde seyreltme işlemi yapıldıktan sonra antibiyotik karışımı ile muamele edilerek 39°C' de 3-7 gün inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 4.2. kahramanmaraş ili çevresinden elde edilen inek dışkılarından yapılan fungus izolasyonunda dışkının izlasyona hazırlanması

4.2.5. Anaerobik Gut Funguslarının Alt Kültür Çalışması

İzolasyonu yapıp inkübe edilen fungusların saflaştırma işlemine kadar geçen sürede yaşamlarını devam ettirebilmesi ve buldukları besiyeri ortamına adaptasyonunun sağlanması için alt kültür çalışması uygulanmıştır. Bu işlem fungus gelişimi gözlenen tüplerden enjektör yardımıyla 0.5ml alınarak gerekli olan enerji kaynağı ile hazırlanmış ve uygun sıcaklığa getirilmiş Hungate tüplerindeki besiyer içerisine aktarılarak inkübatörde (Nüve EN110) muhafaza edilmiştir.

4.2.6. Fungal izolatların Saflaştırılması

Bu metodun uygulanabilmesi için daha önceden hazırlanmış içerisinde % 0.5 (gr/ml) glikoz ve % 1.5 (gr/ml) agar bulunan anaerobik besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyeri her bir Hungate tüpüne 2 ml olacak şekilde eşit olarak dağıtılmış ve 110 °C'de 10 dk sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra hazırlanan bu besiyeri saflaştırma işlemi yapılacağı zaman sıcak su banyosu (JP Selectra, 85°C) içerisinde eritilmiş ve fungus ekimine uygun sıcaklık için 40-45°C' ye kadar soğutulmuştur. Uygun ekim sıcaklığına getirilen Hungate tüpleri içerisindeki agarlı besiyerine, ekim yapılacak tüpü yatık tutacak şekilde 0.2 ml fungus ekimi yapılmıştır ve seri bi şekilde buz dolu olan küvet içerisinde yatık olarak tüpün yüzeyinde ince bir tabaka oluşturacak şekilde dondurulmuştur. Saflaştırma işlemi yapılmış funguslar gelişimleri gözlenmek üzere 39°C'de 3-5 gün etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Temeli Hungate (1969)'a dayanan Joblin (1981)'in "Roll Tüp"metodu uygulanarak saflaştırma işlemi yapılan funguslar CO₂'li ortamda öze yardımıyla besiyeri içerisine aktarılmıştır. Saflaştırma işlemi yapılan kültürün saf olduğundan emin olunması için bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.

4.2.7. Geliştirilen Fungusların Görüntülenmesi

Saflaştırma işlemi sırasında katı ve sıvı besiyerinde gelişim gösteren funguslar morfolojilerine göre koloniler halinde mikroskop (Olympus CK-2) yardımıyla gelişimleri gözlenmiştir. Daha sonra gerekli olan koloni saflaştırılmıştır.

4.2.8. Antibiyotik Muamelesi ile Bakteri İnhibisyonu

Gerek saflaştırma işleminde fungusun besiyeri aktarımından sonra gerekse alt kültüre alma çalışması yapıldıktan sonra anaerobik fungus gelişmesi sırasında herhangi bir bakteriyel kontaminasyon ile karşılaşılmasın için antibiyotik karışımı kullanılmıştır. Karışımda kullanılan Kloramfenikol, Ampisilin, Streptomisin ve Eritromisin'in nihai

konsantrasyondaki miktarları aşağıda belirtilmiştir (Çizelge 4.2). Karışımın içerdiği kimyasallardan Klorofenikol ve Streptomycin suda çözünmeyen kimyasallar olması sebebiyle çözdürme işlemi %25 (v/v) etanol kullanılarak yapılmıştır ve karışımın sterilizasyonunun sağlanması amacıyla 0,22 µm gözenek çaplı filtre kullanılarak en küçük çaptaki mikroorganizmadan sterilizasyon sağlanarak dağıtılmıştır.

Çizelge.4.2. Anaerobik gut fungusların bakteriyel kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak için hazırlanan antibiyotik karışım içeriği

Kimyasal	Miktar (g) 100ml için
Kloromfenikol	0.5
Amfisilin	0.5
Eritromisin	1
Streptomisin	0.7

4.2.9. Anaerobik Fungusların Cins Düzeyinde Sınıflandırılması

Anaerobik gut fungusların sahip olmuş olduğu vejetatif safha ve zoospor kamçı sayılarına göre yapılan cins düzeyindeki sınıflandırma çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge.4.3 Anaerobik gut fungusların sınıflandırılması için kullanılan bazı morfolojik özellikler.

1	Vejetatif safha	Monosentrik	2 numaradan devam
		Polisentrik	5 numaradan devam
2	Zoosporları >4 kamçıya sahip olanları		<i>Neocallimastix</i>
			<i>Feromyces</i>
	Zoosporları <4 kamçıya sahip olanları		3 numaradan devam
3	Vejetatif safhada küresel rizoidlere sahip olma		4 numaradan devam
	Vejetatif safhada filamentli rizoidlere sahip olma		<i>Piromyces</i> <i>Liebetanzomyces</i>
	Kese boyunlarının spor keselerinden bir septum ile ayrılması		<i>Buwchfawromyces</i>
	Rizodial yapı içerisinde spor kesesi benzeri yapıların görülmesi		<i>Oontomyces</i>
4	Vejetatif safhada monosentrik büyüme		<i>Caecomyces</i>
	Vejetatif safhada polisentrik büyüme		<i>Cyllamyces</i>
5	Zoosporları tek kamçıya sahip olanlar		<i>Anaeromyces</i>
			<i>Pecaromyces</i>
	Zoosporları çok kamçıya sahip olanlar		<i>Orpinomyces</i>

4.2.10. Anaerobik Gut Fungusların Stoğa Alınması

Enerji kaynağı olarak saman kullanılarak hazırlanmış besiyerinde geliştirilen funguslar stoğa alınmak üzere karyoviyal tüplerine aktarılmıştır.

CO₂ 'li ortamda karyoviyal tüpleri içerisine 1 ml % 15'lik (v/v) steril gliserol ilave edilmiştir ve samana tutularak gelişen funguslar samanla birlikte karyoviyallere alınmıştır. Stok alma işlemi bittikten sonra karyoviyaller kamışlarda muhafaza edilerek -20°C'de (Haeke Messtechnik GMBH) dondurulmuştur ve daha sonra kullanılmak üzere donan karyoviyal kamışları azot tankına bırakılmıştır.

Azot tankında sıvı azot içerisinde muhafaza edilen funguslar kullanılmak üzere tank içerisinden çıkarılarak oda sıcaklığında eritilmiştir. Daha önce 39°C' de etüvde ısıtılmış besiyeri içerisine aktarılmıştır. Aktarma işlemi karyoviyallerin içerisindeki samanların CO₂'li ortamda ucu yakılarak steril edilen öze yardımıyla aktarılmıştır. Aktarma sırasında herhangi bir kontaminasyona uğramaması için ekim işlemi bittikten sonra Hungate tüplerine 0.5ml antibiyotik karışımı eklenmiştir ve 39°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

4.3. Moleküler Metodlar

4.3.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için enerji kaynağı glikoz kullanılarak hazırlanan besiyerine ekilen ve 48 saat 39°C'de inkübe edilen anaerobik funguslar 1000g'de 10 dk santrifüj edilerek 2ml 'lik ependorf tüplerine öze yardımıyla alınmıştır. DNA izolasyonu Doyle ve Doyle (1987) tarafından geliştirilen CTAB (hexa-decyltrimethylammonium bromide) metodu esas alınarak yapılmıştır. 2ml'lik ependorflara toplanan hücelere iki defa steril saf su ilave edilip 1000g'de tekrar santrifüj (Hettich) edilmiştir. Atıklar dökülüp yıkama işlemi bittikten sonra ependorf içerisine steril edilmiş cam bilyeler bırakılmıştır(Şekil 4.3).

Daha sonra bilye bırakılan ependorflar sıvı azot içerisine bırakılmıştır (Şekil 4.3). Sıvı azottan çıkarılan ependorf tüplerinin dışına vurularak bilyelerin hareket etmesi sağlanmıştır.

Bilyeler hareket edecek hale geldikten sonra hücre kırıcıda (Retsch MM301) hücre kırma işlemi yapılmıştır. Hücre kırıcıdan alınan örnekler tekrar sıvı azot içerisine bırakılmış ve aynı işlemler tekrarlanarak toplamda iki kez hücre kırma işlemi tekrarlanmıştır (Şekil 4.3).

Bu şekilde hücre duvarları kırılan hücelere 700 µl CTAB izolasyon tamponu (0.1 M Trish HCl, pH 8.0; 104 M NaCl; 0.02 M EDTA; % 2 CTAB) eklenmiş ve 60 dk boyunca 70°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrası 500 µl kloroform ilave edilmiş ve vortekslenmiştir (Velp) ve 70 °C'de 5 dk ısıtıldıktan sonra 1000g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Üst sıvıdan 500 µl alınarak yeni 2 ml'lik ependorf tüplerine alınarak üzerine 300µl izoproponal eklenmiş ve 1000g'de 10 dk santrifüje tabi tutulmuş ve üst sıvı dökülmüştür.

Tuzları uzaklaştırmak için örnekler 1 ml %70 etanol ile 70°C'de 20 dk bekletilerek yıkanmıştır. Çökelmiş DNA peleti 1000g'de 10 dk santrifüj edilmiş ve üst sıvı atıklarından arındırılmıştır. Etanolün tamamen uçurularak uzaklaştırılması için ependorfların kapakları açık bırakılarak bekletilmiştir. Elde edilen DNA uzun süre saklamak amacıyla 50 µl TE tamponu (1 mM TrishCl, pH 8.0; 0.1 mM EDTA) veya kısa sürede kullanılacaksa dH2O içerisinde çözülerek ileride kullanılmak üzere -20 °C'de de saklanmıştır.



Şekil 4.3. CTAB metoduna göre DNA izolasyonu yapılırken hücre duvarının kırılarak DNA'nın elde edilebilmesi amacıyla hücre kırma işlemi

4.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulaması

Polimeraz Zincir Reaksiyonu için gerekli protokol işlemleri sırası ile önce kimyasal maddelerin miktarları ve reaksiyon için gerekli olan amplifikasyon basamakları verilmiştir (Çizelge 4.5). Buna göre gerekli kimyasallar ve miktarları; 41 µl dH₂O, 1 pmol ileri ve geri primerler, 1 µl kalıp DNA, 5 µl 10X tampon, 1 µl dNTP ve 0.5 µl Taq DNA polimeraz (5 U/ml) karışımı ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan karışım çizelgede verilen PZR cihazı (Favorgen) çalışma şartlarına göre gerçekleştirildi. ITS bölgesine ait primer dizisi çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4 ITS bölgesine ait primer dizisi

Bölge	Primer adı	Oligo dizisi	T _m (°C)
ITS	ITS F	5'-CTA CCG ATT GAA TGG CTT AGT G -3'	58 ⁰ C
	ITS R	5'-AGT TCA GCG GGT ACT CTT ATC TG-3'	58 ⁰ C

Çizelge .4.5 Kullanılan PZR çalışma şartları

İlk denatürasyon		Denatürasyon	Yapışma	Uzama	Son Uzama
Sıcaklık (°C)	95	94	59	72	72
Zaman (dk)	4	1	0,5	1	5
Döngü	1	35			1

4.3.3. Jel Elektroforez Uygulaması

Sambrook ve arkadaşlarına (2001) göre hazırlanan agaroz jel elektroforez cihazı (Delta electronica) kullanılarak PZR ile çoğaltılan DNA parçasının büyüklük ve miktarı belirlenmiştir.

4.4. Anaerobik Gut Funguslarında KLA Sentez Metodları

4.4.1. LA Stok Solüsyon Hazırlaması

Anaerobik fungusların linoleik asitle muamelesi sırasında besiyeri içerisinde homejen olarak dağılmasını sağlamak amacıyla stok solüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan bu solüsyonda çözdürme işlemi % 2 (v/v)'lik Tween 80 kullanılarak yapılmıştır. Nihai konsantrasyonda % 0,1 g/ml linoleik asit olan stok solüsyon hazırlanmış ve -20 °C'de saklanmıştır.

4.4.2. Anaerobik Mikroorganizmaların KLA Sentez Süreci

KLA 'nın sentez süreci olarak linoleik asit stok solüsyonu ve enerji kaynağı glikoz olan besiyerine ekimi yapılmış 39°C'de 48-72 saat geliştirilmiş fungus hazırlanmıştır. Daha önceden hazırlanarak Hungate tüplerine her biri 10 ml olacak glikozlu besiyeri hazırlanarak 39°C'de ısıtılmıştır. Sıcaklık sabit 37°C olacak şekilde 7 farklı dk (0,5, 15, 30, 45, 90, 120 dk) için 6 farklı miktarda (0 µl, 10 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl) ve 3 tekerrür olacak şekilde stok solüsyon eklenmiştir. Stok solüsyon eklenen Hungate tüperine 0.5 ml anaerobik fungus ekimi yapılmıştır ve 38°C de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda etüvden çıkarılan Hungate tüpleri 1000g'de 10 dk santrifüj (Nüve NF 800) işlemine tabi tutulur. Çökeltme gözlenen tüplerden üst sıvılar dökülerek 1 ml saf su eklenip çökelen hücreler ependorf tüplerine alınmıştır. Toplanan hücreler 100 µl linoleik asit stok solüsyon eklendikten sonra sırasıyla 375µl kloroform:metanol (1:2, v/v) eklenip vortekslenmiştir. Vorteksleme işleminden sonra ependorf tüplerinin kapakları açılarak 125 µl kloroform eklenerek tüplerin kapakları kapatılmış ve vorteksleme işlemi tekrarlanmıştır. Son olarak vortekslenen örnekler içerisine 125µl steril saf su eklenerek vortekslenmiştir. Ependorf tüpleri 7500'g de 3 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj işleminden sonra alt sıvı yeni ependorf tüplerine alınmıştır. Örnekler içerisindeki kloroform azot gazıyla uzaklaştırılmıştır. Konsantre hale gelmiş örneklerin bulunduğu ependorf tüpleri içerisine çözdürme işlemi yapmak için 200µl Hekzan eklenerek tekrar vortekslenmiştir.

4.4.3. KLA'nın Spektrofotometrik Analizi

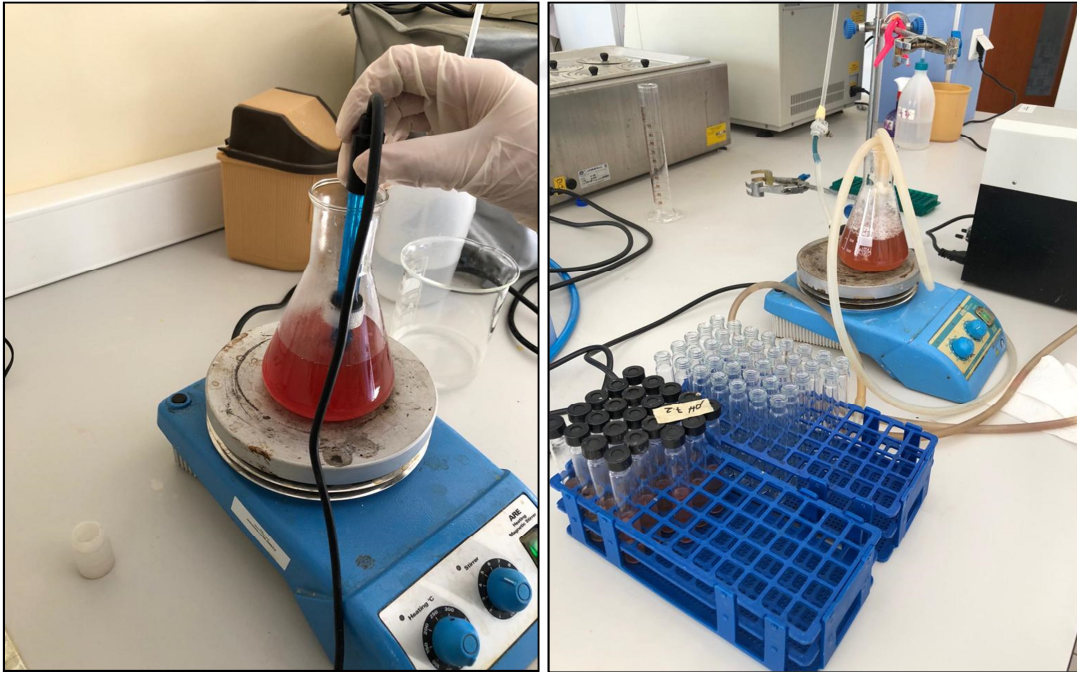
Azot gazı kullanılarak yoğunluğa ulaştırılan örnekler 200µl hekzan içerisinde çözdürüldükten sonra her örnekten üçer tekerrür ve kontrol grubu olacak şekilde 233nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında okuma yapılmıştır. Bu işlem UV spektrum (Spektrofotometre, Spectra Max),teknîği esas alınarak yapılmıştır (Vang ve ark., 2007).

4.4.4. Anaerobik Mikroorganizmaların Farklı pH 'larda KLA Sentez Süreci

Orpin (1976) standart protokole göre hazırlanan enerji kaynağı glikoz olan 1 lt besiyeri 200ml'lik beş adet beherlere dağıtılarak (Şekil 4.4) HCl ve NaOH çözeltilerinden damlatılarak kalibrasyonu yapılmış pH ölçer ile pH5.6, pH6.0, pH6.4, pH6.8, pH7.2 olacak şekilde pH düzeylerine getirilmiştir (Şekil 4.5). Daha sonra pH düzeyleri ayarlanan besiyeri 10ml ve 3 tekerrür olacak şekilde Hungate tüplerine dağıtılmıştır. Dağıtım işlemi biten Hungate tüpleri otoklav işlemine tabi tutulup 38°C'de inkübe edilmiştir. Uygun sıcaklığa getirilen besiyeri içerisine 40 µl ve 80 µl stok solüsyon eklenerek her bir Hungate tüpüne 0.5 ml fungus ekimi yapılmıştır ve 38°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreci sonunda Hungate tüpleri 12000g'de 10 dk santrifüj edilerek çökeltme gözlenen tüplerin süpernatant kısımları dökülerek 1ml saf su eklenmiştir. Çökelen ve 1 ml saf su eklenen pelet kısım temiz ve steril edilmiş ependorflara alınarak 12000g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Örnekler daha sonra kullanılacaksa santrifüj işlemi biten ependorflardan üst sıvı dökülerek -20°C'de saklanmıştır.



Şekil 4.4. Erlenmayer şişelerine dağıtılarak 5 farklı şekilde pH düzeyi ayarlanacak enerji kaynağı glikozlu kullanılan besiyeri çözeltisi



Şekil 4.5. pH düzeyleri ayarlanmak üzere erlenmayer şişelerine alınan besiyer çözeltisine HCL ve NaOH eklenerek pH ölçer ile ayarlanması (a), pH düzeyi ayarlanmış çözeltinin anaerobik koşullarda Hungate tüplerine dağılması (b)

4.4.5. Farklı pH'larda KLA'nın Spektrofotometrik Analizi

KLA sentez sürecinde son santrifüj işleminden sonra alt sıvısı yeni ependorfa alınarak azot gazı yardımıyla konsantre forma dönüştürülmüştür. İçerisinde konsantre forma dönüştürülmüş örneklerin bulunduğu ependorf tüpleri içerisine 200µl hekzan eklenerek vortekslenerek KLA standardına göre spektrofotometre cihazında okuma yapılmıştır. Bu işlem her örnek için 3 tekerrür ve bir kontrol grubu hazırlanarak ve UV spektrum (Spektrofotometre, Spectra Max),teknîği esas alınarak yapılmıştır.



5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. İzolasyon İçin Gerekli Dışkıının Toplanması ve AGF İzolasyonu

Kahramanmaraş ili çevresindeki yetiştirilen ruminant hayvanlardan temin edilen inek dışkısı dışkıdaki suyun emilmemesi amacıyla kese kağıtlarında laboratuvara getirilerek anaerobik gut fungus elde edilmek üzere Orpin (1976) esas alınarak hazırlanan besiyeri Theodoru ve ark. (1993) seyreltme yöntemine göre anaerobik ortamda izolasyon işlemi yapılmıştır (bkz. 4.2.4.). İzolasyon işlemi için gerekli miktar kullanıldıktan sonra kalan dışkı örnekleri -20°C'de muhaza edilmiştir. Rumen fungusları dışkıda rektuma geçiş sırasında havaya ve kurumaya karşı dirençli yapı kazanmış olup bu yapılarını haftalarca hatta aylarca koruyabilme özelliğine sahiptirler (Davies ve ark., 1993a; Milne ve ark., 1989). Anaerobik gut fungus izolasyonu sırasında karşılaşılabilecek en önemli tehlike bakteri kontaminasyonu olup bakteri gelişimi fungus gelişimini inhibe etmektedir (Dehority ve Tirabasso, 2000). Bakteri kontaminasyonunun önlenmesinde birçok kombinasyon denenmiş olup en uygun kombinasyon içerisinde fungus gelişiminde bakteri oluşumuna engel olan streptomycin ve penisilinde içeren kombinasyon kullanılmıştır (Akin ve Rigsby, 1987) (bkz. 4.2.8.). Rumen fungusları enerji kaynağının glikoz veya saman kullanılması durumuna göre değişmekle birlikte glikoz içeren besiyeri için 5 gün, saman içeren besiyeri için 15 gün canlılığını devam ettirebilmektedir (Milne ve ark., 1989). Kültüre alınan canlılığını uzun süre devam ettirebilmesi için 2-4 gün periyotlarında düzenli olarak alt kültüre alınmıştır (Theodoru ve ark., 1992) (bkz. 4.2.5). Kontaminasyon gözlenmeyen kültürler roll tüp metodu kullanılarak saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur ve sıcaklık optimum 39°C'de olmak koşuluyla kültürün canlılığı korunmuştur. Bu çalışmada da kullanılan *Neocallimastix* cinsi fungusların zoosporlarının kist oluşturabilmesi ve çimlenme gösterebilmesi için sıcaklığın 30-40°C arasında optimum sıcaklık olarak 39°C kullanılmıştır (Lowe ve ark., 1987b).

5.2. İzolatın Morfolojik Tanımlanması

Bu çalışmada kullanılan fungusların morfolojik tayininin yapılmasında ışık mikroskobu kullanılmıştır. Agarlı katı halde olan besiyeri içerisinde koloniler halinde gelişim gösteren anaerobik gut fungusları kolonilerine göre cins düzeyinde monosentrik olarak tanımlanmış olup faklı enerji kaynakları kullanılan sıvı besiyeri içerisinde gelişim gösteren anaerobik gut fungusları rizoidal yapılarına göre monosentrik filamentli rizoidal şekillenme gösteren *Neocallimastix* cinsi olarak teşhis edilmiştir. Tek bir spor kesesi

oluşturan monosentrik anaerobik gut fungus GMLF54 olarak isimlendirilmiştir. Morfolojik yapılarına göre farklı tallus gelişimi gösteren anaerobik gut fungusları monosentrik ve polisentrik olarak ikiye ayrılmakta olup ışık mikroskopuyla gözlenebilmektedir (Ho ve Barr, 1995). Işık mikroskopuyla gözlenen bu fungusların tek bir spor kesesi oluşturan monosentrik yada birden fazla spor kesesi oluşturan polisentrik olarak cins bakımından tanımlaması yapılırken tür düzeyindeki tanımlamasında ışık mikroskobu yeterli olmamaktadır (Barr ve ark., 1989; Wubah ve ark., 1995).

5.3. Tanımlanmış AGF'nin Kültüre Alınması

Morfolojik tayini yapılan funguslar çalışma bitimine kadar moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere alt kültür uygulaması yapılarak canlı tutulması amacıyla alt kültüre alınmıştır. Gerektiğinde tekrar kullanılmak için GMLF54 olarak isimlendirilen AGF sıvı azot içerisinde saklanmak üzere BİGEM kültür koleksiyonu içerisine dahil edilmiştir. Elde edilen izolatin mikroskop görüntüsü Şekil 5.1'de verilmiştir.



Şekil 5.1. GMLF54 *Neocallimastix frontalis* suşunun mikroskop görüntüsü

Enerji kaynağı buğday samanı kullanılan besiyeri içerisinde geliştirilen funguslar gerektiğinde kullanılmak üzere sıvı azot içerisine bırakılmadan önce kriyoprezervasyon işlemine tabi tutulmuş olup hücrelerin osmatik şoktan koruyabilecek donma/çözülme sırasında su tutulumunu sağlayacak, içerdiği suyun buz kristalleri halini almasını azaltarak ve hücre içerisine hızlı bir şekilde diffüze olan kriyoprotektan madde olan %15 (v/v) 'lik gliserol kullanılmıştır. Bu işlem anaerobik koşullarda kültüre alınacak fungusların hücre yapısının bozulmasına ve herhangi bir kontaminasyona neden olmaması amaçlanacak koryoviyal tüplere alınarak yapılmıştır.



Şekil 5.2. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi BİGEM kültür koleksiyonunun sıvı azot (-196°C) tankı içerisinde muhafaza edilmesi

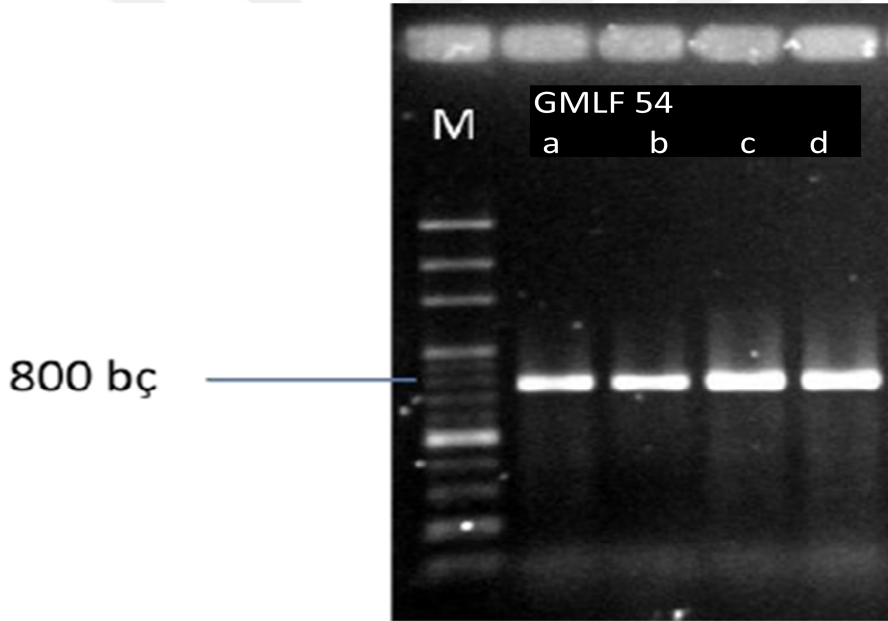
Glason ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmalarda kültürlerin korunarak saklanması kriyoprezervasyon yöntemi en iyi sonuç veren yöntemdir. Farklı kriyoprotektan maddeler ve farklı oranlarda %10 (v/v) 'luk gliserol kullanarak Philips ve Gordon (1988) ve %5 (v/v)'lik dimetil sülfoksit DMSO kullanarak sıvı azot içerisinde muhafaza ettikleri Yarlett ve arkadaşlarının (1986) yaptığı bilimsel çalışmalar bildirilmiştir. Elde edilen izolatlar KSÜ BİGEM kültür koleksiyonunun sıvı azot tankı içerisinde muhafaza edilmiştir (Şekil 5.2)

5.4. DNA İzolasyonu ve PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Gliserol kullanarak karyoviyal tüpler içerisinde sıvı azot tankında muhafaza edilen kültürler tank içerisinde çıkarılarak çözülmesi beklendikten sonra anaerobik koşullarda Orpin (1976) esas alınarak hazırlanmış ve enerji kaynağı buğday samanı kullanılan besiyeri içerisinde kültürün canlanması işlemi yapılmıştır ve 39°C inkübatöre bırakılmıştır. Gelişim gösteren Hungate tüpleri ayrılarak enerji kaynağı glikoz kullanılan besiyeri içerisinde gelişimi inverted ışık mikroskop yardımıyla gözlenmiştir. Hungate tüpleri ışık mikroskopu altında zoosporlar gözlemlendikten sonra oluşan biyokütle santrifüj edilerek pellet kısmı ependorf tüplerine alınarak hücre toplama işlemi yapılmıştır ve toplanan hücrelerin hücre duvarları sıvı azot yardımıyla kırılarak CTAB metodu esas alınarak DNA izolasyonu yapılmıştır. CTAB metodu esas alınarak yapılan DNA izolasyon yöntemi anaerobik gut funguslarının DNA izolasyonunda kullanılan en klasik yöntem (Doyle ve Doyle, 1987)

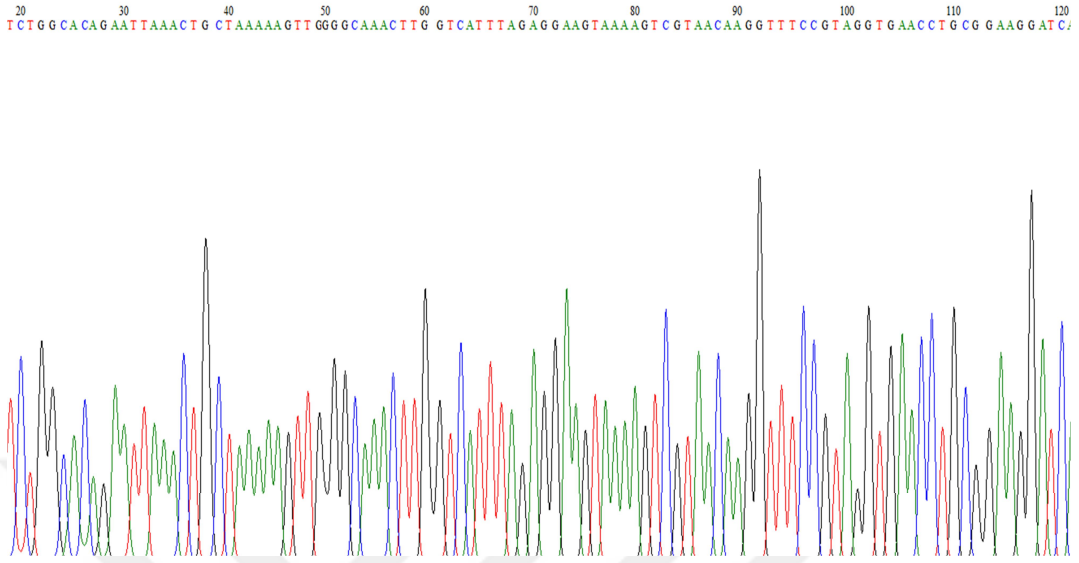
olmakla birlikte farklı olarak ticari genomik DNA izolasyon kitleri de (Favorgen, Tayvan) kullanılmaktadır.

DNA izolasyonu yapılan anaerobik gut funguslarında morfolojik tanımlama için yalnızca ışık mikroskobu yeterli olmamaktadır bu nedenle tam bir morfolojik tanımlama yapılabilmesi için farklı moleküler çalışmalar da gerekmektedir. Wubahh ve ark.(1991c) Yaptığı çalışmalar da Rumen funguslarının morfolojik tanımlamasının ışık mikroskobu kullanılarak yapılabileceği ancak sadece cins düzeyinde olup tür düzeyinde yeterli olmadığı belirtilmiştir. DNA izolasyonu sonrasında DNA 'yı çoğaltmak ve morfolojik tanımlama yapılması amaçlanarak protokol esas alınarak PZR işlemi yapılmıştır (bkz 4.3.2). Tanımlama işlemi için 5.8S, ITS1, ITS2 ve 18S bölgelerini içeren primer kullanılmıştır. PZR işlemi yapılan DNA jel elektroforez yöntemiyle agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 5.3).



Şekil 5.3.N.frontalis'e (a,b,c ve d aynı izolat) ait 5.8S(185 bç) , ITS1(215bç), ITS2(225bç) ve 18S(175bç) bölgelerini içeren ITS adı verilen kapsamlı primer yardımı ile toplamda yaklaşık olarak 800 bç uzunluğundaki bölgenin PZR görüntüsü.

PZR ve jel görüntüleme işlemleri yapıldıktan sonra net bir morfolojik tanımlamada nükleotid baz dizilemesinin belirlenmesi gen dizi analiziyle olmuştur ve gen dizi sonuçlarına göre GMLF54 *Neocallimastix frontalis* olarak net bir tanımlama verilmiş olup sekans dizilimi (Şekil 5.6) ve NCBI blast sonucu (Şekil 5.5) verilmiştir. GMLF54 suşunun ITS bölgesine ait kromotogramın bir kısmı şekil 5.4'te verilmiştir.



Şekil 5.4. GMLF54 (*Neocallimastix frontalis*) DNA'sına ait PZR işlemi sonucunda kısmen ITS1 bölgesine ait kromotogram

NCBI Blast:Nucleotide Sequence x +

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Descriptions Graphic Summary Alignments **Taxonomy**

Reports Lineage Organism Taxonomy

100 sequences selected ?

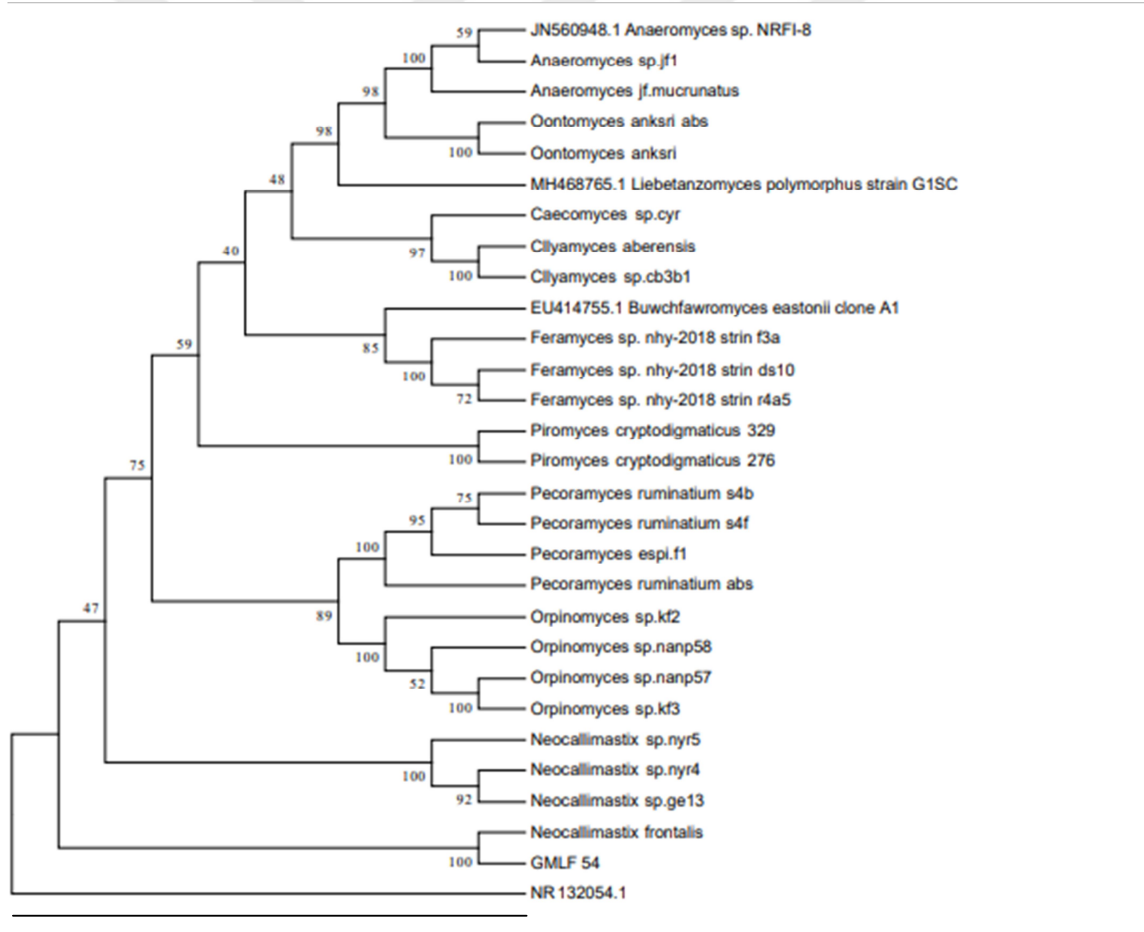
Organism	Blast Name	Score	Number of Hits	Description
Fungi	fungi		109	
. Neocallimastigales	chytrids		59	
. . uncultured Neocallimastigales	chytrids	950	24	uncultured Neocallimastigales hits
. . Neocallimastix sp. NYR3	chytrids	902	1	Neocallimastix sp. NYR3 hits
. . Neocallimastix sp. NYR2	chytrids	878	1	Neocallimastix sp. NYR2 hits
. . Neocallimastix sp. NYR5	chytrids	852	1	Neocallimastix sp. NYR5 hits
. . Piromyces irregularis	chytrids	850	1	Piromyces irregularis hits
. . Neocallimastix frontalis	chytrids	848	23	Neocallimastix frontalis hits
. . Neocallimastix sp. NYF1	chytrids	833	1	Neocallimastix sp. NYF1 hits
. . Neocallimastix sp. NYR1	chytrids	771	1	Neocallimastix sp. NYR1 hits
. . Neocallimastix sp. NYF2	chytrids	763	1	Neocallimastix sp. NYF2 hits
. . Neocallimastix sp. NYF4	chytrids	756	1	Neocallimastix sp. NYF4 hits
. . Neocallimastix sp. NYF3	chytrids	752	1	Neocallimastix sp. NYF3 hits
. . Neocallimastix sp. NYR4	chytrids	719	1	Neocallimastix sp. NYR4 hits
. . Neocallimastix sp. GE13	chytrids	712	1	Neocallimastix sp. GE13 hits
. . Neocallimastix sp. AF-CTS-HAN2	chytrids	693	1	Neocallimastix sp. AF-CTS-HAN2 hits
. . uncultured fungus	fungi	941	50	uncultured fungus hits

Şekil 5.5. GMLF54'e ait sekans diziliminin NCBI veri tabanında blast sonucu *N. frontalis*'e ait olduğunu göstermektedir.

CGCGGATGGCAATTTTTCTGGCACAGAATTAAGTCTAAAAAGTTGGGGCAAACCTGGTCATTTAGAGGAA
 GTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAATATCACTCGATTGAAAGTG
 ATTTAATAATCATCTACCCTTTGTGAATTTGTTGTTGAAATAATTTTTTTTGACGTGGAATAAAATTAATTTAG
 TTATGGCTTTGCCTATCCCTAATTTGGTTGGTTTGTGTAAGACAAGTGAATCATTAAAGGAAGAGGCTTTCT
 AAAAAGTTGATTTTTTCCCAAGGACTTAAAAGACCTTTTTTAAAATTAACCTTTGTATTCAATTTGTCTAAAATA
 ATTTTAAAATAATTTTAAAACAGCTTTTGACGATGGATCTCTGGGTTCTACAACGATAAAAAACGCAACAAA
 ATGCGAAAAGTAATGTAAATTGCACAATACGTGAATCATCAAATCTCAAACGCTTATGGCACTTTTTTAGTTAAC
 TAAGAAAGTATGTCTGTTGAGTATCACAAAAATATTCTATAAAAACATTTTTGTTTTAGGGTTATGAGTGTTTT
 ACAACGATTACCATTTGTTTCATTTAATTTCAATTTAATTAACCTTATGGTTTTATTAATTAATTAATTTGGATAAA
 ATTTTCCCCTAAAAAGGAATAATTTTTCAGTTTTATTAGACAAATCTCGGTCCGATTTTAAAGGAAATTTTTTT
 AAATAACTTGATCTCAAATTCAAAAATAAAAAATTACCCCTAAACTAAAA

Şekil 5.6. GMLF54 (*Neocallimastix frontalis*) suşunun ITS bölgesi DNA dizileme sonucu.

Çizelge 5.1. GMLF54 (*Neocallimastix frontalis*) suşunun soy ağacı çizelgesi



0,3

GMLF 54 'e ait soyağacı grafiği. ITS bölgesi esas alınarak hazırlanan soyağacı MEGA 6 program desteği ile UPGMA methodu kullanılarak en az 500 bootstrap yapılmıştır. Soyağacında GMLF 54 ile *N.frontalis* clade uzunlukları gösterilmiştir (Çizelge 5.1).

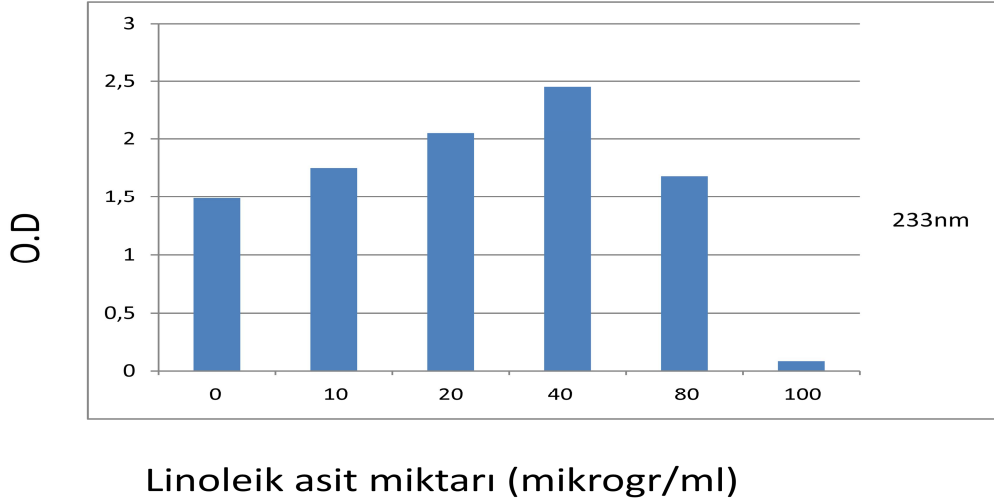
5.6. Linoleik Asitin Farklı Sürelerde AGF Gelişimi Üzerine Etkileri

Bu çalışma kapsamında kullanılan ve morfolojik tanımlaması yapılmış olan GMLF54 numaralı anaerobik gut fungusu gelişimi üzerinde linoleik asitin etkilerini gözleme sürecinde öncelikle linoleik asitin kullanılan besiyeri solüsyonu içerisinde homojen dağılması amaçlanmıştır. Linoleik asiti miselleştirme işlemi için %2(v/v)'lik Tween 80 kullanılmıştır (bkz 4.4.1).

Enerji kaynağı olarak glikoz kullanılarak Orpin (1976) esas alınarak hazırlanıp Hungate tüplerine dağıtılan besiyeri çözeltisi içerisinde 0 µl (kontrol), 10 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl 100 µl olarak miselleştirilmiş linoleik asit stok solüsyonu ve gelişim göstermiş GMLF54 suşundan 0.5 ml enjektör yardımıyla eklenerek inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreci olan 72 saatlik süre boyunca ışık mikroskobu yardımıyla gözlenmiş ve stok solüsyon miktarı arttıkça besiyeri solüsyonunda gözle görülür düzeyde bulanıklık ve fungus gelişiminde inhibisyon gözlemiştir. Bu durumun Rumen fungusların linoleik asitin toksik etkisinden kaynaklanan bir duyarlılığa neden olduğunu açığa çıkarmaktadır. Gelişimi 72 saat gözlenen hungate tüpleri hücre toplama işleminden başlayarak gerekli işlemler yapılarak sabit sıcaklıkta 0 dk, 5dk, 15dk, 30dk, 45dk, 60dk, 90dk ve 120dk olmak üzere 8 farklı zamanlamalarda sıcak su banyosunda bekletilmiştir. KLA miktarı spektrofotometre sonuçları alınmak üzere içerisindeki kloroform uzaklaştırılarak konsantre hale getirilmiştir (bkz 4.4.2). Konsantre hale gelen örnekler hekzan içerisinde çözdürülerek mikropate içerisinde 233nm dalga boyunda (Wang ve ark., 2007) okuma yapılarak sonuçlar elde edilmiştir (bkz 4.4.3). Elde edilen sonuçlara göre *Neocallimastix* sp. cinsi rumen funguslarında toksik etki gösteren linoik asitin sabit sıcaklıkta uzun süre bekletilen rumen funguslarının gelişimlerinin durduğu gözlenmiştir.

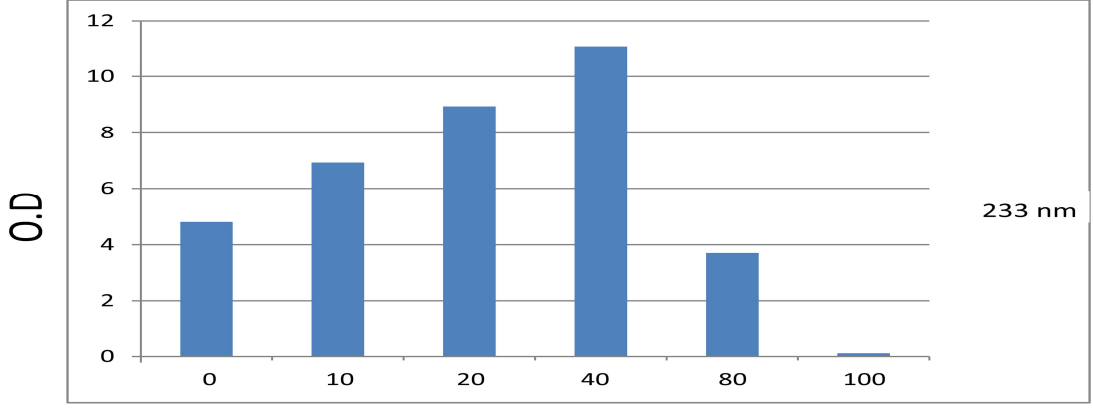
Anaerobik gut funguslarında (GMLF54) 0.'dk da linoleik asitin KLA'ya dönüşme değeri ile farklı miktarlar arasındaki ilişki şekil 5.7.'te verilmiştir. Grafiğin oluşumunda kullanılan analizlerde sıcaklık faktörü 37°C sabit tutularak bir kontrol grubu ve farklı miktarda 10 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl 100 µl linoleik asit stok solüsyonu kullanılmıştır. Üç tekerrür olarak yapılan analizler sonunda bulunan spektrofotometrik sonuçların ortalaması alınarak absorbans değerleri oluşturulmuş olup daha önceden hazırlanmış olan denklemde

($y=0,0022x+0,057$) bağımsız y değişkeni yerine konularak optik dansite (O.D) değeri bulunmuştur. Sonuçlara bakıldığında sıcaklık faktörü sabit tutularak herhangi bir süre esas alınmadan ölçüm yapılmış ve eklenen linoleik asit miktarı 40 µl oranına kadar ortamdaki ürün miktarında artış gözlenmiştir. Linoleik asit miktarı 80 µl 'ye çıktığında linoleik asitin toksik etkisi ile ortamdaki ürün miktarında hızlı bir düşüş gözlenirken substrat miktarı 100 µl'ye çıktığında linoleik asitin toksik etkisi ile reaksiyon olumsuz etkilenmiş ve ürün oluşmamıştır.



Şekil 5.7. AGF'da 0.dk'da linoleik asitin KLA'ya dönüşme grafiği

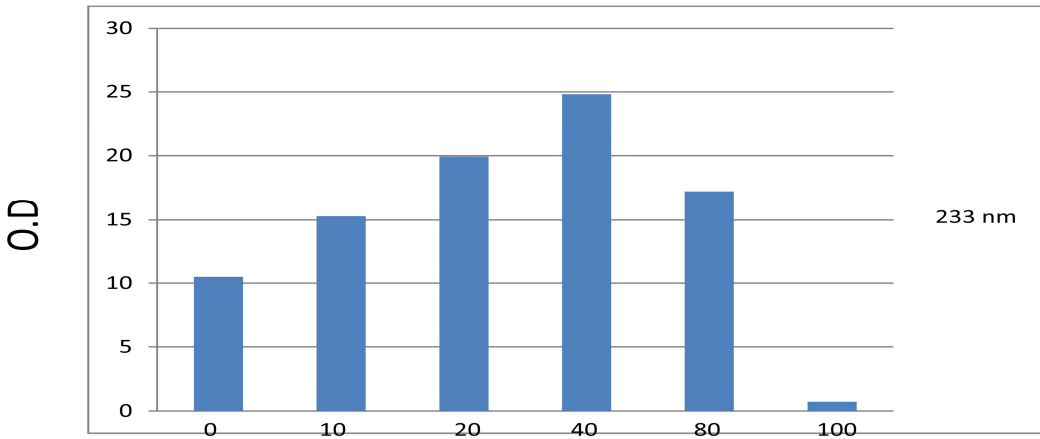
Anaerobik gut funguslarında (GMLF54) 5.'dk da linoleik asitin KLA'ya dönüşme değeri ile farklı miktarlar arasındaki ilişki şekil 5.8'de verilmiştir. Grafiğin oluşumunda kullanılan analizlerde sıcaklık faktörü 37°C sabit tutularak bir kontrol grubu ve farklı miktarda 10 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl 100 µl linoleik asit stok solüsyonu kullanılmıştır. Bulunan spektrofotometrik sonuç ortalamalarının absorbans hesaplamaları regresyon denkleminde sabit sıcaklıkta 5 dk muamele edilmesi sonucu gözlenen ürün miktarındaki bir önceki grafikteki süre esas alınmadan yapılan sonuçla kıyaslandığında linoleik asitin sıcaklıkla muamelesi sonucu 40 µl 'ye kadar daha fazla ürün artışı gösterdiği gözlenmiştir. Substrat miktarı 40 µl ve 37°C sabit sıcaklıkta 5 dk muamele edildiğinde ortamdaki ürün artışının doğrusal denklemin üzerinde bir artış olduğu gösterdiği gözlenmiştir. Substrat miktarı 80 µl'ye çıktığında sıcaklığın linoleik asit ile birlikte ortamdaki üründe azalma gözlemlenirken ve 100 µl substrat ortamda inhibitör etki oluşturmuş ve ürün açığa çıkmamıştır.



Linoleik asit miktarı (mikrogr/ml)

Şekil 5.8. AGF'da 5.dk'da linoleik asitin KLA ya dönüşme grafiği

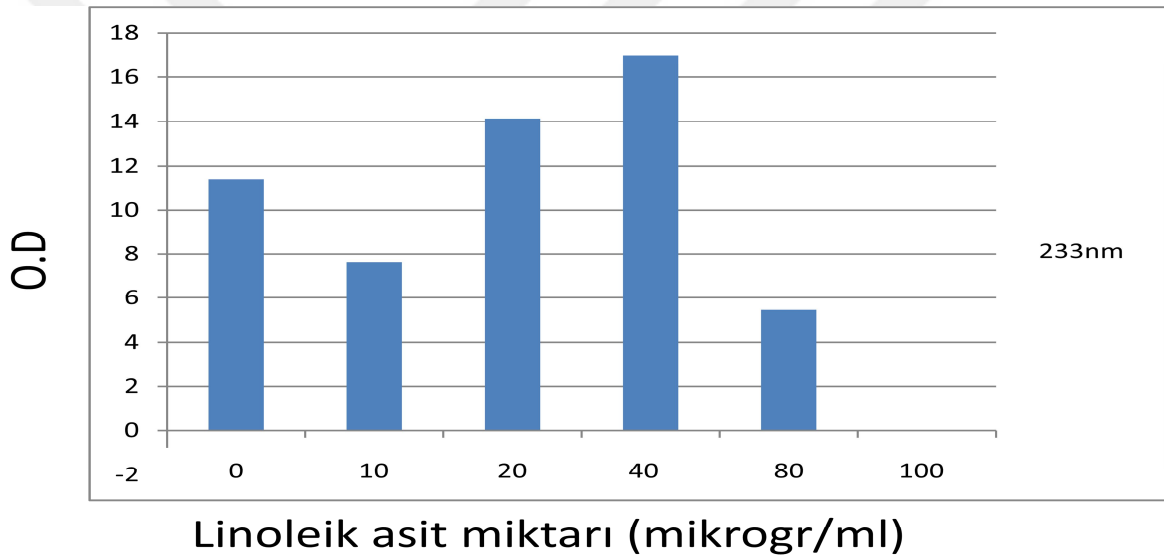
Anaerobik gut funguslarında (GMLF54) 15.'dk da linoleik asitin KLA'ya dönüşme değeri ile farklı miktarlar arasındaki ilişki şekil 5.9'da verilmiştir. Grafiğin oluşumunda kullanılan analizlerde sıcaklık faktörü 37°C sabit tutularak bir kontrol grubu ve farklı miktarda 10 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl, 100 µl linoleik asit stok solüsyonu kullanılmıştır. Sabit sıcaklıkta 15 dk muamele edildiğinde sıcaklığın enzim aktivasyonunu artırması nedeniyle hızlı bir artış gözlenmiş olup substrat düzeyi 40 µl 'ye kadar ürün miktarında oluşan artış 40 µl substratta ürün miktarı artış pik seviyeye ulaşmıştır ancak 40 µl üzerinde toksik etkiye duyarlılık göstererek ortamdaki ürün miktarında hızlı bir düşüş gözlenmektedir. Substrat düzeyindeki artış inhibitör etki göstererek linoleik asit miktarı 100 µl'ye ulaştığında ortamda ürün oluşmamıştır.



Linoleik asit miktarı (mikrogr/ml)

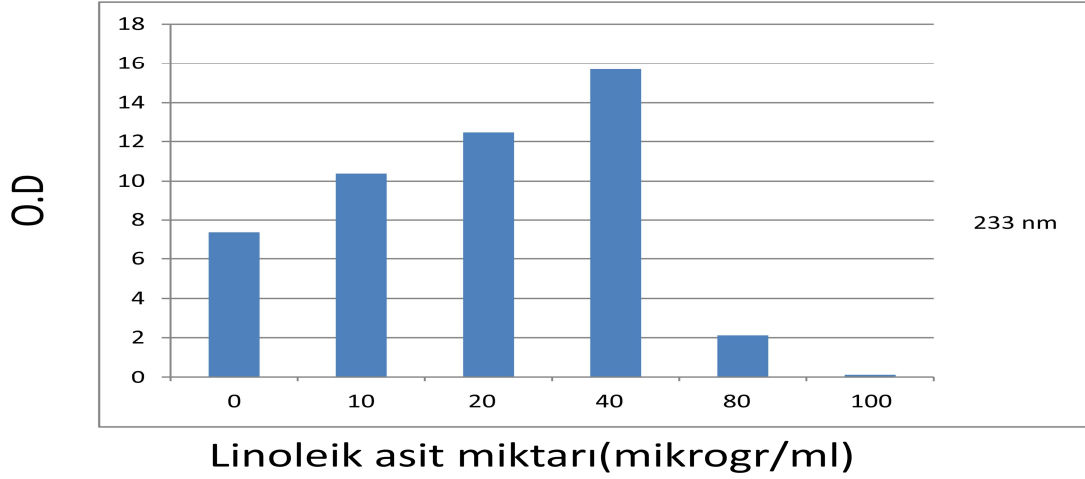
Şekil 5.9. AGF'da 15.dk'da linoleik asitin KLA ya dönüşme grafiği

Anaerobik gut funguslarında (GMLF54) 30.'dk da linoleik asitin KLA'ya dönüşme değeri ile farklı miktarlar arasındaki ilişki ve şekil 5.10'da verilmiştir. Grafiğin oluşumunda kullanılan analizlerde sıcaklık faktörü 37°C sabit tutularak bir kontrol grubu ve farklı miktarda 10 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl, 100 µl linoleik asit stok solüsyonu kullanılmıştır. Sabit sıcaklıkta 30 dk muamele edildiğinde ortamdaki ürün miktarında dalgalanan bir artış gözlenmekle beraber enzim aktivasyonunun ve ürün miktarındaki artışın en fazla olduğu safha olarak gözlemlenmiştir. Substrat miktarının 40 µl' ye kadar artırılması herhangi bir duyarlılık oluşturmazken substrat miktarının 40 µl'den sonrası toksik etki açığa çıkarmakta ve ortamdaki ürün miktarında hızlı bir azalış gözlemlenmektedir. Linoleik asit miktarı 100 µl'ye ulaştığında inhibisyon nedeniyle ortamda ürün miktarı oluşmamıştır.



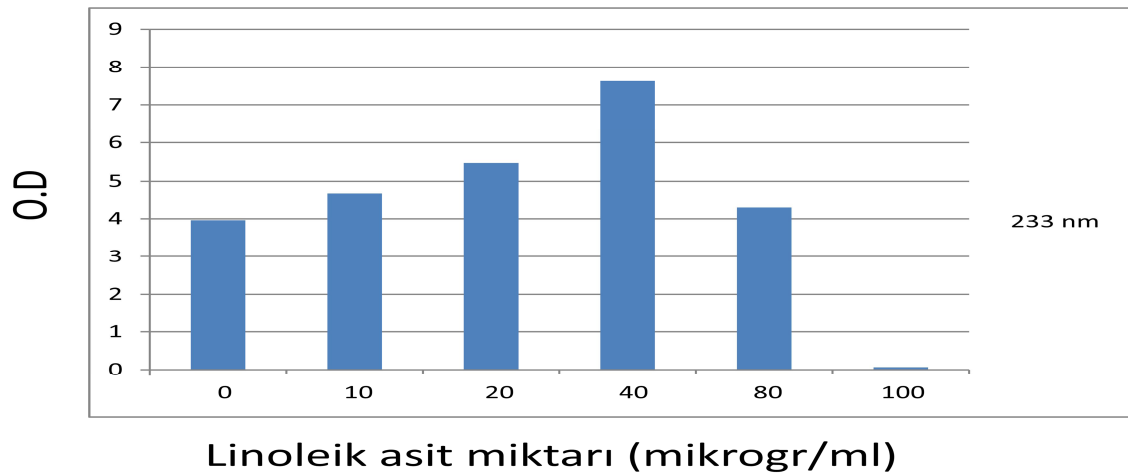
Şekil 5.10.AGF'da 30.dk'da linoleik asitin KLA ya dönüşme grafiği

Anaerobik gut funguslarında (GMLF54) 45.'dk da linoleik asitin KLA'ya dönüşme değeri ile farklı miktarlar arasındaki ilişki şekil 5.11'de verilmiştir. Grafiğin oluşumunda kullanılan analizlerde sıcaklık faktörü 37°C sabit tutularak bir kontrol grubu ve farklı miktarda 10 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl, 100 µl linoleik asit stok solüsyonu kullanılmıştır. Yapılan analizlerde sabit sıcaklıkta bekleme süresi 30 dk'da pik düzeyde artış gözlemlenirken 45 dk'dan itibaren sıcaklık enzim aktivasyonunda olumsuz etki göstererek ortamdaki ürün miktarı azalan oranda artış göstermektedir. Substratın toksik etkisi sıcaklıkla muamele süresinin uzamasıyla ortamdaki ürün artışını hızlı bir şekilde düşürerek 100 µl'ye ulaştığında ortamda ürün oluşumu gözlemlenmemektedir.



Şekil 5.11. AGF'da 45.dk'da linoleik asitin KLA ya dönüşme grafiği

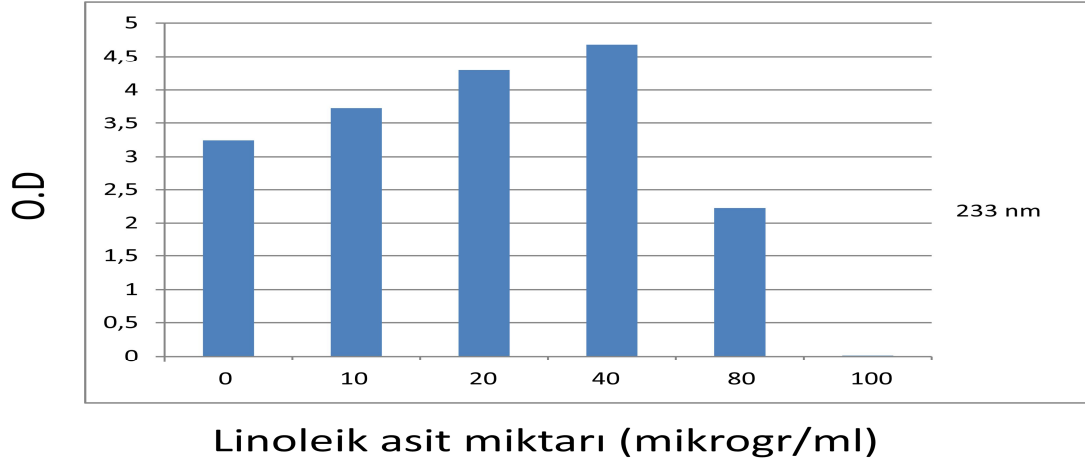
Anaerobik gut funguslarında (GMLF54) 60.'dk da linoleik asitin KLA'ya dönüşme değeri ile farklı miktarlar arasındaki ilişki şekil 5.12'de verilmiştir. Grafiğin oluşumunda kullanılan analizlerde sıcaklık faktörü 37°C sabit tutularak bir kontrol grubu ve farklı miktarda 10 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl 100 µl linoleik asit stok solüsyonu kullanılmıştır. Spektrofotometrik sonuçlara göre sabit sıcaklıkla muamele işlemi 45 dk ve sonraki sürelerde ortamdaki ürün miktarı azalan oranlarda artış göstermektedir. Substrat düzeyindeki toksik etkiye duyarlılık ve sıcaklık süresinin enzim aktivasyonu üzerindeki olumsuz etkisi nedeniyle ortamdaki ürün miktarı azalan oranda artış gösterirken substrat miktarı 40 µl'den sonra hızlı bir azalma gözlemlenmiş ve substrat miktarı 100 µl inhibisyon gözlemlenmiştir.



Şekil 5.12. 60.dk'da linoleik asitin KLA ya dönüşme grafiği

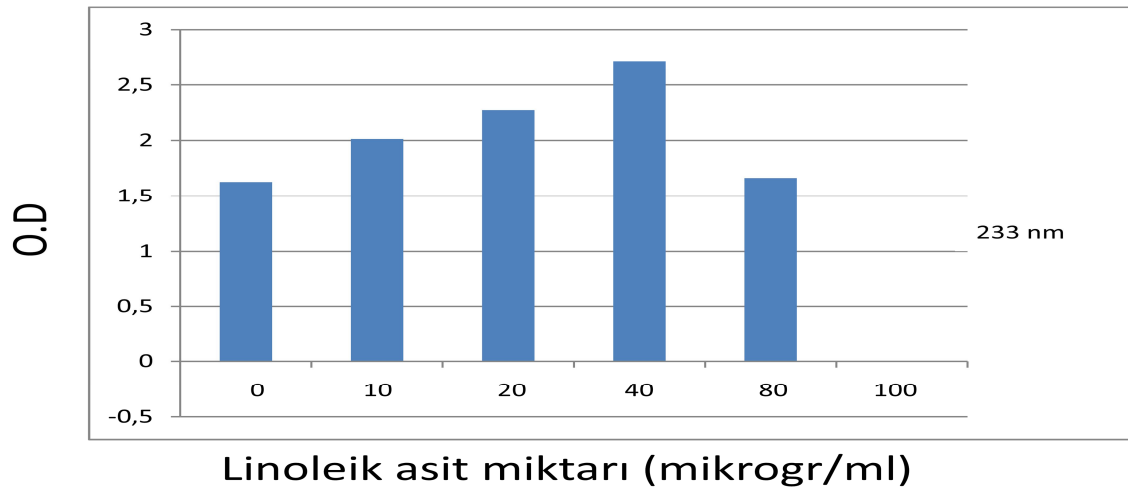
Anaerobik gut funguslarında (GMLF54) 90.'dk da linoleik asitin KLA'ya dönüşme değeri ile farklı miktarlar arasındaki doğrusal ilişki ve bu ilişkiye ait denklem şekil 5.13'de

verilmiştir. Grafiğin oluşumunda kullanılan analizlerde sıcaklık faktörü 37°C sabit tutularak bir kontrol grubu ve farklı miktarda 10 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl 100 µl linoleik asit stok solüsyonu kullanılmıştır. Sıcaklıkta muamele süresinin uzaması ortamda ürün miktarının açığa çıkmasında engelleyici etki göstermektedir.



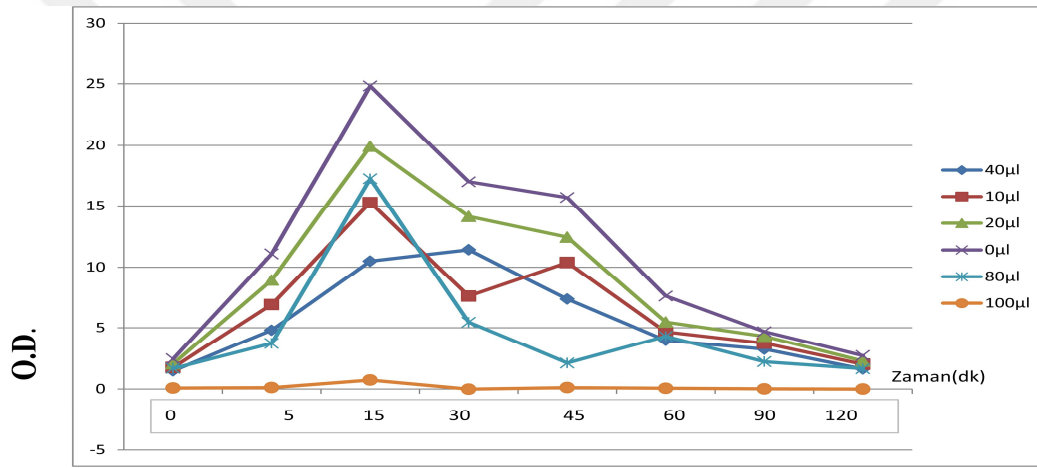
Şekil 5.13. 90.dk'da linoleik asitin KLA ya dönüşme grafiği

Anaerobik gut funguslarında (GMLF54) 120.'dk da linoleik asitin KLA'ya dönüşme değeri ile farklı miktarlar arasındaki doğrusal ilişki ve bu ilişkiye ait denklem şekil 5.14.'te verilmiştir. Grafiğin oluşumunda kullanılan analizlerde sıcaklık faktörü 37°C sabit tutularak bir kontrol grubu ve farklı miktarda 10 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl, 100 µl linoleik asit stok solüsyonu kullanılmıştır. Sabit sıcaklıkta 120 dk muamele edilmesi ve substratın toksik etkisi ile ürün oluşumunu inhibe etmiş ve ortamda ürün oluşumu gözlemlenmemiştir.



Şekil 5.14. 120.dk'da linoleik asitin KLA ya dönüşme grafiği

Bu çalışmada yapılan analizler sonucunda sıcaklık 37°C sabit tutularak sekiz farklı süre için farklı miktarlarda substrat kullanılarak linoleik asitin AGF'ları için KLA'ya dönüşümü incelenmiştir. Absorbans ve O.D değerleri hesaplanarak grafik oluşturulmuştur. Analizlere göre ortamdaki ürün miktarı substrat ve sıcaklıkla muamele süresine göre değişiklik göstermektedir. Sıcaklıkla muamele süresinin 30dk 'ya kadar ve substrat miktarının 40µl'ye kadar olduğu analizlerde ortamdaki ürün miktarında olumlu düzeyde artış gösterdiği belirlenirken, sıcaklıkla muamele süresinin 45dk, 60dk, 90dk ve 120dk olduğu durumlarda 40 µl ve 80 µl aralığında ortamdaki ürün miktarında hızlı bir azalış gözlenmektedir. Substrat düzeyi 100 µl olduğunda linoleik asitin toksik etkisi sıcaklıkla süre etkisine bakılmaksızın ortamda ürün oluşturmamaktadır. Bu durum AGF'larının sıcaklık süresi ve linoleik asite ne derece duyarlı olduklarını göstermektedir (Şekil 5.15).



Linoleik asit miktarı µgr/ml

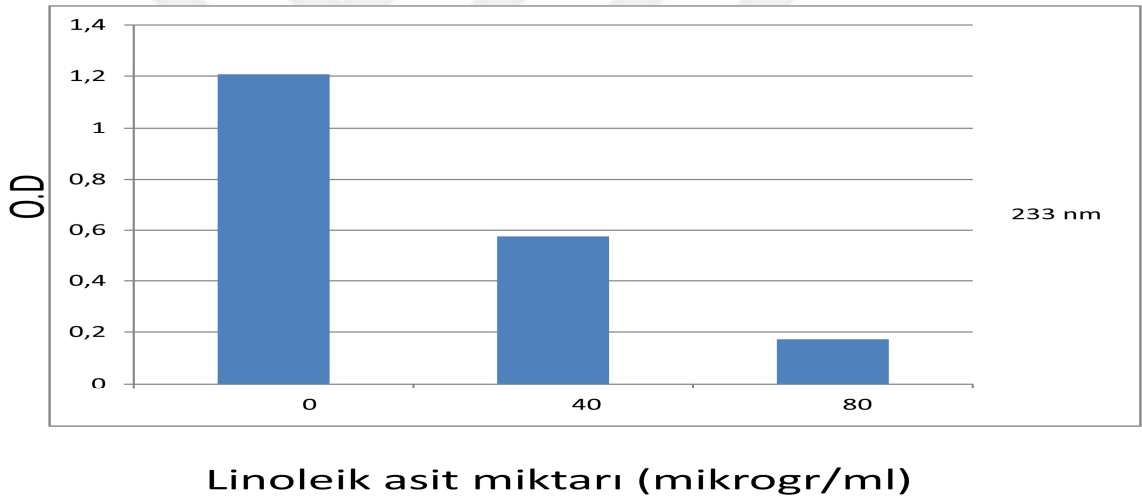
Şekil 5.15. AGF'larında sabit sıcaklıkta farklı sürelerde ve farklı substrat düzeylerinde linoleik asitin KLA'ya dönüşme grafiği

5.5. Farklı pH ve Linoleik Asitin AGF Gelişimi Üzerine Etkileri

Enerji kaynağı olarak glikoz kullanılarak hazırlanmış olan besiyeri solüsyonu Hungate tüplerine dağıtılmış ve hazırlama işleminden sonra kalibrasyonu yapılmış pH ölçer cihazında pH 5.6, pH 6.0, pH 6.4, pH 6.8, Ph 7.2 düzeylerinde beş farklı pH düzeylerine getirilmiş ve pH düzeyi istenilen seviye ye getirilmiş besiyeri içerisine 0.5ml GMLF54 anaerobik gut fungusu eklenmiş ve 72 saat boyunca gelişimi gözlenmiştir. Gelişimi gözlenen örnekler 72 saat sonunda hücreler santrifüj edilerek toplanmış ve azot gazı yardımıyla konsantre forma dönüştürülmüştür (bkz 4.4.4). Spektrofotometre cihazında okuma yapılmak üzere protokol esas alınarak gerekli çalışmalar yapılmış ve sonuçlar

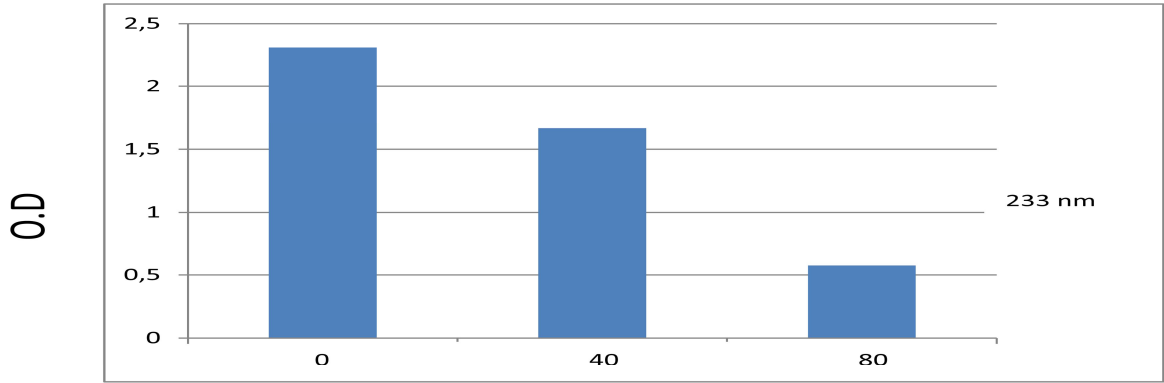
233nm dalga boyunda okuma yapılmıştır (bkz 4.4.5). Okuma yapılarak alınan sonuçlar hazırlanan standarda göre hesaplanmış ve sonuçlar grafikler şeklinde hazırlanmıştır.

Anaerobik gut funguslarında (GMLF54) pH5.6 düzeyinde ayarlanan besiyeri içerisinde linoleik asiti KLA'ya dönüşme değeri ile farklı miktarlar arasındaki ilişki şekil 5.16.'da verilmiştir. Grafiğin oluşumunda kullanılan analizlerde sıcaklık faktörü 37°C sabit tutularak besiyeri pH5.6 olacak şekilde bir kontrol grubu ve farklı miktarda 40 µl, 80 µl linoleik asit stok solüsyonu kullanılmıştır. Spektrofotometrik absorbans değeri oluşturulmuş ve optik dansite (O.D) elde edebilmek için gerekli standart denklemi ($y=0,0022x+0,057$) belirlenmiştir. Analizde ortamdaki ürün miktarındaki değişim gözlemlenirken ortam pH5.6 olarak ayarlanmıştır. Ortam pH5,6 iken anaerobik gut fungusları gelişimi için uygun bir ortam oluşmadığı için ortamdaki ürün miktarı düşük miktarda ve azalarak seyretmiştir. substrat miktarı 80 µl ya çıktığında ise ortamda ürün gözlenmemektedir.



Şekil 5.16. Besiyeri pH5.6 düzeyinde linoleik asitin KLA ya dönüştürme grafiği

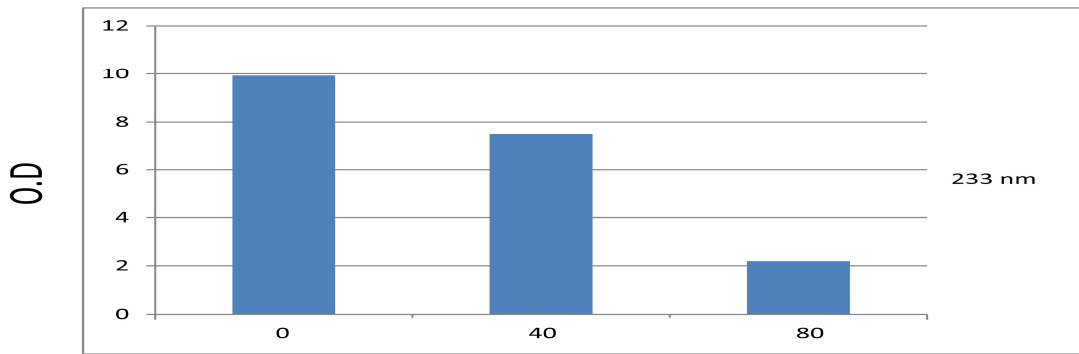
Anaerobik gut funguslarında (GMLF54) pH6.0 düzeyinde ayarlanan besiyeri içerisinde linoleik asiti KLA'ya dönüşme değeri ile farklı miktarlar arasındaki ilişki şekil 5.17.'te verilmiştir. Grafiğin oluşumunda kullanılan analizlerde sıcaklık faktörü 37°C sabit tutularak besiyeri pH6.0 olacak şekilde bir kontrol grubu ve farklı miktarda 40 µl, 80 µl linoleik asit stok solüsyonu kullanılmıştır. Ortam pH6.0 iken bir önceki grafikte pH5.6 'ya göre ürün miktarı azalan bir artış göstermektedir.



Linoleik asit miktarı (mikrogr/ml)

Şekil 5.17 Besiyeri pH6.0 düzeyinde linoleik asitin KLA ya dönüştürme grafiği

Anaerobik gut funguslarında (GMLF54) pH6.4 düzeyinde ayarlanan besiyeri içerisinde linoleik asiti KLA'ya dönüşme değeri ile farklı miktarlar arasındaki ilişki Şekil 5.18.'te verilmiştir. Grafiğin oluşumunda kullanılan analizlerde sıcaklık faktörü 37°C sabit tutularak besiyeri pH6.4 olacak şekilde bir kontrol grubu ve farklı miktarda 40 µl, 80 µl linoleik asit stok solüsyonu kullanılmıştır. Ortam pH seviyesinin pH6.4 olarak ayarlanması ile ortamdaki ürün miktarında artış gözlenmektedir. Substrat miktarı arttıkça ortamda açığa çıkan ürün miktarında azalma göstermekle beraber pH6.4'te ortam pH5.6-pH6.0 düzeyine göre ürün artışı gözlenmektedir.



Linoleik asit miktarı(mikroogr/ml)

Şekil 5.18 Besiyeri pH6.4 düzeyinde linoleik asitin KLA ya dönüştürme grafiği

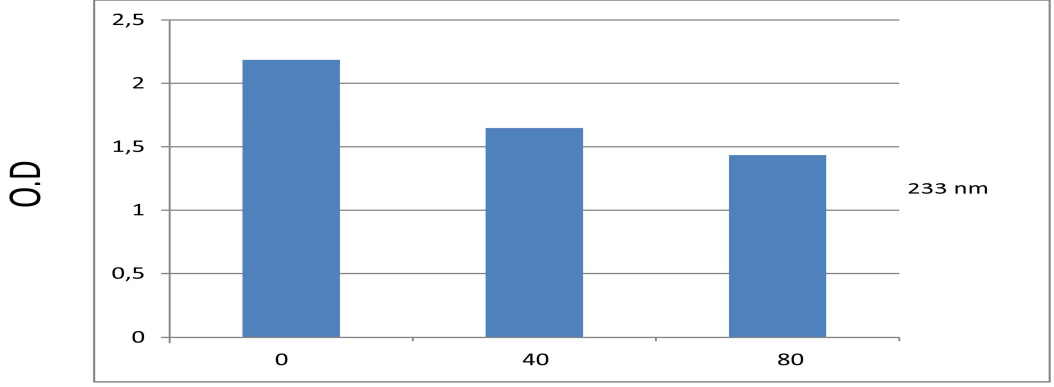
Anaerobik gut funguslarında (GMLF54) pH6.8 düzeyinde ayarlanan besiyeri içerisinde linoleik asiti KLA'ya dönüşme değeri ile farklı miktarlar arasındaki ilişki Şekil 5.19'te verilmiştir. Grafiğin oluşumunda kullanılan analizlerde sıcaklık faktörü 37°C sabit tutularak besiyeri pH6.8 olacak şekilde bir kontrol grubu ve farklı miktarda 40 µl, 80 µl

linoleik asit stok solüsyonu kullanılmıştır. Ortamdaki ürün miktarında artışın gözlemlendiği ve ürün miktarının pik seviyeye ulaştığı ortam pH6.8 olarak gözlemlenmektedir. Anaerobik gut funguslarının gelişiminin en uygun olduğu ortam pH6,8 olması nedeniyle ortamdaki ürün miktarının pik seviyeye ulaştığı görülmektedir. Substrat miktarının son konsantrasyonda 40 µl, 80 µl olarak eklenmiştir ve ortamda ürün miktarında artış gözlenmiştir. Ortamda uygun pH şartları ayarlanması substrat miktarına bağlı olarak KLA oranında artış göstermektedir.



Şekil 5.19 Besiyeri pH6.8 düzeyinde linoleik asitin KLA ya dönüştürme grafiği

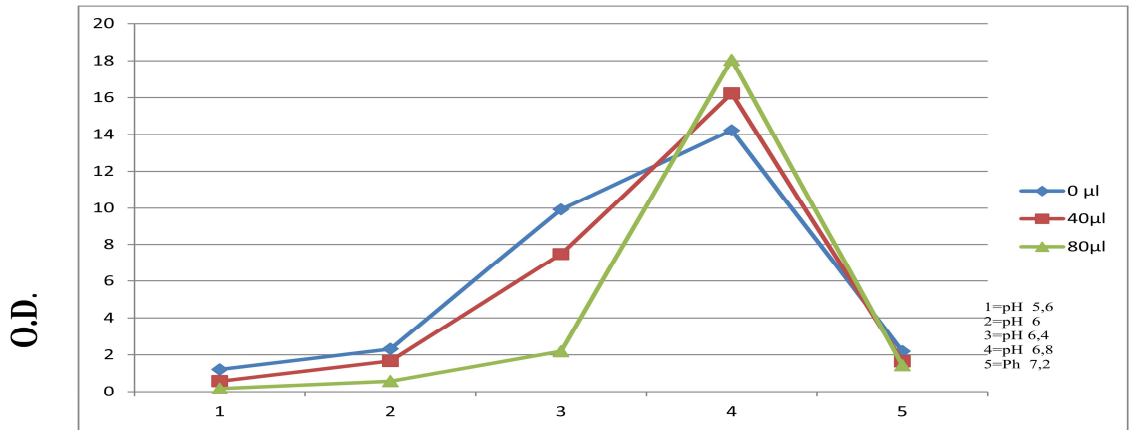
Anaerobik gut funguslarında (GMLF54) pH7.2 düzeyinde ayarlanan besiyeri içerisinde linoleik asiti KLA'ya dönüşme değeri ile farklı miktarlar arasındaki ilişki şekil 5.20'de verilmiştir. Grafiğin oluşumunda kullanılan analizlerde sıcaklık faktörü 37°C sabit tutularak besiyeri pH7.2 olacak şekilde bir kontrol grubu ve farklı miktarda 40 µl, 80 µl linoleik asit stok solüsyonu kullanılmıştır. Anaerobik gut funguslarının gelişim gösterdiği optimum pH6.8-7.0 olan ortamın bu düzey üzerine çıkması ortamdaki ürün miktarını olumsuz etkilediği gözlenmiştir. Substrat miktarındaki artış ürün miktarında azalma oluşturmuştur.



Linoleik asit miktarı (mikrogr/ml)

Şekil 5.20 Besiyeri pH7.2 düzeyinde linoleik asitin KLA ya dönüştürme grafiği

Çalışmada sıcaklık faktörü dikkate alınmaksızın ortamın pH düzeyleri değiştirilerek beş farklı pH ayarlanarak son konsantrasyonda 40 µl ve 80 µl substrat kullanılarak ortamda KLA miktarı ölçümü yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda en uygun pH düzeyinin AGF'lerinin gelişimi için uygun düzey olan pH6.8 olduğu ve linoleik asitin toksik etkisine karşı duyarlılığın en az seviyeye indirildiği gözlenmektedir. Aynı zamanda ortamdaki ürün miktarının pik seviyeye ulaştığı pH düzeyinde pH6.8 olduğu gözlenmiştir. Ortamın pH düzeyinin optimum seviye olan pH6.8-7.0 üzerinde olması ortamdaki ürün miktarında hızlı bir düşüş açığa çıkarmakta olup substrat miktarındaki artışla beraber toksik etkininde inhibitör madde olarak açığa çıkması ürün miktarında azalma neden olmaktadır (Şekil 5.21).



Linoleik asit miktarı µgr/ml

Şekil 5.21 AGF'lerinde besiyerinin farklı pH düzeylerinde ayarlanması sonucu linoleik asitin KLA'ya dönüşme grafiği

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Günümüz şartlarında özellikle de son yıllarda fonksiyonel gıdalara hızla artan talebin fonksiyonel gıdaların kalp-damar hastalıkları, kanser tedavileri, bağışıklık sistemi, vucut kompozisyonu üzerine birçok olumlu etkisinin bulunmasıyla olmaktadır. Fonksiyonel gıdalar besleyici özelliklerinden farklı olarak birçok hastalığa yakalanma riskini azaltan ve insan vücuduna fizyolojik yararlar sağlayan besinlerdir. Bu çalışma kapsamında da bu besinlerden bir tanesi olan KLA varlığı üzerine çalışılmış olup esansiyel bir omega-6 yağ asidi olan linoleik asitin yapısal bir izomer grupları olan ve biyolojik olarak aktif olan cis-9, trans-11 izomeridir. KLA özellikle hayvansal gıdalarda fazla bulunmakla birlikte ruminanlardan elde edilen et ve süt ürünlerinde oldukça fazla bulunmaktadır.

Bu çalışma süresince yapılan analizler rumen fungus izolasyonu ile başlayarak elde edilen *Neocallimastix frontalis* GMLF54 suşu kullanılarak sabit sıcaklıklarda farklı dakikalarda bekletilerek toksik etkisi olan linoleik asitin sıcaklık süresine linoleik asit miktar artışına duyarlı olduğu gözlenmiştir. Kullanılan linoleik asit miktarının artması gelişim için toksik etki gösterirken bunun yanında sıcaklık süresinin artması da gelişimde inhibisyona neden olmuştur.

Yine bu çalışmada yapılan analizler de rumen funguslarının normal düzeyde gelişim gösterdiği besiyeri ortamının pH düzeyinin değiştirilmesi ve linoleik asit ile muamele edilmesi sonucunda ortamdaki pH dalgalanmalarının ve linoleik asitin toksik etkisinin gelişimi durdurucu etkisi gözlemlenmiştir.

İnsan sağlığı ve gelişimi üzerine birçok pozitif etkisi olmasıyla büyük önem kazanan fonksiyonel bir gıda olan KLA üzerine yapılan bilimsel çalışmaların artırılmasıyla insan sağlığı üzerinde çok daha fazla pozitif etkilerinin netlik kazandırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- AKSHAY Joshi Vik , Vikram B. Lanjekar , Prashant K. Dhakephalkar , Tony M. Callaghan Gareth W.Griffith , Sumit Singh Dağar
- AKIN, D. E., & Rigsby, L. L. (1987). Mixed fungal populations and lignocellulosic tissue degradation in the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(9).
- ALATAŞ M. S., & Umucalılar, H. D. (2011). Bacteria of the rumen ecosystem and their roles. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(1), 71-83.
- AYDIN, R. 2005. Conjugated linoleic acid: chemical structure, sources and biological properties. *Türk J. Vet. Animal Sci.* 29: 189-195.
- AYDIN, R., Özsan E. 2003. Konjuge linoleik asitte son gelişmeler. II. Ulusal Hayvan Besleme Kongresi, 18- 21 Eylül 2003. Selçuk Üniversitesi, Konya.
- BANNI, S., 2002. Conjugated linoleic acid metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 13 (3), 261-266.
- BARR, J. (1989). *The variable spellings of the Hebrew Bible* (Vol. 73). Oxford University Press, USA.
- BAUMAN, D.E., BAUMGARD, L.H., CORL, B.A., GRIINARI, J.M., 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proceedings of the American Society of Animal Science*, 1-11.
- BAUMAN, DE ve Griinari, JM (2003). Süt yağı sentezinin beslenme düzenlenmesi. *Yıllık beslenme değerlendirmesi* , 23(1), 203-227.
- BAYDAR, H., 2000. Bitkilerde yağ sentezi, kalitesi ve kaliteyi artırmada ıslahın önemi. *Ekin Dergisi*, 11: 50-57.
- BENITO, P., NELSON, G.J., KELLEY, D.S., BARTOLINI, G., SCHMIDT, P.S., SIMON, V., 2001. The effects of conjugated linoleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. *Lipids*, 36: 229-236.
- BERGMAN, E.N., 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological reviews*, 70 (2), 567–590.
- BOLUKBAŞI, C., Erhan, M.K., Çelebi, Ş. 2005. The effects of dietary conjugated linoleic acid (cla), sunflower oil and soybean oil on fatty acid composition of yolk and egg quality in laying hen. *J. Food. Tech.* 3(3): 427-429.
- CHAMRUSPOLLERT, M., Sell J.L. 1999. Transfer of dietary conjugated linoleic acid to egg yolks chickens. *Poultry Sci.* 78: 1138-1150.

- CHERIAN, G., Georger, M.P., Ahn, D.U. 2002. Conjugated linoleic acid with fish oil alter yolk n-3 and trans fatty acid content and volatile compounds in raw, cooked and irradiated egg. *Poultry Sci.* 81: 1571-1577.
- CHIN, S.F., LIU, W., STORKSON, J.M., HA, Y.L., PARIZA, M.W., 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognised class of anti-carcinogens. *J. Food Composition and Analysis* 5: 185-197.
- CHOUINARD, S.W., Van, B.N. 2006. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19(6): 797-805.
- COLEMAN, G.S., 1975. The interrelationship between rumen ciliate protozoa and bacteria. I. W. McDonald ve A.C.I. Warner (ed.), *Digestion and Metabolism in the Ruminant*, University of New England Publishing Unit, Armidale, Australia. 149-164.
- COOK, V., & Cook, V. J. (1993). *Linguistics and second language acquisition*. London: Macmillan.
- DAVIES, D.R., Theodorou, M.K., Lawrence, M.I., Trinci, A.P.J. 1993. Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces. *Journal of General Microbiology* 139: 1395-1400
- DEHORITY, BA ve Tirabasso, PA (2000). Ruminal bakteri ve ruminal mantarlar arasında antibiyotik. *Baş. Environ. Microbiol.* , 66 (7), 2921-2927 sayılı belge.
- DEHORITY, B.A., 1998. Microbial interactions in the rumen. *Rev. Fac. Agron.* 15: 69-86.
- DEVERY R., MİLLER A., AND STANTON C 2001. Conjugated linoleic acid and oxidative behaviour in cancer cells. *Biochem Soc Trans.* 29:341-344.
- DU, M., AHN, D.U. 2002. Effect of dietary conjugated linoleic acid on the growth rate of live birds and on the abdominal fat content and quality of broiler meat1 . *Poult. Sci.* 81: 428-433.
- DURGAM V. R., FERNANDES G. 1997. The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF-7 cells is related to estrogen response system. *Cancer Lett.* 116:121-1301
- DOYLE, JJ ve Doyle, JL (1987). *Küçük miktarlarda taze yaprak dokusu için hızlı bir DNA izolasyon prosedürü* (No. ARAŞTIRMA).
- ECKBURG, P.B., LEPP, P.W., RELMAN, D.A., 2003. Archaea and their potential role in human disease. *Infect. Immun.* 71(2): 591-596.

- FRITSCHÉ, J., RICKERT, R., STEINHART, H., YURAWECZ, M.P., MOSSOBA, M.M., *frontalis*. J. Gen. Microbiol. 98: 423-430.
- GRIINARI JM., BAUMAN DE. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: Yurawecz MP. Mossoba MM., Kramer JKG., Pariza MW., Nelson GJ. Advances in conjugated linoleic acid research. AOCS Press, Champaign IL, s 180-200.
- GRIINARI, J.M, CORL, B.A., LACY, S.H., CHOUINARD, P.Y., NURMELA, K.V.V., BAUMAN, D.E., 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 -desaturase1,2. J Nutr, 130, 2285–2291.
- GRUNINGER, R. J., Puniya, A. K., Callaghan, T. M., Edwards, J. E., Youssef, N., Dagar, S. S., ... & McAllister, T. (2014). Anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. *FEMS microbiology ecology*, 90(1), 1-17.
- HO, Y.W., BARR, D.J.S., 1995. Classification of anaerobic fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia. Mycol. 87: 655-677.
- HUNGATE, R.E., 1966. The Rumen and Its Microbes. Academic Press, London, UK.
- 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. (1978). Bacterial ecology in the small intestine. *The American journal of clinical nutrition*, 31(10), S125-S127.
- JANSSEN, PH, ve Kirs, M. (2008). Rumen arkeal topluluğu . *Baş. Environ. Microbiol.* , 74 (12), 3619-3625'te açıklanmaktadır.
- JOBLİN, K. N. (1981). Isolation, enumeration, and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42(6), 1119-1122.
- JOSHÍ, M. A. (2018). *Digital image processing: An algorithmic approach*. PHI Learning Pvt. Ltd..
- JENSON, R.C. 2002. The composition of bovine milk lipid. J. Dairy Sci. 85: 295-350.
- KAMRA, D.N. 2005. Rumen Microbial Ecosystem. Current Science, 89 (1): 124-135.
- KARACA, E., ve AYTAÇ, S., 2007. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 22(1):123-13.
- KEPLER, C. R., Hirons, K. P., McNeill, J. J., & Tove, S. B. (1966). Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry*, 241(6), 1350-1354.

- KEPLER, C. R., & Tove, S. B. (1967). Biohydrogenation of unsaturated fatty acids III. Purification and properties of a linoleate Δ^{12} -cis, Δ^{11} -trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry*, 242(24), 5686-5692.
- KHANOL, R.C. 2004. Potential health benefits of conjugated linoleic acid(CLA) a review. *Asian Aust. J. Anim. Sci.* 17(9): 1315-1328
- KISHINO S, OGAW J, Ando A, IWASHITA T, FUJITA T, KAWASHIMA H ve SHİMİZU S. Structural analysis of conjugated linoleic acid produced by *Lactobacillus plantarum* and factors affecting isomer production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 179-182 (2003).
- KOBAYASHI, Y., 2006. Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: Need for basic and applied science. *Anim. Sci. J.* 77, 375–385.
- KÖKNAROĞLU, H. (2007). Beslemenin sığır eti konjuge linoleik asit miktarına etkisi. *Hayvansal Üretim*, 48(1).
- KRAUSE, D.O., RUSSEL, J. B., 1996. How Many Ruminal Bacteria Are There? *J. Dairy*
- KUTLU, H. R., Görgülü, M., & Çelik, L. B. (2005). Genel hayvan besleme. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü. Ders notu. Adana.
- LAWSON, N. D., Scheer, N., Pham, V. N., Kim, C. H., Chitnis, A. B., Campos-Ortega, J. A., & Weinstein, B. M. (2001). Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development*, 128(19), 3675-3683.
- LARQUE, E., Zamora, S., & Gil, A. (2001). Dietary trans fatty acids in early life: a review. *Early human development*, 65, S31-S41.
- LEE, S.W., Chouinard, Y., Van, B.N. 2006. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *Asian Aust. J. Anim. Sci.* 19(6): 799-805
- LI, J., HEATH, I.B., 1992. The phylogenetic relationships of the anaerobic chytridiomycetous gut fungi (Neocallimasticaceae) and the chytridiomycota. I. Cladistic analysis of rRNA sequences. *Can. J. Bot.* 70: 1738-1746.
- LIN H, BOYLSTON TD, CHANG MJ, LUEDECKE LO, SHULTZ TD. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. *J Dairy Sci* 1995;78:2358 – 65.
- LOWE, S.E., Griffith, G.W., Milne, A., Theodorou, M.K., Trinci, A.P.J. 1987. Life cycle and growth kinetics of an anerobic rumen fungus. *J.Gen.Microbiol.* 133: 1815-1827.

- MADİGAN, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2010). *Microbiología de los microorganismos*.
- METİN M. Süt Teknolojisi Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. E.Ü. Mühendislik Fakültesi Yayınları No:33, (1996).
- MILNE, A., THEODOROU, M.K., JORDAN, M.G.J., KING-SPOONER, C., TRINCI, A.P.J., 1989. Survival of anaerobic fungi in faeces, in saliva and in pure culture. *Exp. Mycol.* 13: 27-37.
- MIR, Z., Gounewardene, L.A., Okine, E., Jeagar, S., Scheer, H.D., 1999. Effect of feeding canola oil on constituents, conjugated linoleic acid (cla) and long chain fatty acids in goats milk. *Small. Rum. Resh.* 33: 137-143.
- MUNN, E.A., ORPIN, C.G., HALL, F.J., 1981. Ultrastructural studies of the free zoospore of the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen. Microbiol.* 125: 311-323.
- NAM, I.S., GARNSWORTHY, P.C., 2007a. Biohydrogenation of linoleic acid and production of conjugated linoleic acid by rumen fungi compared with rumen bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, 103: 551-556.
- NAM, I.S., GARNSWORTHY, P.C., 2007b. Factors Influencing Biohydrogenation and Conjugated Linoleic Acid Production by Mixed Rumen Fungi. *J. Microbiol.* 45(3): 199-204.
- NAS, S., GÖKALP, Y.H., ÜNSAL, M., 2001. Bitkisel Yağ Teknolojisi. Pamukkale Üniversitesi Mimarlık Fakültesi Matbaası, 322.Denizli.
- OGİMOTO, K., & Imai, S. (1981). *Atlas of rumen microbiology*. Japan Scientific Societies Press..
- ORPIN, C.G., 1975. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen.Microbiol.* 91:249-262.
- ORPIN, C. G. (1976). Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. *Microbiology*, 94(2), 270-280.
- ORPIN, C.G., 1994. Anaerobic fungi: taxonomy, biology and distribution in nature. *The Anaerobic Fungi*. (edt. C.G. Orpin ve D.O. Mountfort). Marcel Dekker, New York: 1-47.
- OYSUN G. Süt Kimyası ve Biyokimyası.Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, Yayın No: 18, (1987).
- OZKOSE, E., 2001. Morphology and molecular ecology of rumen fungi. PhD thesis, University of Wales, Aberystvyth, UK

- ÖZDEMİR, N., ve DENKBAŞ, E. B., 2003. Hayat veren yağlar: Omega yağları. *Bilim ve Teknik Dergisi*, 78-80.
- ÖZEL, O., & SARIÇİÇEK, B. (2009). Ruminantlarda rumen mikroorganizmalarının varlığı ve önemi (derleme). *TÜBAV Bilim Dergisi*, 2(3), 277-285.
- PALMQUIST D.L., Beaulieu A.D., Barbano D.M. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 76, 1753-1771.
- PARIZA, M.W., HARGRAVES W. 1985. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mice epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis*. 6:591-593.
- PARİZA, M.W. AND Y. L. HA 1990. Conjugated Linoleic Dienoic Derivatives of Linoleic Acid: Mechanism of Anticarcinogenic Effect in Mutagens and Carcinogens in the Diet. pp. 217. Wiley-Liss, Inc. New York.
- PARK, J. (1997). The World Wide Fund for Nature: Financing a New Noah's Ark. *Green Globe Yearbook*, 71-79.
- PARODİ PW. Cow's milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *Journal of Nutrition* 127, 1055-1060, (1997).
- PATTERSON, J.A., 1992. Rumen Microbiology. Editor-in-Chief Lederberg, J. *Encyclopedia of Microbiology*. Academic press. Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers. New York. Volume 3, 623-542.
- PHİLLİPS M.W., Gordon G.L.R. 1988. Sugar and polysaccharide fermentation by rumen anaerobic fungi from Australia, Britian and New Zealand. *BioSystems* 21: 377–383.
- RAES K., de Smet S., Demeyer D. (2004). Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 113, 199-221.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., 2001. *Molecular cloning, a laboratory*
- SANDERS, T.A.B., 1988. Essential and *trans*-fatty acids in nutrition. *Nutrition Research Reviews*. 1:57-58.
- SELINGER, L.B., FORSBERG, C.W., CHENG, K.J., 1996. The Rumen: A Unique Source of Enzymes for Enhancing Livestock Production. *Anaerobe*, 2: 263–284.
- TAŞAN, M. ve DAĞLIOĞLU O., 2005. Trans Yağ Asitlerinin Yapısı, Oluşumu ve Gıdalarla Alınması. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*. 2: 79-88.
- THEODOROU, M. K., Gill, M., King-Spooner, C., & Beever, D. E. (1990). Enumeration of anaerobic chytridiomycetes as thallus-forming units: novel method for

- quantification of fibrolytic fungal populations from the digestive tract ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(4), 1073-1078.
- THEODOROU, M.K., Davies, D.R., Jordon, M.G.C., Trinci, A.P.J., Orpin, C. 1993. Comparison of anaerobic fungi in faeces and rumen digesta of newly born and adult ruminants. *Mycological Research* 97: 1245- 1252.
- THEODOROU, D. N., Snurr, R. Q., & Bell, A. T. (1996). Molecular dynamics and diffusion in microporous materials. In *Comprehensive supramolecular chemistry* (pp. 507-548). Pergamon.
- TURHANER, K. ve Özdoğan, Ö. 2007. Konjuge linoleik asitlerin hayvan beslemedeki yeri. *Hasad Hayvancılık Dergisi* 22(263): 46-51.
- WANG, S., Garrity, GM, Tiedje, JM ve Cole, JR (2007). RRNA sekanslarının yeni bakteri taksonomisine hızlı bir şekilde atanması için Naese Bayesian sınıflandırıcı. *Baş. Environ. Microbiol.* , 73 (16), 5261-5267.
- WEİMER, M. W., Fréchet, J. M., & Gitsov, I. (1998). Importance of active site reactivity and reaction conditions in the preparation of hyperbranched polymers by self-condensing vinyl polymerization: Highly branched vs. linear poly [4-(chloromethyl) styrene] by metal-catalyzed “living” radical polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 36(6), 955-970.
- WILLIAMS, A.G., 1986. Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiol. Rev.* 50: 25-49.
- WUBAH, D.A., Fuller, M.S. and Akin, D.E., 1991b. Isolation of monocentric and polycentric fungi from the rumen and feces of cows in Georgia. *Can. J. Bot.* 69: 1232-1236.
- YARLETT, N.C., Yarlett, N., Orpin, C.G., Lloyd, D. 1986. Cryopreservation of the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Letters in Applied Microbiology* 3: 1-3.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : SÜMEYYE KARACA
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 27.04.1988 KIRŞEHİR
Medeni hali : Bekar
e-posta : smyy_krc@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	KSÜ/Zootekni	Halen devam
Lisans	KSÜ/Zootekni	2014
Ön lisans	ERÜ/HYS	2009
Lise	Argıncık Lisesi	2005

Yabancı Dil

İngilizce