



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



LİZOZİMİN RUMEN MİKROBİYEL FERMANTASYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN RUMEN SİMÜLASYON TEKNİĞİ (RUSITEC) İLE ARAŞTIRILMASI

Saad Ahmed Adam MUSA

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Hakan ÖZTÜRK**

**ANKARA
2017**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LİZOZİMİN RUMEN MİKROBİYEL FERMANTASYONU
ÜZERİNE ETKİLERİNİN RUMEN SİMÜLASYON TEKNİĞİ
(RUSITEC) İLE ARAŞTIRILMASI**

Saad Ahmed Adam MUSA

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Hakan ÖZTÜRK**

**ANKARA
2017**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “**Lizozimin rumen mikrobiyel fermantasyonu üzerine etkilerinin rumen simülasyon tekniği (RUSITEC) ile araştırılması**” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Saad Ahmed Adam MUSA

Tarih: 21.08.2017

İmza:

KABUL ve ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fizyoloji (Veteriner) Anabilim Dalında

Saad Ahmed Adam MUSA tarafından hazırlanan

“Lizozimin rumen mikrobiyel fermentasyonu üzerine etkilerinin rumen simülasyon tekniği (RUSITEC) ile araştırılması” adlı tez çalışması

aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile Kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21.08.2017



Prof. Dr. Nesrin Sulu

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı



Yrd. Doç. Dr. Ahu DEMİRTAŞ

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Raportör



Doç. Dr. Hakan ÖZTÜRK

Ankara Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
Grafikler	xi
1.GİRİŞ	
1.1. Rumen Ekosistemi, Ruminal Fermantasyonun Fayda ve Zararlı Yönleri	1
1.2. Ruminant Beslemede İyonofor Grubu Antibiyotikler	3
1.3. Lizozim	5
1.3.1. Lizozimin Yem Katkısı Olarak Kullanımı	8
2. GEREÇ ve YÖNTEM	10
2.1. İnkübasyon Tekniği	10
2.2. Deney Kurgusu	12
2.3. Numune toplanması ve Analizler	13
2.3.1. pH Ölçümü	13
2.3.2. Uçucu yağ asitleri üretiminin belirlenmesi	13
2.3.3. NH ₃ -N konsantrasyonunun belirlenmesi	14
2.3.4. Metan gazı üretiminin belirlenmesi	14
2.3.5. Toplam protozoon sayısının belirlenmesi	15
2.3.6. Kuru madde sindirilebilirliğinin belirlenmesi	15
2.4. İstatistiksel Analizler	16
3. BULGULAR	17
3.1. Lizozimin ruminal pH üzerine etkisi	17
3.2. Lizozimin toplam UYA üretimine etkisi	18
3.3. Lizozimin asetik asit üretimine etkisi	18
3.4. Lizozimin propiyonik asit üretimine etkisi	20
3.5. Lizozimin bütirik asit üretimine etkisi	20
3.6. Lizozimin metan gazı üretimine etkisi	21
3.7. Lizozimin ruminal NH ₃ -N konsantrasyonu üzerine etkisi	21
3.8. Lizozimin protozoon sayısı üzerine etkisi	23
3.9. Lizozimin yem kuru maddesi sindirilebilirliği üzerine etkisi	23
4. TARTIŞMA	25
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	32
ÖZET	33
SUMMARY	34
KAYNAKLAR	35
EKLER	42
Ek-1. Etik Raporu	42
ÖZGEÇMİŞ	43

ÖNSÖZ

Geviş getiren hayvanlar (ruminantlar) işkembelerine (rumen) yerleşmiş mikroorganizmalarla simbiyotik bir ilişki içerisindedir. Ruminant, mikroorganizmaların üreyip çoğalabilmeleri için onlara uygun yaşam ortamı ve besin sağlarken, mikroorganizmalar da selüloz gibi sindirimi güç lifli maddeleri rumende fermentasyonla sindirip, mikrobiyal proteinleri ve vitaminleri sentezleyerek ruminantın kullanımına sunmaktadır. Ancak, bu simbiyotik ilişki enerji (metan emisyonu şeklinde kayıp) ve protein (azot kaybı) metabolizmaları açısından oldukça verimsizdir (Van Nevel ve Demeyer, 1988). Ruminantın yemle aldığı sindirilebilir enerjinin %8-12'si rumendeki mikroorganizmalar tarafından metana dönüştürölerek atmosfere salınmakta, yine yem azotun %75-85'i dışkı ve idrarla kaybedilmektedir (Tamminga, 1992). Bu kayıplar ruminantta sadece verim düşüklüğüne yol amayıp aynı zamanda çevrenin de kirlenmesine neden olmaktadır (Tamminga, 1996).

Bilim insanları rumendeki enerji ve azot kayıplarını azaltarak ruminant verimliliğini yükseltmek için uzun yıllardır ruminal mikrobiyal popölasyonu modifiye etmeye çalışmaktadır. Bu amaçla rasyon bileşimini optimize etme ve çeşitli yem katkı maddeleri ile belirli mikroorganizma gruplarını stimüle etme veya baskılama yöntemleri uygulanmaktadır. Antibiyotikler yem katkı maddesi olarak rumendeki enerji ve azot kayıplarını azaltmak için uzun yıllar başarılı bir şekilde kullanılmışlardır. Antibiyotiklerin kullanımı, insan tüketimine sunulan hayvansal kaynaklı gıdalarda (et, süt gibi) kalıntı oluşturması ve bakterilerde antibiyotik dirençliliğine yol açabilmesi nedenleriyle hem sosyal hem de bilim çevrelerince şiddetli eleştirilere maruz kalmıştır. Bu eleştiriler neticesinde 1 Ocak 2016 tarihinden itibaren Avrupa Birliğinde, 21 Ocak 2016 tarihinden itibaren ise Türkiye'de antibiyotiklerin hayvan besleme alanında kullanımı yasaklanmıştır (OJEU 2003; Resmi Gazete: Sayı: 26056). Bu nedenle bilim insanları ruminal fermentasyonun modifikasyonunda antibiyotiklere alternatif olabilecek daha güvenli maddelerin keşfi üzerine yoğun araştırmalar yapmaya başlamışlardır.

Lizozim, Alexander Fleming tarafından 1921 yılında keşfedilmiş antimikrobiyal etkili bir enzimdir (Fleming, 1922). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ile Gıda ve Tarım

Örgütü (FAO) 1993 yılında lizozimin toksik olmadığını açıklamış ve birçok ülkede gıdaların bozulmasını geciktirme ve mikrobiyal üremeyi baskılama amaçlarıyla gıda katkı maddesi olarak kullanımına izin vermiştir (Üstümkol, 2006). Hayvansal üretim süreçlerinde lizozimin yem katkı maddesi olarak kullanımı ve etkileri sadece monogastrik hayvanlarda (kanatlı ve domuz yetiştiriciliği) araştırılmıştır (Oliver ve Wells, 2015). Yemlik antibiyotikler gibi özellikle gram pozitif bakteriler üzerine antimikrobiyal özellik gösteren lizozimin ruminal fermantasyonun modifikasyonunda antibiyotiklere alternatif olma potansiyeli üzerine ise neredeyse hiç bilimsel veri bulunmamaktadır. Bu yüksek lisans tezinin amacı lizozimin ruminal mikrobiyal fermantasyon üzerine etkilerini uzun süreli bir inkübasyon modeli olan Rumen Simülasyon Tekniği (***RU*men *SI*mulation *TE*chnique**, RUSITEC) yardımıyla belirlemek ve bu suretle lizozimin ruminant verimliliği üzerine olası etkilerini ortaya koymaktır. Bu bağlamda bu yüksek lisans tezinde aşağıdaki şu hipotezler test edilmiştir.

H0 = Lizozim enzimi sahip olduğu antimikrobiyal etkinlik sayesinde ruminal mikrobiyal ekosistemi modifiye ederek ruminal fermantasyonun temel parametrelerinde (pH, uçucu yağ asitleri üretimi, metan gazı üretimi, protozoon sayısı, NH₃-N konsantrasyonu, yem kuru maddesi sindirilebilirliği) hayvan verimliliğini olumlu yönde değiştirecek etkiler oluşturur.

H1 = Lizozim enzimi ruminal fermantasyonun temel parametrelerinde hayvan verimliliğini olumlu yönde değiştirecek etkiler oluşturmaz.

Tez konumun seçiminde ve tez çalışmamın her aşamasında engin bilgilerinden yararlandığım ve yardım aldığım çok sevgili danışman hocam sayın Doç. Dr. Hakan ÖZTÜRK'e,

Yüksük lisans eğitimim süresince her zaman beni destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Bahri EMRE, Prof. Dr. Nesrin SULU, Prof. Dr. İlksin PİŞKİN, Prof. Dr. Çiğdem ALTINSAAT, Doç. Dr. Yasemin SALGIRLI DEMİRBAŞ ve emekli olan Prof. Dr. Meltem ŞİRELİ hocalarıma,

Yem analizlerimde yardımcı olan Sayın Araş. Gör. Dr. Neşe Nuray TOPRAK ve rumen içeriği temininde yardımcı olan veteriner hekim Sayın Yakup HANCI'ya,

Tezimde kullandığım lizozimi tedarik eden Mayasan Gıda Sanayi Ticaret Anonim şirketi'ne,

Fizyoloji Anabilim Dalındaki asistan arkadaşlarım Celalettin Etkin şAFAK, Ferhunde Melis ÜNLER ve Betül DEMİR'e, Fizyoloji Anabilim Dalı personelleri Başat YÜZER ve şazım SAĞLAM'a Türkiye'de bulunduğum zaman zarfında beni aralarına kabul edip, yardım ve desteklerini esirgemedikleri için teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında bana verdikleri destek, gösterdikleri sabır ve anlayışları için sevgili aileme şükranlarımı arz ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	Santigrat derece
CH ₄	Metan gazı
CO ₂	Karbondiyoksit
G	Gram
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change (Hükümetlerarası İklim Değişikliği Paneli)
Kg	Kilogram
KJ	KiloJul
KMS	Kuru Madde Sindirebilirliği
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
NH ₃ -N	Amonyak Azotu
RUSITEC	RUmen SIMulation TEChnique
U	Ünite
UYA	Uçucu Yağ Asitleri
β	Beta
μL	Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Lizozimin yapısı	7
Şekil 1.2. Lizozimin gram pozitif bakterilerin hücre duvarına litik etkisi	7
Şekil 2.1. Rusitec Sistem su banyosu ve fermenterleri (Çalışma Öncesi)	10
Şekil 2.2. Rusitec Sistem (Çalışma Sırasında)	11
Şekil 2.3. Protozoon sayım solüsyonu ile boyanmış ve seyreltilmiş rumen protozoonlarının ışık mikroskopunda görünümü	15



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Deneme yeminin kimyasal bileşimi	11
Çizelge 2.2. Tampon solüsyonun kimyasal bileşimi	12
Çizelge 3.1. Lizozimin ruminal mikrobiyal fermantasyon üzerine <i>in vitro</i> etkileri	17



GRAFİKLER

Grafik 3.1. Lizozimin ruminal pH üzerine etkisi	18
Grafik 3.2. Lizozimin toplam UYA üretimi üzerine etkisi	19
Grafik 3.3. Lizozimin asetik asit üretimi üzerine etkisi	19
Grafik 3.4. Lizozimin propiyonik asit üretimi üzerine etkisi.	20
Grafik 3.5. Lizozimin bütirik asit üretimi üzerine etkisi	21
Grafik 3.6. Lizozimin metan gazı üretimi üzerine etkisi	22
Grafik 3.7. Lizozimin ruminal NH ₃ -N konsantrasyonu üzerine etkisi	22
Grafik 3.8. Lizozimin protozoon sayısı üzerine etkisi	23
Grafik 3.9. Lizozimin kuru madde sindirilebilirliği üzerine etkisi	24

1. GİRİŞ

1.1. Rumen Ekosistemi, Ruminal Fermantasyonun Fayda ve Zararlı Yönleri

Geviş getiren hayvanlarda midenin organizasyonu sindirim fizyolojisi açısından çok önemli bir göreve sahiptir. Bu hayvanlarda mide, bez içermeyen kutan mukozaya sahip ön mideler (rumen, retikulum, omasum) ve sindirim enzimlerini salgılayan bezlerin bulunduğu glandüler mideden (abomasum) oluşmaktadır. Hayvanın yediği yemler öncelikle bezlerin olmadığı ön midelere gelir ve buraya yerleşmiş muazzam sayı ve çeşitlilikteki mikroorganizmalar tarafından fermantasyonla yıkılırlar ve metabolize edilir (Van Soest, 1994). Ruminant, bir konakçı olarak mikroorganizmalara yaşayabilecekleri uygun yaşam alanı ve besin tedarik ederken, mikroorganizmalar da ruminanta yeryüzünde hiç bir memeli hayvanın sahip olmadığı enzim sistemleri (selülaz gibi) vasıtasıyla sindirimi güç organik maddeleri sindirerek, ruminantın kullanabileceği bileşikleri bahşeder. Yani ruminantın midesinde ruminant ve mikroorganizmalar arasında karşılıklı çıkara dayanan simbiyotik bir ilişki bulunmaktadır. Dünya üzerindeki organik maddelerin yarısından fazlasını bitkilerin yapısında bulunan, insan ve memeli hayvanların β -1,4 glikozidik bağları parçalayamaması nedeniyle sindiremediği selülozun oluşturduğu düşünülürse ruminatların dünya besin zincirindeki önemleri daha iyi anlaşılabilir (Kuenzle ve Jenny, 1979). Çünkü normalde memelilerce sindirimi mümkün olmayan selüloz, mikroorganizmaların sahip olduğu selülaz enzimi sayesinde sindirilerek ruminant tarafından et, süt gibi kıymetli ürünlere dönüştürülür. Giesecke ve Hendrickx (1973), mikroorganizmaların muazzam çeşitlilikteki zengin enzim sistemleri sayesinde organik maddeleri monomerler ve elementlere kadar parçalayabildiğini, bu nedenle dünyadaki biyolojik madde döngüsünde çok önemli role sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Ruminant ön mideleri arasında mikrobiyal sindirimin en yoğun gerçekleştiği özelleşmiş bölüm rumendir. Rumen sıvısının her bir mililitresinde 200'den fazla türü belirlenmiş yaklaşık 10^{10} - 10^{11} kadar bakteri, 20'den fazla türü izole edilmiş 10^6 kadar protozoon, 10^3 - 10^5 kadar mantar ve 10^8 - 10^9 kadar da bakteriyofaj

bulunmaktadır (Kamra, 2005; Russell ve Hespell, 1981). Hayvanın yediği yemleri mikroorganizmalar burada fermentatif olarak sindirerek üreyip çoğalır ve fermentasyon ürünü olarak uçucu yağ asitleri (asetik, propiyonik ve bütirik asitler gibi) oluştururlar. Bu maddeler de rumen epitelinden hızla kana emilerek ruminantın enerji ihtiyacının yaklaşık % 75'e kadar olan bölümünü karşılarlar (Faverdin, 1999). Rumende üreyip çoğalan mikroorganizmalar aynı zamanda kimusla bezli mide kısmı olan abomasuma ve ince bağırsaklara gelerek hayvanın kendi sindirim enzimleri ile sindirilir, ruminant için protein ve vitamin kaynağı (B ve K vitaminleri) olurlar (Öztürk, 2007). Ancak, bu simbiyotik ilişki enerji ve protein metabolizmaları açısından oldukça verimsizdir (Van Nevel ve Demeyer, 1988). Ruminantın yemle aldığı sindirilebilir enerjinin %8-12'si rumendeki mikroorganizmalar tarafından metana (CH₄) dönüştürülerek atmosfere salınmakta, yine yem azotunun %75-85'i dışkı ve idrarla kaybedilmektedir (Tamminga, 1992). Bu kayıplar ruminant için sadece verim kaybı anlamına gelmemekte, aynı zamanda çevrenin de kirlenmesine yol açmaktadır (Tamminga, 1996).

Ruminantın yediği yemler ruminal ekosistemin üyelerinden olan Gram-pozitif bakterilerce hayvan verimliği açısından pek arzu edilmeyen asetik asit, H⁺, CH₄ ve NH₃ gibi ürünlere dönüştürülür. Arzu edilmeyen bu ürünlerden olan renksiz ve kokusuz metan gazı, ruminal fermentasyon sırasında oluşan H⁺ ve CO₂ gazlarının metanojenik arkelerce metabolize edilmesi sonucunda şekillenir (CO₂ + 4(2H) → CH₄ + 2H₂O). Bir litre CH₄, 39,5 kJ yem enerjisine karşılık gelmektedir. Yetişkin bir sığırdaki saatte ortalama 12 litre, günde ise 250-500 litre kadar metan gazı üretilmektedir (Johnson ve Johnson, 1995). Metan gazı ruminant tarafından değerlendirilemez, hayvanın geçirmesiyle (ruktus) atmosfere atılır. Yani hayvanın yemle aldığı enerji hayvan verimliliğine yansıtılamadan kaybedilmektedir. Tamminga (1992), rumendeki metan gazı oluşumuyla şekillenen kaybın yem enerjisinin %8-12'sine karşılık geldiğini bildirmektedir. Metan aynı zamanda küresel ısınmaya neden olan bir sera gazıdır. Antropojenik sera etkisinin oluşumundaki payı %18 kadardır. Atmosferdeki ömrü yaklaşık 10 yıl olan metanın karbondioksit gazına kıyasla kızılötesi ışınları absorbe etme yeteneği 58 kat, atmosferi ısıtma potansiyeli (*global warming potential*) ise 23 kat daha fazladır (IPCC, 2001). Bu bakımdan ruminal CH₄ üretimi dünya ekolojisi açısından da sorun teşkil etmektedir.

Rumende üreyip çoğalan mikroorganizmaların yapısındaki proteinlere mikrobiyal protein denir. Bu proteinler rumenden asıl bezli mide bölümü olan abomasuma geldiğinde sindirilerek hayvanın protein ihtiyacına katkı sağlar. Mikrobiyal protein sentezi rumende fermente edilen organik madde miktarına bağlıdır (Oba ve Allen, 2003). Lebzien ve ark. (1996), süt ineklerinde sindirilen her kg organik madde için 156 ± 24 g mikrobiyal protein üretildiğini bildirmişlerdir. Diğer bir ifadeyle bir günde rumende fermente edilen 12 kg organik madde için yaklaşık 2 kg mikrop proteini oluşmaktadır (Clark ve ark., 1992). Bu miktar ise çoğu zaman yemle alınan miktardan bile daha fazladır.

Rasyonla alınan proteinler ve aminoasitler rumende hızla karbon iskeletine, uçucu yağ asitlerine ve amonyağa kadar parçalanır. Bu yıkım ürünleri aynı zamanda mikrobiyal protein sentezi için hammadde olarak kullanılır. Rumende çoğu zaman mikroorganizmaların kapasitesini aşan miktarlarda NH_3 oluşur ve bu amonyak rumen epitelinden hızla kana emilir. Amonyak toksik bir maddedir ve karaciğerde zararsız bir form olan üreye dönüştürülür. Ürenin bir bölümü rumino-hepatik azot döngüsüyle kan dolaşımıyla tükürük bezlerine gider ve salgılanan tükürükle tekrar rumene döner. Diğer bir bölümü ise kan ile böbreklere gider, glomerüler filtrasyonla idrara geçer ve dışarı atılır. Dışarı atılan bu üre yem azotunun yaklaşık %20-25'lik kısmına karşılık gelmektedir (Leng ve Nolan, 1984).

1.2. Ruminant Beslemede İyonofor Grubu Antibiyotikler

İyonofor grubu antibiyotikler 1970'li yılların ortalarından beri ruminant beslemede kullanılan antimikrobiyal yem katkı maddelerindendir. Ruminant verimliliğindeki artış ve hayvansal üretimdeki karlılık etkileri nedeniyle tüm dünyada yaygın kullanım alanı bulmuş ve ruminant beslemede oldukça popüler olmuşlardır (McGuffey ve ark., 2001). Yol açtıkları faydalar nedeniyle çok sayıda iyonofor antibiyotik (monensin sodyum, lasalosid sodyum, laidlomisin propiyonat potasyum gibi) keşfedilmiş ve yemden yararlanmayı artırmak amacıyla ruminant rasyonlarına ilave edilmişlerdir (Dubuc ve ark., 2009 ve Yang ve ark., 2007). İyonoforlar Streptomyces türü mantarlarca üretilen lipofilik karakterde organik bileşiklerdir. Bu bileşikler bakteri hücre zarından iyonların transportunu değiştirerek

iyon dengesini bozar. Bakteri, iyon dengesini yeniden kurmak için tüm enerjisini tüketir ve sonunda ölür (Duffield ve ark., 2008 ve Russel ve Strobel, 1989). İyonoforlar rumende daha ziyade gram pozitif bakteriler üzerine baskılayıcı etkiye sahiptir (McGuffey ve ark., 2001). Gram negatif bakteriler, gram pozitiflerden farklı olarak hücre zarların dışında kalın ve kompleks bir hücre duvarına sahiptir. Lipopolisakkarit yapısındaki bu duvarda iyonoforların geçemeyeceği çapta protein kanallar ve porlar vardır. Bu nedenle iyonoforlar gram negatif bakteri hücrelerine infiltre olamaz (Ipharraguerre ve Clark, 2003). Gram pozitifler hücre duvarından yoksun olduklarından iyonoforlar kolaylıkla bakteri hücrelerine infiltre olur, hücre içi potasyum hızla hücre dışına çıkar, hücre dışındaki sodyum ve hidrojen iyonları ise hücre içine girer. Bu durum hücre içi pH'nın düşmesine ve potasyum yetersizliğine bağlı protein sentezinin baskılanmasına yol açar. Bakteri iyon dengesini yeniden kurmak için tüm enerjisini tüketir, hücre içi asitlik nedeniyle sonunda hücre ölümü şekillenir (Ipharraguerre ve Clark, 2003 ve McGuffey ve ark., 2001).

Gram pozitif bakterilerin rumendeki fermantasyon son ürünleri arasında asetat, bütirat, laktat, format, amonyak ve hidrojen bulunmaktadır. Metanojenler bu ürünlerden metan üretirler. Gram negatif bakteriler ise fermantasyon son ürünleri olarak daha ziyade propiyonat ve süksinat üretirler. Rumende gram negatiflerin baskın olması bu bakımdan daha az metan üretileceği anlamına gelir. Rumen protozoonlarının fermantasyon son ürünleri arasında format, amonyak ve hidrojen bulunmaktadır. İyonoforlar hem gram pozitif bakteriler hem de protozoonlar üzerine baskılayıcı etki gösterdiğinden ruminal metan üretimini dolaylı yoldan baskılamaktadırlar (Ipharraguerre ve Clark, 2003; McGuffey ve ark., 2001 ve Odongo ve ark., 2007). Johnson ve Johnson (1995), iyonofor kullanımının ruminal metan üretiminde %30'lara varan bir azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Ruminal metan üretiminin azaltılması ise ruminal enerji verimliliğinin artması ve yem enerjisinin hayvan verimine yönlendirilmesi anlamına gelmektedir.

Newbold ve ark. (1990), iyonoforların rumende proteolizisi daha az olmakla birlikte peptidolizisi ve aminoasitlerin deaminasyonunu belirgin şekilde baskıladığını bildirmiştir. Bu durum iyonoforların gram pozitif hiper amonyak üreten bakterileri ve protozoonları baskılamasına atfedilmiştir. İyonoforların varlığında ruminal

amonyak konsantrasyonunda gözlenen azalma da bu durumla ilişkilidir. Ruminant rasyonlarına iyonofor grubu antibiyotiklerin katılması, sonuç olarak rumenden duodenuma daha fazla protein ve peptidin geçmesine, hayvanın yem proteinini daha iyi değerlendirmesine yol açmaktadır. Hayvansal üretimde %10'lara varan verim artışına neden olan iyonoforların ekonomik getirisi üretimin en az kar marjı kadar yüksektir (Hobson ve Stewart, 1997; Russell ve Houlihan, 2003).

İyonofor grubu antibiyotikler ruminal fermantasyon üzerine olan olumlu etkileriyle ekonomik olarak büyük kazançlara yol açsa da antibiyotiklerin hayvansal üretim süreçlerinde kullanımı insan tüketimine sunulan hayvansal kaynaklı gıdalarda (et, süt gibi) kalıntı oluşturması ve bakterilerde antibiyotik dirençliliğine yol açabilmesi nedenleriyle hem sosyal hem de bilim çevrelerinde şiddetli eleştirilere neden olmuştur. Bununla birlikte geniş getiren hayvanlar iyonoforları iyi tolere etseler de atlar iyonoforlara 10 kat daha fazla duyarlıdır. Ruminant beslemede kullanılan monensin miktarları atlarda ölüme yol açabilmektedir. Aynı değirmeni kullanan ve birçok hayvan türü için üretim yapan yem fabrikalarında bu durum ciddi problemlere yol açabilmektedir. Yine yem fabrikalarındaki üretim süreçlerinde monensine maruz kalan çalışanlarda baş ağrısı, mide bulantısı, burun kanaması ve deri lezyonları gibi semptomlar bildirilmiştir (Pressman, 1985). Bu olumsuzluklar ve eleştiriler neticesinde 1 Ocak 2016 tarihinden itibaren Avrupa Birliğinde, 21 Ocak 2016 tarihinden itibaren ise Türkiye'de antibiyotiklerin hayvan besleme alanında kullanımı yasaklanmıştır (OJEU 2003; Resmi Gazete: Sayı: 26056). Bu nedenle bilim insanları ruminal fermantasyonun modifikasyonunda antibiyotiklere alternatif olabilecek daha güvenli maddelerin keşfi üzerine yoğun araştırmalar yapmaya başlamışlardır.

1.3. Lizozim

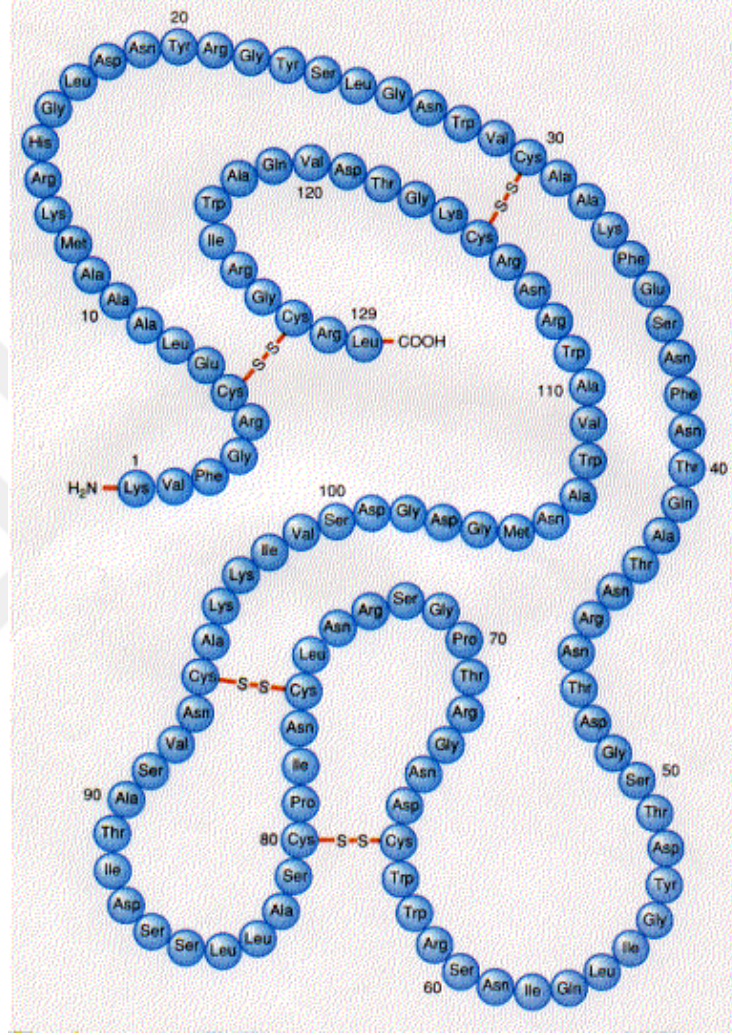
Lizozim enzimi (1,4- β -N-asetilmuramidaz) canlı organizmalarda bulunan ve sindirimden bağışıklığa kadar birçok farklı işlevi yerine getiren universal bir enzimdir. Hem enzimatik ve hem de bakteriyolitik özelliğe sahip bu madde 1921 yılında Alexander Fleming tarafından tesadüfen keşfedilmiştir. Hasta olan Fleming'in burun akıntısı o sırada üzerinde çalıştığı bakteri kültürüne damlamıştır.

Fleming, bir süre sonra bakteri kültüründe burun salgısının damladığı yerdeki bakterilerin parçalandığını fark etmiş ve bu duruma burun salgısındaki bir enzimin neden olduğunu düşünerek bu enzime lizozim ismini vermiştir (Phillips, 1966; Proctor ve Cunningham, 1988). Alexander Fleming aynı zamanda *Penicillium notatum* isimli küf mantarından penisilini bulan ve bu buluşu nedeniyle 1945 yılında Fizyoloji/Tıp alanında Nobel ödülü kazanan İskoçyalı bakteriyologdur (Sahoo ve ark., 2012). Lizozim insan, hayvan ve bitkilerin neredeyse bütün salgı ve dokularında bulunmaktadır. Miktarca en fazla tavuk yumurtası akında bulunur ve toplam yumurta akı proteininin yaklaşık %3,5'ini teşkil eder (Guérin-Dubiard ve ark., 2005). Yumurtadan çıkmaya yaklaşık yedi gün kalıncaya kadar yumurta ve gelişmekte olan civciv embriyosu immunglobulinleri üretemez. Yumurta akının yüksek lizozim konsantrasyonu sayesinde yaşamın bu safhasında civcive immun savunmada lizozim yardımcı olur (Jolles ve Jolles, 1984). Lizozim gram pozitif bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan tabakasındaki glikozidik bağları parçalar. Bu durumda bakteri hücresinin zar bütünlüğü bozulur ve hücre ölümü şekillenir (Ellison ve Giehl, 1991).

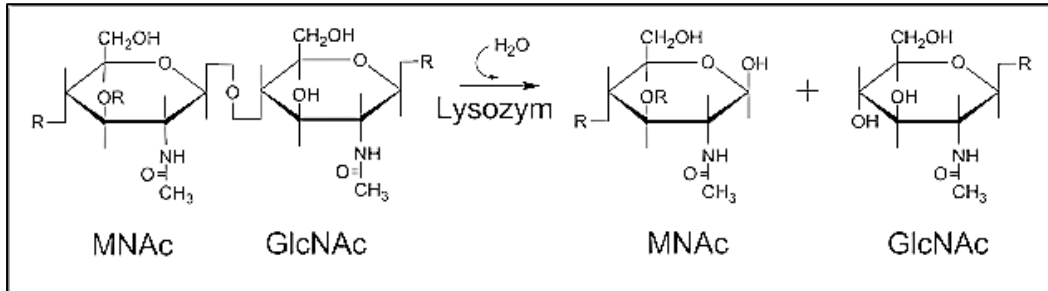
Lizozimin yapısı 1963 yılında Jolles ve arkadaşları tarafından açığa kavuşturulmuştur (Jollès ve ark., 1963). Lizozim molekülü 129 aminoasitten oluşan tek bir polipeptit zincirdir. Yapısındaki dört çapraz disülfid bağı nedeniyle düz bir polipeptit zincir şeklinde değildir. Disülfid bağları 6.-127., 30.-115., 64.-80. ve 76.-94. sistein aminoasitleri arasında yer alır (Proctor ve Cunningham, 1988). Lizozimin molekül ağırlığı yaklaşık 14 313 Dalton, izoelektrik noktası ise 10,7'dir. Şekil 1.1 de lizozim molekülünün yapısı görülmektedir (Belitz ve ark., 2001 ve Humeny ve ark., 2002).

Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı peptidoglikanlardan kurulmuştur. Bu tabaka şeker derivatları olan N-Asetilglukosamin (GlcNAc) ve N-Asetilmuraminasitler (MNAc) ile küçük bir aminoasit grubundan oluşmuştur (Madigan ve ark., 2003). Şeker derivatları birbirine β -1,4-glikozidik bağlarla bağlıdır. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı bu peptidoglikan tabakasının çok sayıda katmanları şeklindedir (25 katmana kadar olabilir). Lizozim, GlcNAc ve MNAc arasındaki β -1,4-glikozidik bağları hidrolize ederek gram pozitif bakteriler

üzerine antibakteriyel etki gösterir (Şekil 1.2). Gram negatif bakterilerde ise hücre duvarı yaklaşık olarak sadece %10 peptidoglikan içerir. Bu katmanın üstünde de lipopolisakkaritlerden oluşmuş bir dış katman vardır. Bu nedenle gram negatif bakteriler genel olarak lizozime dirençlidir (Schneider, 2011).



Şekil 1.1. Lizozimin yapısı (Belitz ve ark., 2001 ve Humeny ve ark., 2002)



Şekil 1.2. Lizozimin gram pozitif bakterilerin hücre duvarına litik etkisi (Schneider, 2011)

1.3.1. Lizozimin Yem Katkısı Olarak Kullanımı

Yumurta akının duyarlı bireylerde (özellikle çocuklarda) alerjik reaksiyonlara neden olduğu iyi bilinmektedir. Bu bağlamda, yumurta akının bir unsuru olan lizozim de allerjen olabilir. Ancak, çeşitli besinlerde bulunabilen albümin ve ovalbümin gibi diğer yumurta proteinleriyle kıyaslandığında lizozimin insan ve hayvanlarda neden olduğu alerjik reaksiyonlar daha az tehlikelidir. Lizozim birçok ülkede, ilaç sanayinde ve peynir, deniz ürünleri, meyveler, sebzeler, bira ile şarapta bozulmayı baskılama amacıyla koruyucu olarak kullanılmaktadır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından (FDA: Food and Drug Administration) genel olarak güvenli (GRAS: *Generally Recognised as Safe*) kabul edilmiştir (D'Amato ve ark., 2010). Yumurta akı lizozimi peynir üretimi aşamasında, peynirde geç şişme ve gözenek oluşumunu engelleme amacıyla güvenli bir şekilde kullanılmakta ve Avrupa Birliği'nin gıda katkıları yönergesinde koruyucu madde (E1105) olarak geçmektedir (Losso ve ark., 2000). Peynirde geç şişme ve gözenek oluşumu peynir olgunlaşması sırasında karşılaşılan önemli olumsuzluklardandır. *Clostridium tyrobutyricum* isimli bakteri bu duruma neden olur. İnek sütünün bu bakteriyle kontaminasyonu silajla besleme sırasında olur. Sütün pastörizasyonu sırasında bakteri sporları hayatta kalır ve yaklaşık 3 ay sonra peynirin olgunlaşma aşamasında *Clostridium*'lar hızla üreyerek laktatı bütirik asit, CO₂ ve H₂'ye fermente ederler. Bu durumda peynir oldukça kötü kokar ve çok fazla gözenek içerir (Busse ve Heilmeyer, 1986).

Günümüzde antibakteriyel özelliği nedeniyle yaygın olarak özellikle gıda sektöründe kullanımı, lizozimin hayvan besleme alanında antibiyotiklere alternatif güvenli bir ajan olabileceğini akla getirmektedir. Ancak, lizozimin yem katkı maddesi olarak kullanımı üzerine çok sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu araştırmaların neredeyse tamamı ise kanatlı ve domuz gibi sindirim fizyolojisi ruminantlardan tamamen farklı tek mideli hayvanlarda yürütülmüştür. Humphrey ve ark. (2002), lizozim ve laktoferrin kaynağı olarak broiler rasyonuna %10 lizozim ekspresse eden transjenik pirinç ve %5 laktoferrin ekspresse eden transjenik pirinç ilave ettiklerinde, konvansiyonel pirinç yiyen broilerlere kıyasla, antibiyotiklere alternatif olarak lizozim ve laktoferrin alan broilerlerde yemden yararlanma ile bağırsak villuslarının uzunluklarının arttığını rapor etmişlerdir. Zhang ve ark. (2006)

yaptıkları *in vitro* araştırmada lizozimin *Clostridium perfringens* üzerine baskılayıcı etkilerini incelemişler ve 200 µg/mL dozunda lizozimin *Clostridium perfringens*'in gelişimini tamamen baskılayamadığını, ancak broilerlerde nekrotik enteritis ile ilişkili α-toksinlerin üretimini engellediğini belirlemişlerdir. Liu ve ark. (2010) deneysel olarak enfekte ettikleri broilerlerde 40 mg/kg diyet dozunda lizozim uygulamasının *Clostridium perfringens*'in intestinal kolonizasyonunu baskıladığını, intestinal bariyer fonksiyonunu kuvvetlendirdiğini ve verim üzerine olumlu etkiler gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir. Oliver ve Wells (2013) ve Oliver ve ark. (2014) domuz yavruları üzerinde yaptıkları araştırmalarda diyetleriyle lizozim alan yavruların yemden yararlanma oranlarında yaklaşık %8 artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu oran ise yem katkısı antibiyotiklerle elde edilen artışlara benzer bir orandır.

Lizozim enziminin ruminantlarda yem katkı maddesi olarak kullanılabilirliğı üzerine sadece bir araştırmaya rastlanılmaktadır (15.02.2017 tarihli PubMed taraması). Biswas ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladıkları araştırmada konsantre yem ağırlıklı besleme rejiminde lizozimin ruminal fermentasyona etkileri ve metan gazı oluşumunu azaltmada etkili dozu *in vitro* koşullarda incelenmiştir. Araştırmacılar 8 000 Ünite lizozim dozunun 24 saatlik *in vitro* inkübasyonda (1 gram yem kuru maddesi ve 100 mL rumen sıvısında) rumen pH'sını yükselttiğini, asetik, propiyonik ve toplam uçucu yağ asitleri konsantrasyonlarını artırdığını, metan oluşumunu ise baskıladığını bildirmişleridir. Bütirik asit konsantrasyonu, toplam gaz üretimi, amonyak azotu (NH₃-N) konsantrasyonu, yem kuru maddesi ve organik maddesi sindirilebilirlikleri, asetatın propiyonata oranı ile genel bakteri, metanojenler ve protozoonların DNA kopya sayıları lizozim ilavelerinden etkilenmemiştir. Biswas ve arkadaşları (2016) elde ettikleri sonuçlara dayanarak lizozimin daha yüksek dozlarla ruminal etkilerinin araştırılmasını önermişlerdir. Bu bağlamda sunulan tez çalışmasında sıvı lizozimin 10 000 ve 50 000 U/L dozları değerlendirilmiştir.

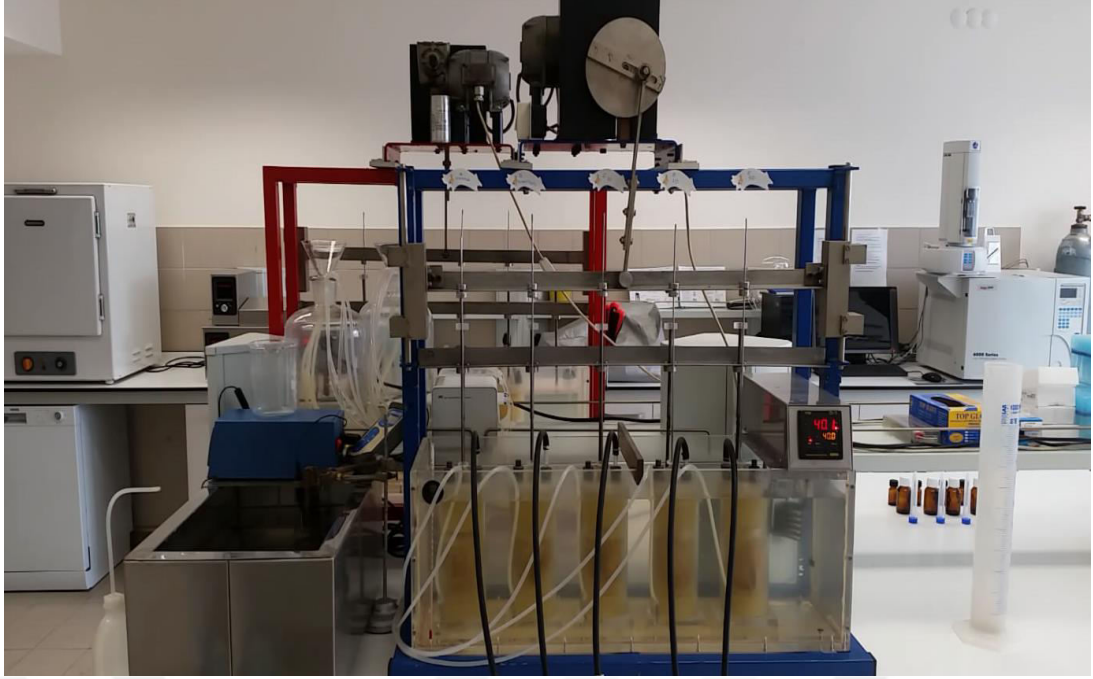
2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. İnkübasyon Tekniği

Tez çalışmasında yarı-sürekli ve kapalı bir inkübasyon yöntemi olan Rusitec (***R**Umen **S**Imulation **T**EChnique*) tekniği Czerkawski ve Breckenridge'in (1977) tarif ettiği şekilde uygulandı (Şekil 2.1 ve 2.2). Rusitec sisteminde gerçek hacimleri 750 mL olan 9 adet fermenter kullanıldı. Bu fermenterlerde inokulum olarak Ankara'nın Akyurt ilçesi belediye mezbahasında kesilmiş canlı ağırlıkları yaklaşık 450 kg olan iki adet sağlıklı erkek sığırdan elde edilen rumen içerikleri kullanıldı. Rumen içerikleri yaklaşık 30 dakika içerisinde termo-kaplarda Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki Rusitec laboratuvarına ulaştırıldı. Donör hayvanların kesim öncesi hangi rasyonla beslendikleri hakkında, ilgili çiftlikten bilgi alınarak aynı yemlerden *in vitro* inkübasyon için numuneler alındı. Çizelge 2.1'de *in vitro* inkübasyonda substrat olarak kullanılan deneme yeminin kimyasal bileşimi görülmektedir. İki hayvandan alınan taze rumen içerikleri Rusitec laboratuvarında üç katlı steril gazlı bezden süzülerek sıvı ve katı fazlara ayrıldı.



Şekil 2.1. Rusitec Sistem su banyosu ve fermenterleri (Çalışma Öncesi)



Şekil 2.2. Rusitec Sistem (Çalışma Sırasında)

Çizelge 2.1. Deneme yeminin kimyasal bileşimi

Besin Maddeleri	Konsantre yem (%)	Arpa Samanı (%)
DM	91,12	94,19
Kül	06,50	05,82
CF	05,56	40,45
CP	12,42	02,95
EE	02,75	02,00
OM	84,62	88,37
NFC	61,44	16,43
NDF	16,89	72,80
ADF	07,41	49,98
ME (kcal/kg)	2655	1501

DM: Kuru madde, CF: Ham lif, CP: Ham protein, EE: Eter ekstraktı, OM: Organik madde, NFC: Lifsiz karbonhidrat [% NFC = 100-(CP+NDF+EE+Kül)], NDF: Nötr-deterjan lifi, ADF: Asit-deterjan lifi, ME: Metabolik enerji.

Araştırmanın ilk günü taze katı rumen içeriğinin 80 gramı ve 2 g arpa samanı (0,5 cm uzunluğunda kesilmiş) ile 8 g ticari konsantre yemden oluşan deneme yemi karışımı, 150 µm porlara sahip iki adet naylon keseye konuldu. Katı rumen içeriği ve deneme yemini içeren iki kese Rusitec fermenterlerindeki delikli iç kaplara yerleştirildi. Katı rumen içeriği bulunan naylon kese yirmi dört saat sonra deneme

yemi içeren başka bir naylon kese ile değiştirildi. Rusitec fermenterlerinde her zaman iki yem kesesi bulundu ve bunlar 48 saatlik fermantasyona maruz bırakıldı. Yem keselerinin değişimi sırasında anaerobik koşulların sürekliliği için fermenter kapaklarının açık olduğu süreçte CO₂ gazı uygulandı. Keza yine *in vitro* inkübasyonun mümkün olduğunca *in vivo* ruminal şartlara benzemesi için Rusitec fermenterleri sürekli 39°C'lik sabit ısıda tutuldu ve çizelge 2. 2'de bileşimi verilen, pH'sı 7,40 ve ozmotik basıncı 293 mosmol/L olan tampon solüsyonla (suni tükürük) sıvı döngüsü (*liquid turnover*) sağlandı (Oeztuerk ve ark., 2005). Elektromotorlar yardımıyla fermenterlerin içindeki delikli iç kaplar dakikada altı kez piston hareketi yaparak rumen kasılmaları taklit edildi. Bu suretle sistem fermenterlerindeki katı ve sıvı fazlar arasında değişim sağlandı. Ruminal fermantasyon sırasında oluşan gazlar, fermenterlere bağlı nuçe erlenlerine entegre edilmiş gaz sızdırmaz özelliğe sahip gaz keselerinde biriktirildi. Rusitec fermenterlerinden çıkan rumen sıvıları ise kuru buza yerleştirilmiş nuçe erlenmayerlerde toplandı.

Çizelge 2.2. Tampon solüsyonun kimyasal bileşimi

Kimyasallar	g/L
NaCl	1,636
KCl	0,570
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,032
Mg Cl ₂ .6H ₂ O	0,128
NH ₄ Cl	0,267
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3,581
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1,380
NaHCO ₃	8,225

2.2. Deney Kurgusu

Lizozimin ruminal fermantasyonun temel parametrelerine etkilerini belirleyecek olan *in vitro* inkübasyon denemesi 12 gün sürdü. Deneme sürecinde Rusitec sistemde 9 fermenter eşzamanlı olarak çalıştırıldı. Bu sürenin ilk 6 günü rumen mikroorganizmalarının *in vitro* koşullara uyumu amacına hizmet etti

(adaptasyon fazı). Devam eden 6 günlük süre (7-12. günler) ise araştırmanın deneme fazını teşkil etti. Deneme fazında Rusitec sistemin 9 fermenteri üç gruba ayrıldı. İlk üç fermentere lizozim içermeyen 1 mL distile su her gün kese değişimi sırasında doğrudan verildi. İkinci üç fermentere 10 000, son üç fermentere ise 50 000 U/L dozunda lizozim (LYSO-GUARD®) her gün kese değişimi sırasında verildi. Lizozim enzimi sıvı formda Mayasan Gıda Sanayi Ticaret Anonim Şirketi'nden (İstanbul) temin edildi. Sıvı lizozimin mililitresinde yaklaşık 9 000 000 FIP Ünite lizozim vardı ve bundan mililitresinde 10 000 ve 50 000 U olan solüsyonlar distile su ile seyreltilerek hazırlandı.

2.3. Numune Toplanması ve Analizler

2.3.1. pH Ölçümü

In vitro araştırmanın deneme fazında her gün yem keselerinin değişimi sırasında fermenterlerdeki rumen sıvılarının pH değerleri bir pH elektrotu (WD-35801-00, Oakton) ve bağlı olduğu pH metre (Ion 6, Acorn series, Oakton) yardımıyla doğrudan ölçüldü.

2.3.2. Uçucu Yağ Asitleri Üretiminin Belirlenmesi

Uçucu yağ asitleri (asetik, propiyonik ve bütirik asitler) analizi için alınan rumen sıvıları yine 4°C'de buzdolabında çözdürüldükten sonra 4°C'de soğutmalı santrifüjde (Hettich Micro 200R) 15 dakika 15 000 rpm'de santrifüj edildi. Bir mL süpernatant 0,2 mL % 25'lik metafosforik asitle karıştırıldı ve buzdolabında 30 dk bekletildi. Numuneler tekrar 4°C'de soğutmalı santrifüjde 15 dakika 15 000 rpm'de santrifüj edildikten sonra gazkromatografi viallerine konuldu ve ACME-6100 gazkromatografi sisteminde HP-Innovax kılcal kolonu (30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm film kalınlığı) kullanılarak analiz edildi. Helyum gazı 1,8 mL/dk akış hızında taşıyıcı gaz olarak görev yaptı. Enjektör ve dedektör ısıları sırasıyla 250 ve 300 °C'ye ayarlandı. Alev izonizasyon dedektörünün (FID) split oranı 1:40 ve fırın programı 120 °C'de 1 dk, dakikada 10 °C artarak 265 °C'e ulaşma ve bu sıcaklıkta 2 dk kalma şeklindeydi. Enjekte edilen numune 1 µL miktarındaydı. UYA'ların günlük

üretim miktarları ise konsantrasyon değerlerinin Rusitec erlenmayerlerde biriken günlük rumen sıvısı miktarları ile çarpılarak elde edildi.

2.3.3. NH₃-N Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Rumen sıvılarının toplandığı ve kuru buz içinde bulunan nüçe erlenlerinden NH₃-N ve uçucu yağ asitlerinin konsantrasyonlarını belirlemek için rumen sıvısı numuneleri alındı. Bu numuneler vakit kaybetmeden -20°C'ye konularak analize kadar muhafaza edildi. NH₃-N analizi için alınan numuneler 4°C'de buzdolabında bir gece bekletilip çözündürüldükten sonra indofenol mavisi yöntemi ile spektrofotometrik olarak NH₃-N konsantrasyonu belirlendi (Chaney ve Marbaeh, 1962). Bunun için 50 µL rumen sıvısının konulduğu tüplere 5 mL fenol ve Na-nitroprussit karışımı ile 5 mL sodyum hipoklorit ilave edildi. Numune yerine aynı miktarda distile suyun konulduğu tüp kör tüp ve 5 mmol/L NH₄Cl ilave edilen tüp ise standart tüp olarak kabul edildi. Tüm tüpler parafilm ile kapatılıp 60°C'lik çalkalamalı su banyosunda (Memmert WNB14) 10 dk bekletildi. Numunelerdeki NH₃-N konsantrasyonu spektrofotometre (UV-1601, Shimadzu) kullanılarak 546 nm'de belirlendi. Bu yöntemde sodyum nitroprussit varlığında amonyak ve fenol sodyum hipoklorit ile okside edilmekte ve mavi renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Oluşan mavi rengin yoğunluğu ise numunedeki NH₃-N konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

2.3.4. Metan Gazı Üretiminin Belirlenmesi

Rusitec sistemde fermentasyon faaliyetleri sonucu günlük üretilen metan gazı miktarı aşağıdaki gibi Wolin (1960) ve Abdl-Rahman'ın (2010) önerdiği şekilde uçucu yağ asitleri üretimi üzerinden stoikiyometrik olarak hesaplanmıştır.

$$\text{CO}_2 \text{ üretim miktarı} = A/2 + P/4 + 1,5B$$

$$\text{CH}_4 \text{ üretim miktarı} = (A+2B) - \text{CO}_2$$

A: Asetat üretimi (mmol/gün)

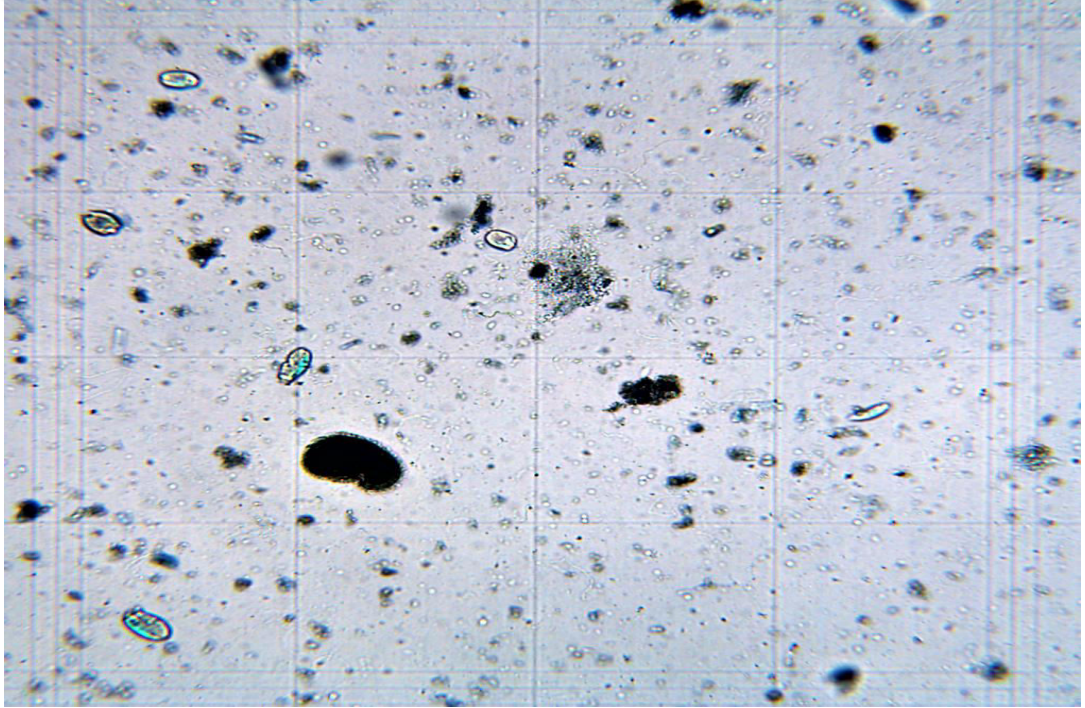
P: Propiyonat üretimi (mmol/gün)

B: Bütirat üretimi (mmol/gün)

2.3.5. Toplam Protozoon Sayısının Belirlenmesi

Protozoon sayısı için fermenterlerden alınan bir mL rumen sıvısı bir mL protozoa sayım solüsyonuyla karıştırıldı. Protozoon sayım solüsyonu, 0,6 g metil yeşili, 8 g NaCl, 100 mL %37'lik formaldehitin 1 litrelik balon jodede distile suyla karıştırılmasıyla hazırlandı (Harmayer, 1965). Işık mikroskobu (Leica CME) ve Fuchs-Rosenthal lamı (derinlik: 0,2 mm, küçük kare alanı: 0,0625 mm²) kullanılarak rumen sıvısındaki toplam protozoon sayımı gerçekleştirildi.

$$\text{Bir mL'deki protozoon sayısı} = \frac{\text{Bulunan hücre sayısı} \times \text{Sulandırma oranı} \times 80}{256} \times 1000$$



Şekil 2.3. Protozoon sayım solüsyonu ile boyanmış ve seyreltilmiş rumen protozoonlarının ışık mikroskopunda görünümü

2.3.6. Kuru Madde Sindirilebilirliğinin Belirlenmesi

Yem kuru maddesi sindirilebilirlik oranı yem maddelerinin fermantasyon öncesi ve sonrası içerdikleri kuru madde miktarları belirlenerek hesaplandı. Bunun için fermantasyona maruz bırakılmamış yem numunelerinin nemi 65°C'lik etüvde 48 saat bekletilerek uzaklaştırıldı ve içerdikleri kuru madde miktarları bulundu. Rusitec

sisteminde 48 saat fermentasyona bırakılan yem numunelerinin kuru madde miktarları yine aynı şekilde 65°C'lik etüvde 48 saat bekletildikten sonra hassas terazide (Radwag AS 220/C/2) tartılarak bulundu. İnkübasyon öncesi sistem fermenterlerine naylon keseler içine konulan yem kuru maddesi miktarları ve 48 saat fermentasyon sonrasında kalan kuru madde miktarları arasındaki fark kuru madde sindirilebilirlik oranı olarak kabul edildi (Orskov ve ark., 1980 ve Öztürk, 2003).

$$\text{Kuru madde sindirilebilirliği (\%)} = \frac{(\text{Ö} - \text{S})}{\text{S}} \times 100$$

Ö: Fermentasyon öncesi kuru madde miktarı

S: 48 saatlik ruminal fermentasyon sonrası kuru madde miktarı

2.4. İstatistiksel Analizler

Araştırmadan elde edilen bulguların istatistiksel analizi SigmaStat 3.1 (Jandel Scientific, Erkrath, Almanya) istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Grup ortalamaları arasındaki farkın önemliliği tekrarlı ölçümlerde iki yönlü varyans analizi ile test edildi. Sabit faktörler lizozim uygulaması ve deneme günüydü (zaman), bu iki faktör arasındaki karşılıklı etkileşim istatistik analiz kapsamında incelendi. Varyans analizi sonucunda gruplar arasında fark tespit edildiğinde, farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulandı. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi.

3. BULGULAR

Lizozim enziminin 10 000 ve 50 000 U/L dozlarının Rusitec sistemde ruminal fermentasyonun temel parametreleri üzerine etkileri çizelge 3.1’da toplu olarak verilmiştir.

Çizelge 3.1. Lizozimin ruminal mikrobiyal fermentasyon üzerine *in vitro* etkileri

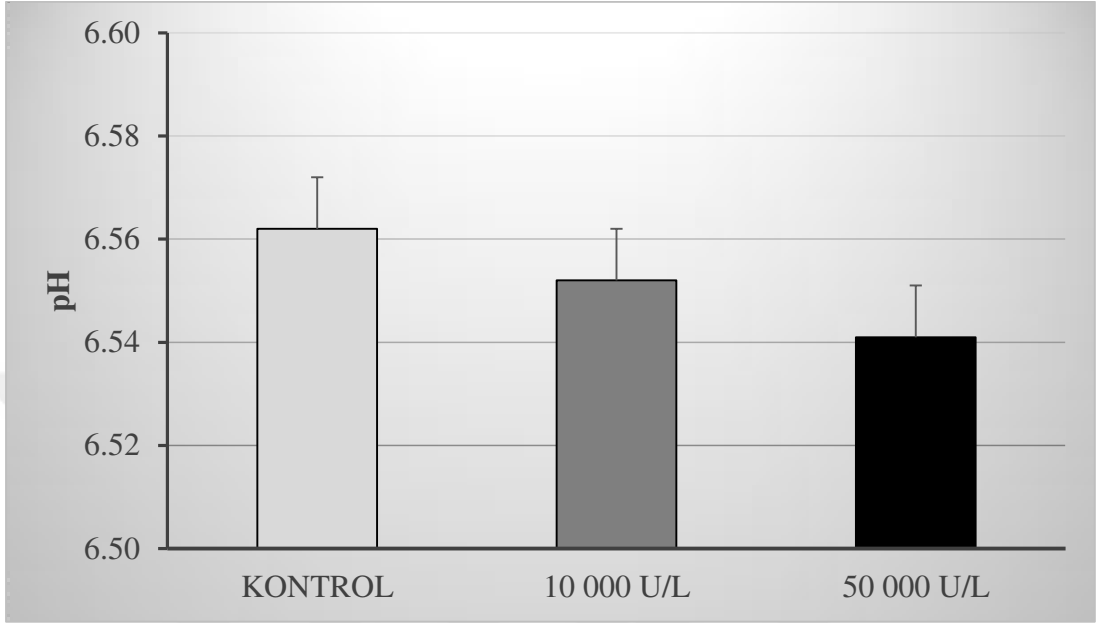
Parametreler	Kontrol	10 000 U/L	50 000 U/L	SEM	Lizozim x Zaman
pH	6,56	6,55	6,54	0,01	n.s.
Toplam-UYA (mmol/gün)	32,88	32,91	34,01	1,14	n.s.
Asetik asit	17,30	17,24	17,63	0,55	n.s.
Propiyonik asit	9,34	9,37	9,76	0,54	n.s.
Bütirik asit	6,25	6,30	6,62	0,37	n.s.
CH ₄ (mmol/gün)	9,44	9,43	9,69	0,38	n.s.
NH ₃ -N (mmol/L)	9,52 ^a	9,66 ^a	10,17 ^b	0,24	n.s.
Protozoon (x10 ³ /mL)	18,99	18,13	17,12	4,63	n.s.
KMS (%)	70,50 ^{ab}	68,98 ^a	72,16 ^b	0,57	n.s.

^{a, b}: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel farkı ($p < 0,05$) göstermektedir. SEM: ortalamanın standart hatası. n.s: istatistiksel anlamlı değildir.

3.1. Lizozimin Ruminal pH Üzerine Etkisi

Lizozim uygulamasının ruminal pH üzerine etkisi grafik 3.1’da görülmektedir. Lizozim ilavesinin yapılmadığı kontrol fermenterleri ile kıyaslandığında 10 000 ve 50 000 U/L dozlarında lizozim ilaveleri ruminal pH üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadı ($p > 0,05$). Rumen sıvısı ortalama pH değeri hiçbir ilavenin yapılmadığı kontrol fermenterlerinde

yaklaşık 6,56 iken, 10 000 ve 50 000 U/L lizozim ilaveleri yapılan fermenterlerde sırasıyla 6,55 ve 6,54 olarak ölçüldü. Altı günlük deneme fazı boyunca lizozim uygulaması ve zaman arasında karşılıklı bir etkileşim belirlenmedi ($p > 0,05$).



Grafik 3.1. Lizozimin ruminal pH üzerine etkisi

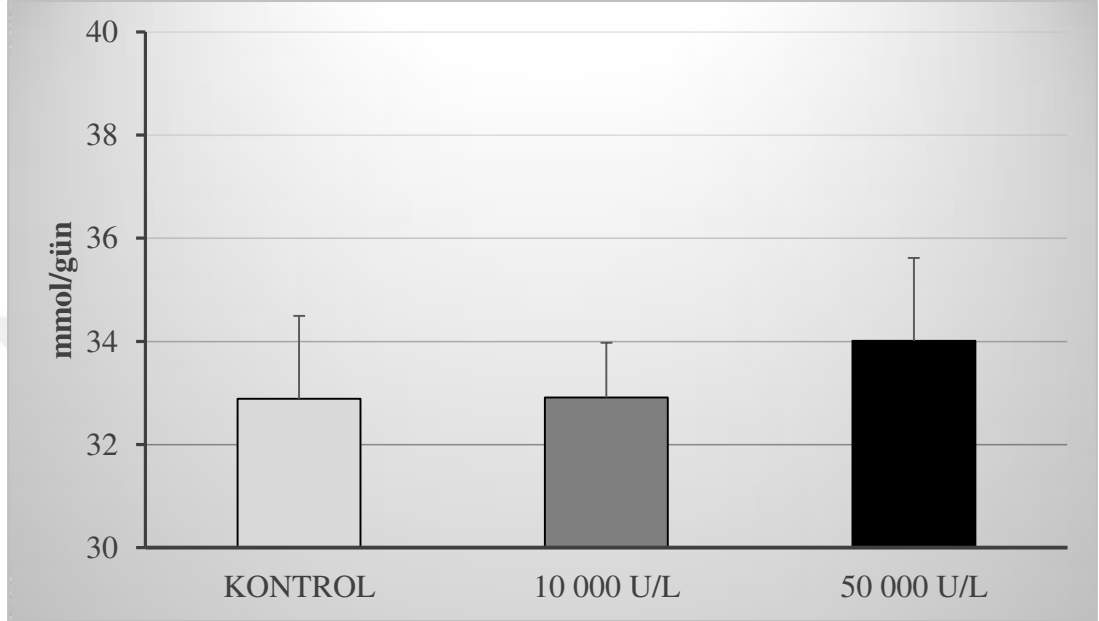
3.2. Lizozimin Toplam UYA Üretimine Etkisi

Günlük üretilen toplam UYA, Rusitec sistemin kontrol fermenterlerinde ortalama 32,88 mmol'iken, düşük ve yüksek doz lizozim ilave edilen fermenterlerde 32,91 mmol ve 34,01 mmol düzeylerindedi. Kontrol fermenterlerine kıyasla, yüksek doz (50 000 U) lizozim ilavesi UYA üretiminde yaklaşık %3,42 kadar artışa neden olsa da bu düzey istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). UYA üretimi bakımından lizozim uygulaması ve deneme günleri arasında da interaksyon belirlenmedi ($p>0,05$). Grafik 3.2'de lizozimin toplam UYA üretimi üzerine etkisi görülmektedir.

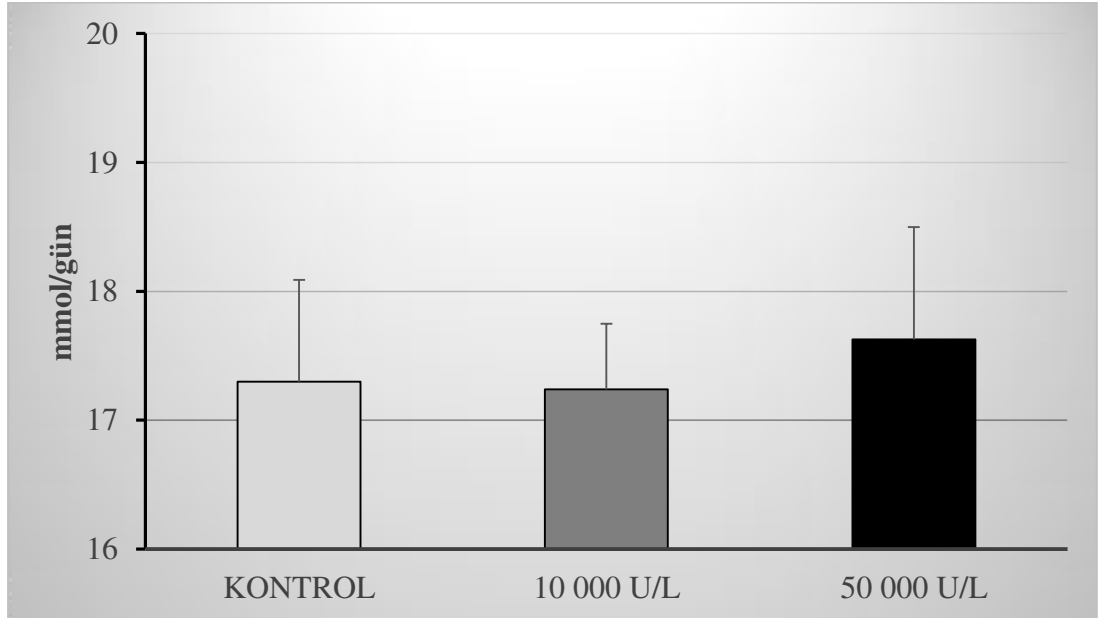
3.3. Lizozimin Asetik Asit Üretimine Etkisi

Rusitec fermenterlerinde ne düşük ne de yüksek doz lizozim uygulamaları asetik asidin günlük üretim miktarlarını istatistiksel olarak etkiledi ($p>0,05$). Kontrol fermenterlerinde asetik asit üretimi ortalama 17,30 mmol/gün, 10 000 U/L lizozim

ilavesi yapılan fermenterlerde ortalama 17,24 mmol/gün ve 50 000 U/L lizozim ilavesi yapılan fermenterlerde ise 17,63 mmol/gün olarak belirlendi. Lizozim uygulaması ve zaman arasında karşılıklı etkileşim saptanmadı ($p>0,05$). Grafik 3.3'de lizozimin asetik asit üretimi üzerine etkisi görülmektedir.



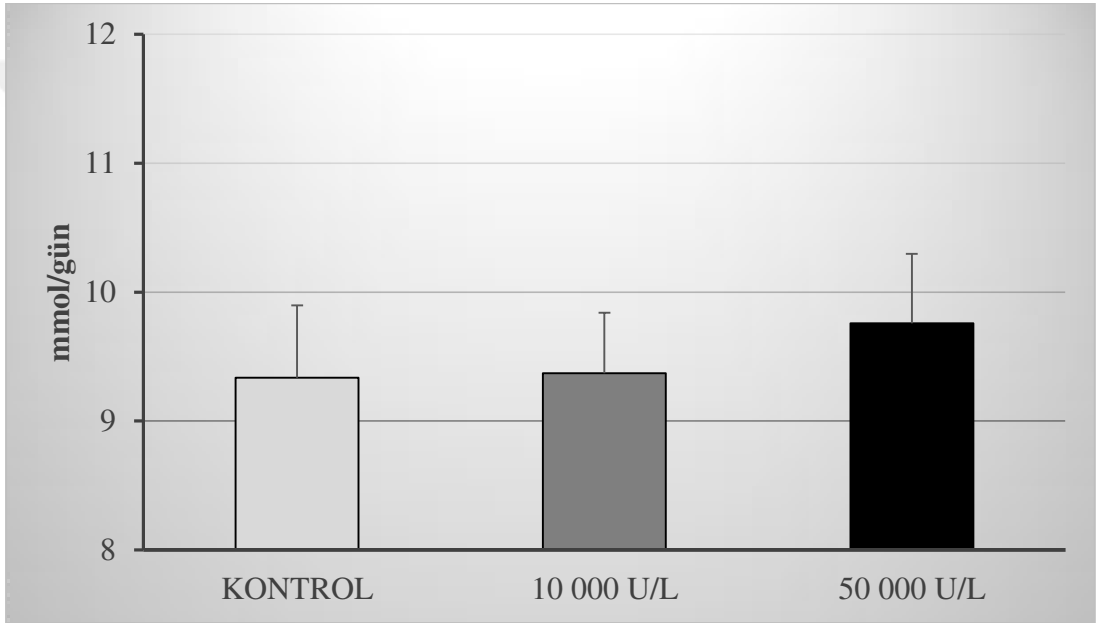
Grafik 3.2. Lizozimin toplam UYA üretimi üzerine etkisi



Grafik 3.3. Lizozimin asetik asit üretimi üzerine etkisi

3.4. Lizozimin Propiyonik Asit Üretimine Etkisi

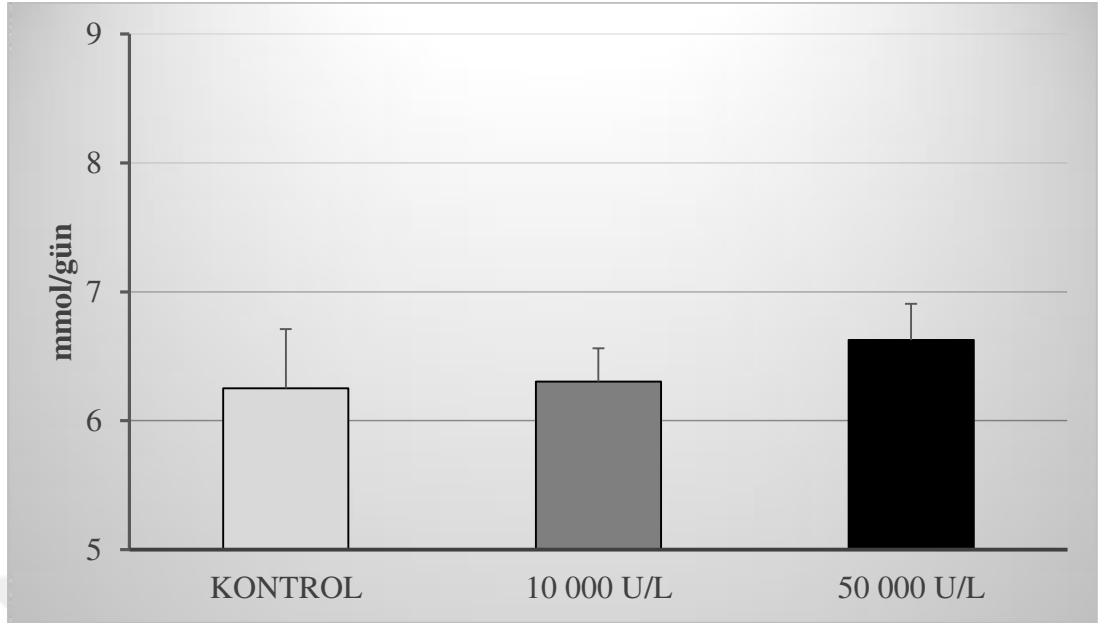
Kontrol fermenterlerinde günlük üretilen propiyonik asit miktarı ortalama 9,34 mmol, 10 000 ve 50 000 U/L dozlarında lizozim ilave edilen fermenterlerde ise sırasıyla 9,37 mmol ve 9,76 mmol düzeyindeydi. Elli bin ünite lizozim ilavesi kontrole kıyasla propiyonik asit üretiminde yaklaşık %4,50 kadar bir artışa neden oldu. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Propiyonik asit üretimi açısından lizozim uygulaması ve zaman arasında herhangi bir karşılıklı etkileşim belirlenmedi ($p>0,05$).



Grafik 3.4. Lizozimin propiyonik asit üretimi üzerine etkisi

3.5. Lizozimin Bütirik Asit Üretimine Etkisi

Lizozim ilavesinin yapılmadığı kontrol fermenterlerinde günlük üretilen bütirik asit miktarı ortalama 6,25 mmol'iken, 10 000 ve 50 000 U/L lizozim ilave edilen fermenterlerde ortalama 6,30 mmol ve 6,63 mmol olarak ölçüldü. Yüksek doz lizozim uygulaması kontrol fermenterlerine kıyasla yaklaşık %6 daha fazla bütirik asit üretimine yol açtı. Ancak bu artış da istatistiksel bir fark oluşturmaya yetmedi ($p>0,05$). Lizozim uygulaması ve deneme günleri arasında istatistiksel bir interaksiyon belirlenmedi ($p>0,05$). Grafik 3.5'de lizozimin bütirik asit üretimi üzerine etkisi görülmektedir.



Grafik 3.5. Lizozimin bütirik asit üretimi üzerine etkisi

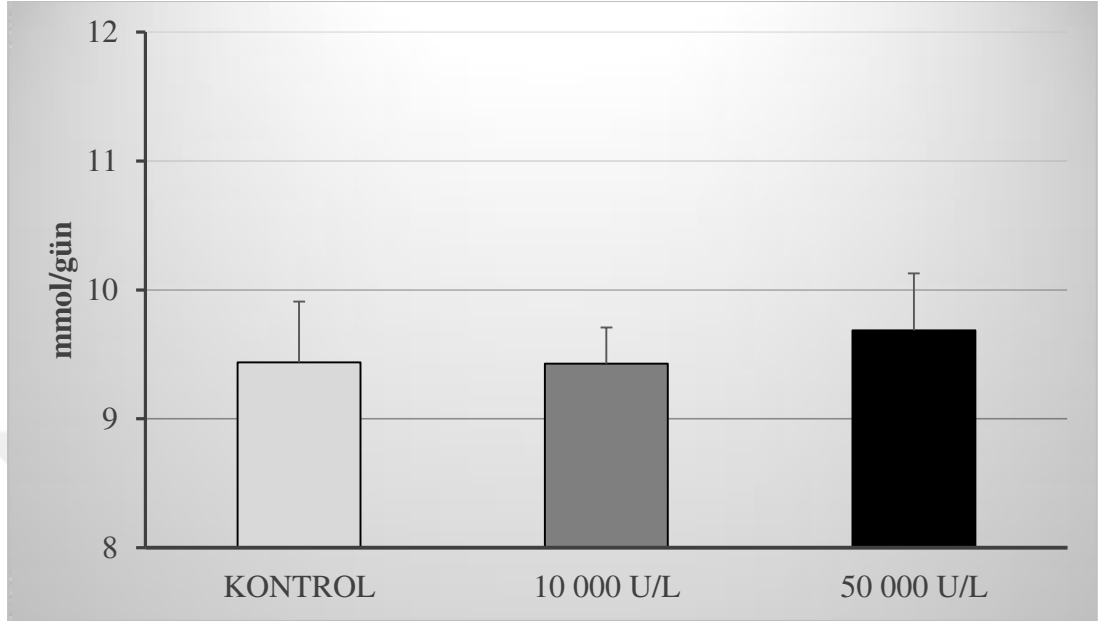
3.6. Lizozimin Metan Gazı Üretimine Etkisi

Rusitec sistemin kontrol fermenterlerinde günde ortalama 9,44 mmol metan gazı üretildi. Bu üretim 10 000 U ve 50 000 U lizozim ilave edilen fermenterlerde sırasıyla 9,43 ve 9,69 mmol olarak hesap edildi. Yüksek dozda lizozim verilen fermenterlerde, kontrol fermenterlerine kıyasla ruminal fermantasyon sürecinde yaklaşık %2,63 kadar daha fazla metan gazı üretildi. Ancak bu değer istatistik fark yaratacak düzeyde değildi ($p>0,05$). Lizozim ve zaman arasında istatistiksel bir etkileşim belirlenemedi ($p>0,05$). Grafik 3.6'da lizozimin metan gazı üretimi üzerine etkisi verilmiştir.

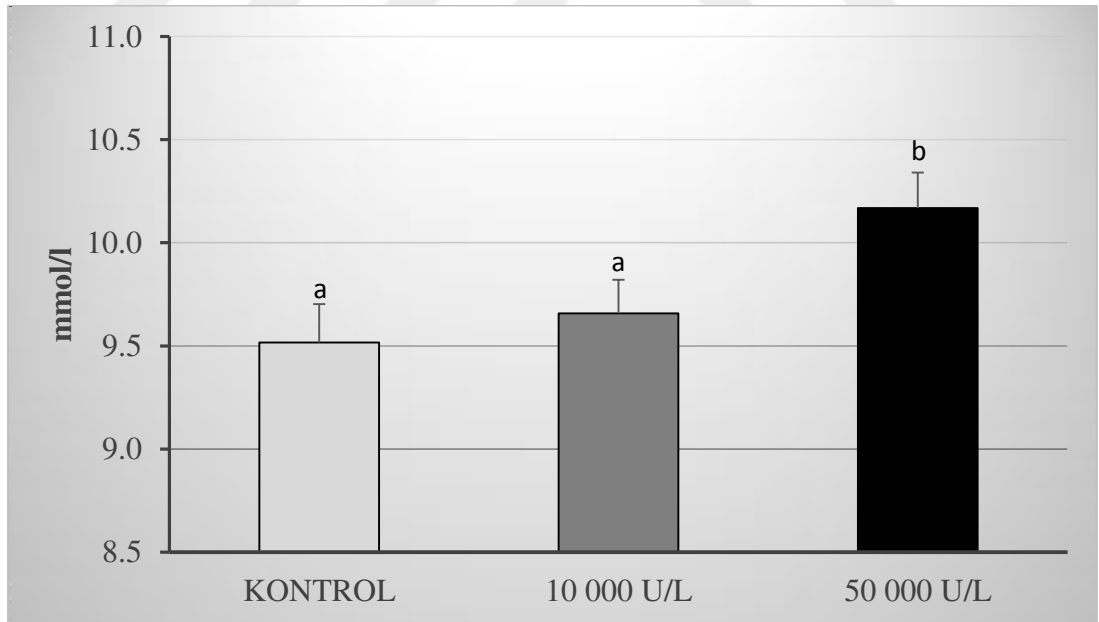
3.7. Lizozimin Ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ Konsantrasyonu Üzerine Etkisi

Rusitec fermenterlerindeki rumen sıvısı $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonu lizozim ilave edilmeyen kontrol fermenterlerinde 9,52 mmol/L'iken, 10 000 ve 50 000 U/L lizozim ilave edilen fermenterlerde 9,66 ve 10,17 mmol/L olarak ölçüldü. Yüksek doz, kontrol ve düşük doz lizozim verilen gruplarla karşılaştırıldığında, yüksek doz lizozim uygulaması ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunu istatistiksel olarak yükseltti ($p<0,05$). Kontrol grubuna kıyasla, yüksek doz lizozim uygulanan grupta $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonu yaklaşık % 6,86 kadar daha yüksekti. Lizozim uygulaması ve zaman

arasında ise istatistiksel bir etkileşim yoktu ($p>0,05$). Grafik 3.7'de lizozimin ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonu üzerine etkisi verilmiştir.



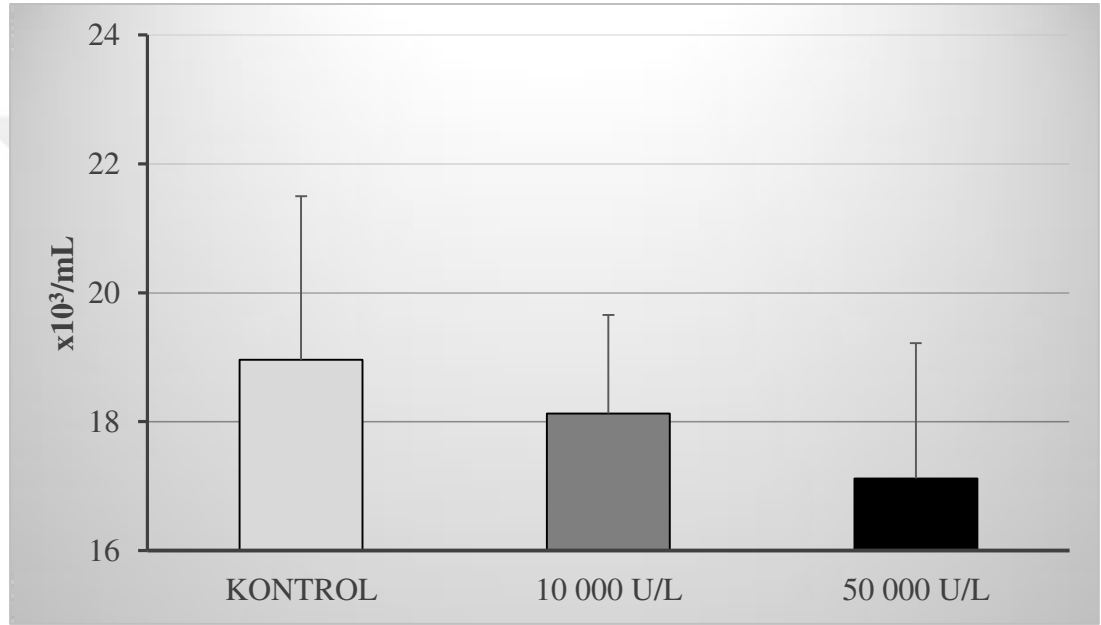
Grafik 3.6. Lizozimin metan gazı üretimi üzerine etkisi



Grafik 3.7. Lizozimin ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonu üzerine etkisi

3.8. Lizozimin Protozoon Sayısı Üzerine Etkisi

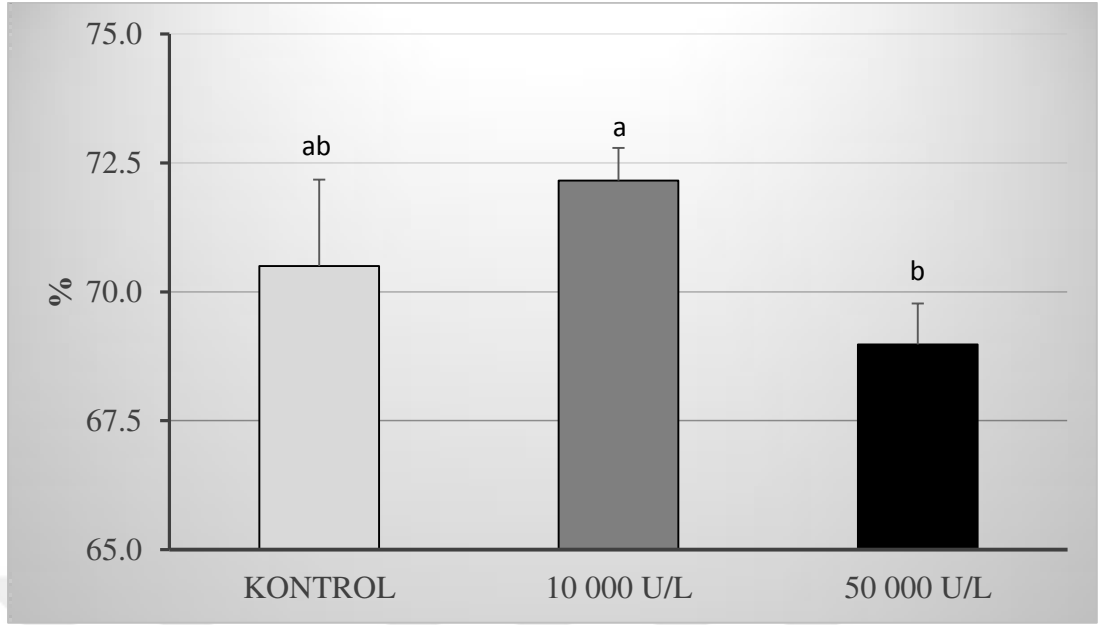
Kontrol fermenterleri ile karşılaştırıldığında lizozim enzimi ilavesi rumen protozoonlarının sayısında istatistiksel bir farklılık oluşturmadi ($p>0,05$). Kontrol grubunda bir mililitre rumen sıvısındaki toplam protozoon sayısı ortalama 18 958 iken, düşük ve yüksek doz lizozim enzimi ilave edilen gruplarda sırasıyla 18 125 ve 17 118 olarak belirlendi. Altı gün boyunca iki farklı dozda lizozim uygulaması zamansal olarak etkileşime neden olmadı ($p>0,05$).



Grafik 3.8. Lizozimin protozoon sayısı üzerine etkisi

3.9. Lizozimin Yem Kuru Maddesi Sindirilebilirliği Üzerine Etkisi

Rusitec sistem fermenterlerinde 48 saat boyunca fermantasyona maruz bırakılan yem maddelerinin sindirilebilirlik oranı kontrol grubu ile lizozimin farklı dozları arasında istatistiksel olarak farklı değilken, düşük ve yüksek doz lizozim grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttu. Kontrol grubunda yem kuru maddeleri yaklaşık %70 sindirilmişken, düşük doz lizozim grubunda yaklaşık %72, yüksek doz grubunda ise yaklaşık %69 oranında sindirildi (Grafik 3.9). Lizozim uygulaması ve zaman arasında istatistiksel bir etkileşim belirlenmedi ($p>0,05$).



Grafik 3.9. Lizozimin kuru madde sindirilebilirliği üzerine etkisi

4. TARTIŞMA

Bu yüksek lisans tezinin amacı lizozimin ruminal mikrobiyal fermantasyon üzerine etkilerini konsantre yem ağırlıklı besleme koşullarında (%80 konsantre yem, %20 kaba yem) uzun süreli bir inkübasyon modeli olan Rumen Simülasyon Tekniği (***RU*men *SI*mulation *TE*chnique**, RUSITEC) yardımıyla belirlemek ve bu suretle lizozim enziminin ruminant verimliliği üzerine olası etkilerini ortaya koymaktır.

Rusitec sistem, kapalı, yarı-sürekli ve uzun süreli bir rumen simülasyon modelidir. Bu simülasyon modeli 1977 yılında Czerkawski ve Breckenridge tarafından geliştirilmesinden buyana dünya çapında yaygın bir kullanım alanı bulmuş ve rumen mikrobiyal fermantasyonu üzerine yapılan *in vitro* araştırmalarda bilim çevrelerince geçerliliği kabul görmüştür. *In vivo* araştırmalarda elde edilen bulgular homojen olmayan rumen içeriği ve işkembedeki yoğun sekresyon-absorpsiyon olaylarından etkilenmekte, Rusitec sistemde ise rumen metabolizmasının parametreleri tam olarak belirlenebilmektedir. Etkiler rumen metabolizması üzerine genellikle yavaş ve gecikmiş tarzda ortaya çıktığından, bunları *in vivo* denemelerde uzun zamana ihtiyaç duyulması ve hayvanlar arasındaki bireysel farklılıklar nedeniyle görmek ve yorumlamak zor olmaktadır (Lindig, 2014).

Rusitec tekniğinin kontrol edilebilir olma özelliği sayesinde denemelerin karşılaştırılması ve doğrulanması mümkün olabilmektedir. Bu da bu simülasyon modelinin en önemli avantajını oluşturmaktadır. Rusitec sistemde birkaç haftaya kadar *in vitro* rumen denemeleri yapılabilmekte ve *in vivo* hayvan denemelerinde elde edilen bulgulara %99 oranında benzeyen güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir (Cheng ve Mcallister, 1997; Czerkawski, 1976; Czerkawski ve Breckenridge, 1977). Bu durumu sağlayabilmek için Rusitec sistemde mümkün olduğunca özdeş koşulların yaratılması gerekmektedir (Becker, 1994; Czerkawski, 1984 ve Elias, 1999). Czerkawski (1984 ve 1986), rumende dört kompartımanın mevcudiyetinden bahsetmiştir. Bunlar:

1. Kompartıman: Rumen sıvısındaki mikroorganizmalar
2. Kompartıman: Rumendeki katı içeriğe fakültatif olarak tutunmuş bakteriler (bu bakteriler katı içeriğe gevşek bir şekilde tutunmuştur ve kolaylıkla yerlerinden ayrılabilirler, 1. ve 3. kompartımanlar arasında yer değiştirirler)
3. Kompartıman: Katı rumen içeriğine sıkıca tutunmuş bakteriler
4. Kompartıman: Rumen duvarına tutunmuş bakteriler

Bu dört kompartımandaki mikroorganizmaların sayı ve çeşitliliği farklılık arz eder. Rumen kontraksiyonları ve geniş getirme (ruminasyon) işlemleri sayesinde rumendeki katı ve sıvı fazlar ve içerdikleri mikroorganizmalar 2. kompartıman üzerinden karışıma uğrar. Tezimizde, kese değişimi sırasında 39 °C'lik tampon solüsyon ile yem keselerinin iki kez 2 dk boyunca preslenmesi ikinci kompartımandaki mikroorganizmaların kaybını engellemiş ve fermenterlere yeni konan naylon keselerdeki substrata bu mikroorganizmaların tekrar yerleşmesi sağlanmıştır.

Rumendeki dört kompartıman Rusitec sistemde büyük ölçüde simüle edilmiştir. Rusitec sisteme yerleştirilen rumen sıvı (1. kompartıman) ve katı içeriği (2. ve 3. kompartıman) bu kompartımanlara karşılık gelmektedir. Ancak rumendeki 4. kompartıman olan rumen duvarı ve buraya tutunmuş bakteriler Rusitec sistemde bulunmamaktadır. Bununla birlikte Rusitec sistemdeki rumen mikroorganizmaları ve rumen sıvısı bileşimi %99 *in vivo* koşullarla benzerlik göstermektedir (Czerkawski, 1976; Cheng ve McAllister, 1997).

Rumen mikroorganizmaları Rusitec fermenterleri gibi *in vitro* ortama adapte olmak zorundadır. İçeriği ve miktarı aynı olan substrat tedariki (donör hayvanın tükettiği) ve stabil tampon solüsyon akımı sağlandığı taktirde Rusitec sistem fermenterlerinde 4-6 günde mikrobiyal fermentasyonda adaptasyon (*steady state*) sağlanmakta ve birkaç haftaya kadar süren rumen denemeleri yapılabilir (Czerkawski ve Breckenridge, 1977 ve Czerkawski, 1984). Bu yüksek lisans tezinde yukarıda belirtilen koşullar göz önünde bulundurularak rumen mikroorganizmalarının *in vitro* şartlara uyumu için 6 günlük bir adaptasyon süresi tanınmıştır. Lizozim enziminin etkilerinin incelendiği deneme fazında kontrol

fermenterlerinde ölçümleri yapılan parametrelerde (pH, NH₃-N gibi) gözlenen stabilite deneme fazında *steady state* koşulların sağlandığına işaret etmektedir.

Rumen denemelerinde kullanılan naylon keselerin por büyüklüğü yem maddelerinin sindirim derecesini, rumen mikroorganizma popülasyonunu, dolayısıyla mikrobiyal fermantasyon ve son ürünleri etkilemektedir (Carro ve ark., 1995; Lindberg ve Knutsson, 1981; Meyer ve Mackie, 1986 ve Weakley ve ark., 1983). Rusitec sistemde kullanılan naylon keseler bir taraftan *in vivo* koşullara benzer fermantasyonun şekillenmesine imkân tanımalı, diğer taraftan mikrobiyal yıkıma uğramamış yem maddelerinin keseden çıkışını engellemelidir (Öztürk, 2003). Bu yüksek lisans tezinde bu amaca yönelik olarak 150 µm gözenek büyüklüğüne sahip naylon keseler kullanılmıştır.

Mikrobiyel orijinli yem enzimleri tek mideli hayvanlarda yem sindirilebilirliğini yükseltmek için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Özellikle kanatlı ve domuz yetiştiriciliğinde nişasta olmayan polisakkaritleri hidrolize eden enzimler, bu karbonhidratların laktatif ve besin maddelerinin yetersiz Emilimi gibi antinutrisyonel etkilerini bertaraf etmek, aynı zamanda değerlendirilemeyen veya yetersiz derecede değerlendirilebilen yem maddelerinin değerlendirilebilirliğini yükseltmek için dünyanın farklı yerlerinde kullanılmaktadır (Annison, 1992; Bakker ve ark., 1998; Barrera ve ark., 2004; Böhme, 1996 ve Chesson, 1993). Enzimlerin yem katkı maddesi olarak ruminant beslemesinde kullanımı ilk bakışta çok fazla ümit verici olarak görülmemektedir. Çünkü rumende inanılmaz bir mikrobiyal hidrolitik aktivite mevcuttur ve rumene ulaşan eksojen enzimler hızla yıkımlanarak inaktive edilmektedir (Chesson, 1993). Ruminant beslemede enzim kullanım fikri yeni değildir. Enzimlerin ruminantlarda ilk kullanımı 1960'larda başlamıştır (Burroughs ve ark., 1960; Clark ve ark., 1961; Perry ve ark., 1966; Rovics ve Ely, 1962; Rust ve ark., 1965 ve Van Walleggem ve ark., 1964). Araştırmacılar başlangıçta pozitif etkiler belirlemişler, ancak birkaç saat sonra etki ortadan kaybolmuş, hatta negatif etkiler ortaya çıkmıştır (Burroughs ve ark., 1960; Perry ve ark., 1966 ve Theurer ve ark., 1963). Hem bu sonuçlar hem de ruminant beslemede enzim kullanımının neden olduğu yüksek maliyetler ruminat yetiştiriciliğinde enzim kullanımının sektöre uğramasına yol açmıştır. Son yıllardaki teknolojik ilerlemeler

ve biyoteknolojik yöntemlerle enzimlerin çok daha ucuza mal edilebilmesi, ruminant beslemede enzim kullanımına tekrar vesile olmuştur (Clarkson ve ark., 2001).

Ruminant beslemesinde kullanılan enzimler mikrobiyal fermantasyon ürünleridir. Bununla birlikte, yem katkı maddesi olarak hayvansal üretimde kullanılan ticari enzimler normalde bu amaç için özel olarak üretilmemişlerdir. Bunlar genelde gıda, kağıt, tekstil, enerji ve kimya endüstrisi gibi alanlarda kullanılan enzimlerdir (Bhat ve Hazlewood, 2001). Ancak katkı maddesi olarak silaj yapımında kullanılan özel üretim enzimler de bulunmaktadır (Feng ve ark., 1996). Ruminant beslemede en çok fibrolitik enzimler (selülaz, hemiselülaz ve ksilanaz) kullanılmaktadır. Bunu amilazlar ve peptitazlar izlemektedir. Eksojen enzimler, yemdeki hücre duvarı unsurlarını ve sindirimi güç maddeleri parçalamak için ya besleme öncesi yeme ilave edilerek ya da yemle verilerek ruminal ve post-ruminal sindirimi teşvik etmek amacıyla kullanılmaktadır (Eisenreich, 2008).

Bugün için ruminant beslemede kullanılan enzimlerin yemdeki besin maddelerinin sindirilebilirliğini artırmak için kullanıldığı görülmektedir. Sunulan yüksek lisans tezinde kullanılan lizozim enziminin ise etki mekanizması ve kullanım amacı diğer eksojen enzimlerden tamamen farklıdır. Lizozim, hayvansal üretimde kullanımı yasaklanmış iyonofor grubu antibiyotiklerde olduğu gibi antimikrobiyal özelliğe sahiptir. Bu nedenle antibiyotiklere alternatif olabildiğinin test edilmesi amaçlanmıştır.

Rusitec sistemde ruminal etkileri araştırılan lizozimin dozu Biswas ve ark.'ın (2016) yaptıkları araştırma temel alınarak ayarlanmıştır. Biswas ve arkadaşları, bu tez çalışmasında olduğu gibi konsantre yem ağırlıklı besleme rejiminde (%80 konsantre, %20 kaba yem) 24 saate kadar inkübasyonun gerçekleştirildiği *in vitro* rumen denemesinde 1 gram substrat için 2 000, 4 000 ve 8 000 Ünite sıvı lizozim dozlarının etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar inkübasyonu 100 mL rumen sıvısında gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri bulgular sonucunda da daha sonraki çalışmalar için daha yüksek dozlarda denemelerin yapılmasını önermişlerdir. Bu bilgiler ışığında, bizim yüksek lisans tezimizde kullanılan Rusitec fermenterlerdeki rumen sıvısı hacmi (750 mL) ve inkübe edilen deneme yemi (substrat) miktarı

(toplam 10 gram) göz önünde bulundurulduğunda Biswas ve ark.'ın denediği dozların 7,5 ila 10 katının kullanılmasının gerektiği anlaşılmaktadır. Bu bağlamda sunulan tez çalışmasında sıvı lizozimin 10 000 ve 50 000 U/L dozları değerlendirilmiştir.

Sunulan tez çalışmasında 10 000 ve 50 000 U/L dozlarında lizozim ilavesi rumen pH'sında istatistiksel bir değişiklik oluşturmadi. Ancak tüm deneme sürecinde ve tüm gruplarda Rusitec fermenterlerinde ölçülen pH değerleri sağlıklı rumen için bildirilen fizyolojik sınırlar (6,0-7,0) içerisindeydi. Konuyla alakalı tek çalışma olan Biswas ve ark.'ın (2016) yaptığı 24 saatlik basit *in vitro* inkübasyon denemesinde, 2 000, 4 000 ve 8 000 U/100 mL dozlarında (1 gram substrat için) sıvı lizozim uygulamalarının rumen fermantasyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırmacılar inkübasyonun 6. ve 12. saatlerinde pH'da herhangi bir farklılık gözlemlememişler, ancak 24. saatte 4 000 ve 8 000 U dozlarında rumen pH'sında yükselme kaydetmişlerdir. Bununla birlikte bu yüksek lisans tezinde kullanılan tampon solüsyonun (suni tükürük) oldukça güçlü tamponlayıcı etkisinin olmasının, ruminal fermantasyon sürecinde büyük miktarlarda asit son ürünlerin oluşmadığı da göz önünde bulundurulduğunda, rumen sıvısındaki küçük pH dalgalanmalarını maskeleyebileceği düşünülmelidir.

Bu tez çalışmasında test edilen iki farklı lizozim dozu da toplam UYA, asetik, propiyonik ve bütirik asit üretimlerinde istatistiksel bir değişime yol açmamıştır. Bununla birlikte yüksek doz grubunda (50 000 U/L) adı geçen tüm bu kısa zincirli yağ asitlerinin üretim miktarlarında sayısal bir artış göze çarpmaktadır. Biswas ve ark. (2016) 24 saatlik *in vitro* inkübasyon sonrasında toplam UYA konsantrasyonunun sadece 8 000 U dozunda, asetik asit konsantrasyonunun 4 000 ve 8 000 U dozlarında, propiyonik asidin ise 2 000, 4 000 ve 8 000 U dozlarında arttığını bilirmişlerdir. Bizim çalışmamızda olduğu gibi bütirik asit lizozim uygulamalarından istatistiksel olarak etkilenmemiştir. Uçucu yağ asitleri ruminantlar için büyük önem taşımaktadır. Çünkü ruminant günlük enerji ihtiyacının yaklaşık %75'ini bu asitler üzerinden karşılamaktadır (Faverdin, 1999). Bununla birlikte uçucu yağ asitleri profili bakımından besi ve süt sığırları beslemesindeki hedefler birbirinden farklıdır. Çünkü her iki tip yetiştiricilikte rumen mikrobiyal

fermantasyonun arzu edilen son ürünleri birbirinden farklıdır. Besi sığırı beslemesinde UYA'lar arasında özellikle propiyonatın rumende daha fazla üretilmesi, süt sığırı beslemesinde ise asetat ve bütiratın daha fazla üretilmesi arzu edilir (Duffield ve Bagg, 2000; Ipharraguerre ve Clark, 2003 ve McGuffey ve ark., 2001). Asetat ve bütiratın aleyhine rumende mikroorganizmalarca büyük miktarlarda propiyonat üretilirse süt yağı olumsuz etkilenir ve bu durumda sütçülük işletmelerinin karlılığı azalır (DiLorenzo, 2010).

Tez çalışmasında, günlük üretimleri gaz kromatografik yöntemle ölçülen UYA'lar üzerinden stekiometrik olarak metan gazı üretim miktarı hesaplanmıştır. Test edilen lizozim dozlarının hiç birisi ruminal CH₄ üretimini istatistiksel olarak etkilememiştir. Benzer şekilde Biswas ve ark. (2016) 2 000 ve 4 000 U lizozim uygulamalarının metan gazı üretimini 6, 12 ve 24 saatlik *in vitro* inkübasyon sonrasında istatistiksel olarak değiştirmedğini bildirmişlerdir. Ancak bu araştırmacılar 8 000 U dozunda lizozim uygulamasının 6. ve 12. saatlerde CH₄ konsantrasyonunu değiştirmedğini sadece 24. saatte düşürdüğünü rapor etmişlerdir.

Rusitec fermenterlerindeki rumen sıvısının mililitresindeki toplam protozoon sayısı ne 10 000 ne de 50 000 U/L dozundaki lizozim ilavelerinden etkilenmiştir. Biswas ve ark. da (2016) artan miktarlardaki lizozim uygulamalarından ne rumen bakterileri ve metanojenlerin ne de rumen protozoonlarının etkilendiğini bildirmişlerdir.

Rumen mikroorganizmaları için ortamda yeterince enerji ve azot mevcudiyeti elzemdir. Mikroorganizmaların azot ihtiyacını karşılayacak ve maksimal gelişimini garanti altına alacak NH₃-N konsantrasyonu *in vitro* sistemler için 1 mmol/L (Schaefer ve ark. 1980) ve 5,3 mmol/L (Komisarzcuk ve Durand, 1991) arasında bildirilmiştir. Bu tezde, yaklaşık %12 ham protein içeren konsantre yeme ilaveten fermenterlere tampon solüsyonla fermenterlere gönderilen günlük 5 mmol/L miktarında azot rumen mikroorganizmaların kullanımına sunulmuştur. Lizozim ilavesinin yapılmadığı kontrol fermenterlerinde NH₃-N konsantrasyonun yaklaşık 9,5 mmol/L ölçülmesi bu araştırma kapsamında rumen mikroorganizmalarının gereksinim duydukları azotu karşılayabildiklerini göstermektedir. Sunulan

araştırmada, yüksek doz lizozim uygulaması sonrası $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunda istatistiksel olarak yükselme belirlenmiştir. Rumende yüksek $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonu teorik olarak genellikle artmış proteolizis, rumen duvarından azalmış absorpsiyon, ruminal sıvı döngüsünde (*liquide turnover rate*) yavaşlama ve rumen mikroorganizmalarınca daha az $\text{NH}_3\text{-N}$ kullanımına bağlı şekillenebilmektedir (Höller ve ark., 1983). Bu tez çalışmasında kullanılan *in vitro* sistemde rumen duvarından emilim ve azalmış sıvı döngüsü artmış $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunun sebebi olamaz. Rusitec sistemde artmış $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonu fermenterlerdeki rumen sıvılarında artmış proteolizise ve/veya rumen mikroorganizmalarının düşük $\text{NH}_3\text{-N}$ kullanımına bağlı olabilir. Tez kapsamında ölçümü yapılan rumen parametrelerine bakıldığında ruminal fermantasyonda çoğu kez istatistiksel olmayan ama stimülasyona meyleden bir durum göze çarpmaktadır. Buradan bu çalışmada belirlenen yüksek $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunun rumen mikroorganizmalarının düşük $\text{NH}_3\text{-N}$ kullanımından değil (böyle bir durum ruminal fermantasyon baskılandığında gözlenebilirdi) artmış protein yıkımından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Keza lizozim 129 aminoasitten oluşan bir polipeptittir ve büyük olasılıkla rumen mikroorganizmalarının yüksek hidrolitik aktivitesi nedeniyle rumen koşullarında yıkıma uğramaktadır. Biswas ve arkadaşları da (2016) benzer şekilde 8 000 U lizozim ilavesinin *in vitro* ruminal inkübasyonun 6. saatinde $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunu artırdığını bildirmişlerdir.

Rusitec sistemde 48 saat inkübasyona bırakılan yem maddelerinin kuru madde sindirilebilirlikleri lizozim ilave edilmeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında test edilen her iki lizozim dozundan da istatistiksel olarak etkilenmemiştir. Ancak, düşük ve yüksek doz lizozim grupları arasında istatistiksel fark belirlenmiş, yüksek doz grubunda kuru madde sindirilebilirliği düşük doz grubuna kıyasla daha düşük ölçülmüştür. İki uygulama arasındaki bu farkın sebebini açıklamak oldukça güçtür ve biyolojik bir öneminin de olmadığı düşünülmektedir. Literatürde lizozimin rumen metabolizmasına etkilerinin araştırıldığı tek çalışma olan Biswas ve ark.'ının (2016) yaptığı araştırmada da bu tez çalışmasındaki bulgulara benzer şekilde artan dozlardaki lizozim uygulamaları yem kuru madde ve organik madde sindirilebilirliklerinde istatistiksel bir fark oluşturmamıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu yüksek lisans tezinde, lizozim enziminin 10 000 ve 50 000 U/L dozlarının %20 kaba yem, %80 konsantre yemden oluşan bir deneme yeminin ruminal mikrobiyal fermantasyonu üzerine etkileri uzun süreli bir rumen simülasyon yöntemi olan Rumen Simülasyon Tekniği ile araştırılmıştır. Lizozim enzimi her iki dozda da ruminal fermantasyonun temel parametreleri olan pH, toplam uçucu yağ asidi, asetik, propiyonik ve bütirik asitlerin günlük üretim miktarları, metan gazı üretimi, protozoon sayısı ve kuru madde sindirilebilirliği üzerine olumlu bir etki yapmamıştır. Lizozimin 50 000 U/L dozu ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunda yükselmeye neden olmuştur. Bu bulgular lizozimin rumen ortamında etkisini gösteremediğine işaret etmektedir. Lizozimin neden olduğu $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonundaki artış rumendeki güçlü hidrolitik aktivite neticesinde rumen mikroorganizmaları lizozimi substrat olarak kullanıp sindirdiğine işaret etmektedir.

Lizozim, doğal ve güvenilir bir antimikrobiyal madde olarak yemlik antibiyotiklere alternatif olabilme potansiyeline sahip adaylar arasında bulunmaktadır. Ancak rumen gibi çetin şartların hüküm sürdüğü, (pH, anaerobik ortam, ozmatik basınç, güçlü hidrolitik aktivite, vs.) birçok mikroorganizmanın bu çetin şartlar nedeniyle kolonize olamadığı (probiyotik mikroorganizmaların her gün yemle verilmesinin gerekli olduğu) ve mikroorganizmalar arasında şiddetli rekabetin yaşandığı rumen ortamında, stabilitesini koruyarak etkisini gösterebilecek lizozim preparatlarının biyoteknolojik yöntemlerle geliştirilmesi gelecek için umut verici görülmektedir.

ÖZET

Lizozimin rumen mikrobiyel fermentasyonu üzerine etkilerinin rumen simülasyon tekniği (RUSITEC) ile araştırılması

Düşük molekül ağırlıklı bir protein olan lizozim (1, 4- β -N-asetilmuramidaz), gram pozitif bakterilerin hücre duvarı peptidoglikan tabakasındaki N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozamin molekülleri arasındaki glikozidik bağları kopararak bakteri hücresinde ölüme yol açmaktadır. Bu çalışmanın amacı, lizozim enziminin rumen mikrobiyal fermentasyonu üzerine etkilerini Rumen Simülasyon Tekniği yardımıyla belirlemektir.

Rusitec cihazında gerçek hacimleri 750 mL olan dokuz adet fermenter kullanıldı. Her bir fermenterde 2 g arpa samanı ve 8 g konsantre yemden oluşan bir substrat inkübe edildi. Çalışma 12 gün sürdü. Altı günlük bir adaptasyon fazından sonra lizozim enzimi 0, 10 000 ve 50 000 U/L dozlarında ilgili fermenterlere ilave edildi. Lizozimin her iki konsantrasyonu da ruminal pH, toplam ve bireysel uçucu yağ asitleri (asetik, propiyonik ve bütirik asitler) üretimi, metan üretimi, protozoon sayısı ve kuru madde sindirilebilirliğini istatistiksel olarak etkilemedi. Kontrol fermenterleri ile karşılaştırıldığında, lizozimin 50 000 U/L dozu $\text{NH}_3\text{-N}$ konsantrasyonunu istatistiksel olarak yükseltti ($p < 0,05$).

Araştırmadan elde edilen bulgular, lizozimin ruminal mikrobiyal fermentasyon üzerine minimal düzeyde etki ettiğine, ruminal ortamdaki yoğun proteolitik aktivite karşısında korunmasız olan lizozimin hızla inaktive olup rumen mikroorganizmalarınca sindirildiğine işaret etmektedir.

Anahtar Sözcükler: Fermentasyon, *in vitro*, Lizozim, Rumen, Rusitec.

SUMMARY

Effects of Lysozyme on Rumen Microbial Fermentation Using Rumen Simulation Technique (RUSITEC)

Lysozyme (1,4- β -N-acetylmuramidase) is a low-molecular-weight protein and cleaves the glycosidic linkage between the N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine in the peptidoglycan component of gram positive bacterial cell walls, which leads to bacterial cell death. The aim of this study was to investigate the effects of lysozyme on rumen microbial fermentation using the **R**umen **S**imulation **T**Echnique (Rusitec).

The rusitec apparatus was equipped with nine fermentation vessels, each with a nominal capacity of 750 mL. Each fermentation vessels received daily 2 g barley straw and 8 g concentrate. The study lasted 12 days. After an adaptation period of six days, lysozyme was added to the respective fermentation vessels at levels of 0, 10 000 or 50 000 U/L. Both levels of lysozyme had no effect on ruminal pH, the production of total and individual volatile fatty acids (acetate, propionate, and butyrate), methane production, total protozoa number and dry matter digestibility. However, the addition of 50 000 U/L lysozyme increased ($p < 0,05$) $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration when compared with the un-supplemented control vessels.

These results indicated that lysozyme had only minor effects on the rumen microbial fermentation. Under the ruminal conditions, the strong proteolytic activity rapidly inactivated unprotected lysozyme and rumen microorganisms probably digested the supplied lysozyme as an additional substrate.

Keywords: Fermentation, *In vitro*, Lysozyme, Rumen, Rusitec.

KAYNAKLAR

- ABDL-RAHMAN MA (2010). *In vitro* manipulation of rumen fermentation efficiency by fumaric acid-bentonite coupled addition as an alternative to antibiotics. *J. Agric Sci.* **2**: 174-180.
- ANNISON G (1992). Commercial Enzyme Supplementation of Wheat-Based Diets Raises Ileal Glycanase Activities and Improves Apparent Metabolizable Energy, Starch and Pentosan Digestibilities in Broiler-Chickens. *Anim Feed Sci Technol.* **38(2-3)**: 105-121.
- BAKKER GC, DEKKER RA, JONGBLOED R, JONGBLOED AW (1998). Non-starch polysaccharides in pig feeding. *Vet Q 20 Suppl.* **3**: 59-64.
- BARRERA M, CERVANTES M, SAUER WC, ARAIZA AB, TORRENTERA N (2004). Ileal amino acid digestibility and performance of growing pigs fed wheat-based diets supplemented with xylanase. *J. Anim Sci.* **82(7)**: 1997-2003.
- BECKER J (1994). Untersuchungen zum Einfluß eines Pansenstimulans auf ruminale Fermentationsvorgänge des Rindes (*in vitro*). Dissertation, tierärztl. Hochsch., Hannover, Hannover, Almany.
- BELITZ HD, GROSCH W, SCHIEBERLE P (2001). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 5. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- BHAT MK, HAZLEWOOD GP (2001). Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: Enzymes in Farm Animal Nutrition. BEDFORT MR, PARTRIDGE GG (Hrsg.) Wallingford, UK. CABI Publishing. p.: 11-60.
- BISWAS AA, LEE SS, MAMUAD LL, KIM SH, CHOI YJ, BAE GS, LEE SS (2016). Use of Lysozyme as a Feed Additive on *in vitro* Rumen Fermentation and Methane Emission. *Asian Australas J. Anim Sci.* **29**:1601-1607.
- BÖHME H (1996). Einsatz von Futterenzymen in der Schweinefütterung. In: LAF-Information. Institut für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode: W. Drochner / B. Zaccharias (Hrsg.): 106.
- BURROUGHS W, WOODS W, EWING SA, GREIG J, THEURER B (1960). Enzyme Additions to Fattening Cattle Rations. *J. Anim Sci.* **19(2)**: 458-464.
- BUSSE M, HEILMEIER J (1986). Der Nachweis käseerschädlicher Clostridien. In: Fortbildungsseminar Lysozym in der Käseherstellung, Sonderdruck der dmz (Deutsche Molkerei Zeitung). Weihenstephan.
- CARRO MD, LEBZIEN P, ROHR K (1995). Effects of pore size of nylon bags and dilution rate on fermentation parameters in a semi-continuous artificial rumen. *Small Ruminant Research*, 15(2), pp.: 113-119. The site and extent of digestion in lactating cows. *J. Dairy Sci.* **90**: 5671-5681.

- CHANEY AL, MARBACH EP (1962). Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* **8**: 130-132.
- CHENG KJ, McALLISTER TA (1997). Compartmentation in the rumen. in: HOBSON PN, STEWART CS (Hrsg.): The rumen microbial ecosystem. 2. Aufl. Blackie Academic u. Professional, London, p.: 492-518.
- CHESSON A (1993). Feed Enzymes. *Anim Feed Sci Technol.* **45(1)**: 65-79.
- CLARK JD, DYER IA, TEMPLETON JA (1961). Some Nutritional and Physiological Effects of Enzymes for Fattening Cattle. *J. Anim Sci.* **20(4)**: 928-938.
- CLARK JH, KLUSMEYER TH, CAMERON MR (1992). Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **75**: 2304-2323.
- CLARKSON K, JONES B, BOTT R, BOWER B, CHOTANI G, BECKER T (2001). Enzymes: screening, expression, design and production. In: Enzymes in Farm Animal Nutrition. BEDFORT MR PARTRIDGE GG (Hrsg.) Wallingford, UK. CABI Publishing. P.: 315-352.
- CZERKAWSKI JW (1976). The artificial rumen. *Lab. Pract.* **25**: 15-20.
- CZERKAWSKI JW (1984). Microbial fermentation in the rumen. *Proc. Nutr Soc.* **43(02)**: 101-118.
- CZERKAWSKI JW (1986). An Introduction to rumen studies, Oxford: Pergamon Press.
- CZERKAWSKI JW, GRACE BRECKENRIDGE G (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (RUSITEC). *Br. J Nutr.* **38**: 371-384.
- D'AMATO D, CAMPANIELLO D, SINIGAGLIA M (2010). Enzymes and Enzymatic Systems as Natural Antimicrobials. In: Application of Alternative Food-Preservation Technologies to Enhance Food Safety and Stability. BEVILACQUA A, CORBO MR, SINIGAGLIA M. Eds: Bentham Publisher. Potenza, Italy. p.: 58-82.
- DILorenzo N (2010). Manipulation of the rumen microbial environment to improve performance of beef cattle. North Florida Research and Education Center, Univ. Florida.
- DUBUC J, DUTREMBLAY D, BRODEUR M, DUFFIELD T, BAGG R, BARIL J, DESCOTEAUX L (2009). A randomized herd-level field study of dietary interactions with monensin on milk fat percentage in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **92**: 777-781.
- DUFFIELD TF, BAGG RN (2000). Use of ionophores in lactating dairy cattle: A review. *Can. Vet J.* **41**: 388-394.
- DUFFIELD TF, RABIEE AR, LEAN IJ (2008). A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 1. Metabolic effects. *J. Dairy Sci.* **91**: 1334-1346.
- EISENREICH R (2008). Einfluss exogener Enzymzulagen bei Milchkühen auf die ruminale Abbaubarkeit verschiedener Futtermittel, pansenphysiologische Parameter und die

- Gesamtverdaulichkeit. Dissertation, Technische Universität München, München, Almany.
- ELIAS K (1999). Ruminale Fermentation unter chronisch-azidotischen Bedingungen (*in-vitro*) bei unterschiedlicher Vitamin-B₁-Verfügbarkeit. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover Almany.
- ELLISON RT III, GIEHL TJ (1991). Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin Invest.* **88**: 1080-1091.
- FAVERDIN P (1999). The effect of nutrients on feed intake in ruminants. *Proc. Nutr Soc.* **58(3)**: 523-531.
- FENG P, HUNT CW, PRITCHARD GT, JULIEN WE (1996). Effect of enzyme preparations on *in situ* and *in vitro* degradation and *in vivo* digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. *J. Anim Sci.* **74**: 1349-1357.
- FLEMING A (1922). On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. R. Soc. Serb.* **93**: 306-317.
- GIESECKE D, HENDERICKX H K (Hrsg.) (1973). Biologie und Biochemie der mikrobiellen Verdauung. BLV Verlagsgesellschaft, München, Almany.
- GUÉRIN-DUBIARD C, PASCO M, HIETANEN A, QUIROS DEL BOSQUE A, NAU F, CROGUENNEC T (2005). Hen egg white fractionation by ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* **1090**: 58-67.
- HARMAYER J (1965). Zur Methodik experimenteller Untersuchungen an Pansenprotozoen. *Zentralblatt für Veterinärmedizin.* **12(9)**: 841-880.
- HOBSON PN STEWART CS (1997). The Rumen Microbial Ecosystem, Blackie Academic & Professional, London.
- HÖLLER H, BREVES G MARTENS H (1983). Non-protein-nitrogen and reduced phosphorus supply to sheep, I. Phosphorus, volatile fatty acids, NH₃ and pH of rumen liquid and daily fluid and phosphorus outflow from the rumen. p.: 81-87. In: Nuclear Technique for Assessing and Improving Ruminant Feeds, IAEA, Vienne.
- HUMENY A, KISLINGER T, BECKER CM, PISCHETSRIEDER M (2002). Qualitative determination of specific protein glycation products by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry peptide mapping. *J. Agric Food Chem.* **50(7)**: 2153-2160.
- HUMPHREY BD, HUANG N, KLASING KC (2002). Rice expressing lactoferrin and lysozyme has antibiotic-like properties when fed to chicks. *J. Nutr.* **132**: 1214-1218.
- IPCC (Intergovernment Panel on Climate Change) (2001). Climate Change 2001. The Scientific Basis. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- IPHARRAGUERRE IR, CLARK JH (2003). Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: A review. *Anim. Feed Sci Technol.* **106**: 39-57.

- JOHNSON KA, JOHNSON DE (1995). Methane emissions from cattle. *J. Anim Sci.* **73**: 2483- 2492.
- JOLLÈS J, JAUREGUI-ADELL J, BERNIER I, JOLLÈS P (1963). La structure chimique du lysozyme de blanc d'oeuf de poule: Étude détaillée. *Biochim Biophys Acta.* **78 (4)**: 668-689.
- JOLLES P, JOLLES J (1984). What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol. Cell. Biochem.* **63**: 165-189.
- KAMRA DN, PATRA AAK, CHATTERJEE PN, KUMAR R, AGARWAL N, CHAUDHARY LC (2008). Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: A brief overview. *Aus. J Exper Agric.* **48**: 175-178.
- KOMISARCZUK-BONY S, DURAND M (1991). Nutrient requirement of rumen microbes, In: Recent Advances on Nutrition of Herbivores, MSAP. p.: 133-141.
- KUENZLE CC, JENNY E (1979). Biochemistry of microbial forestomach digestion in ruminants. *Schweiz Arch Tierheilkd.* **121(10)**: 503-519.
- LEBZIEN P (1996). Das deutsche Proteinbewertungssystem für Wiederkäuer in der Diskussion. *Kraftfutter.* **79**: 447-451.
- LENG RA, Nolan JV (1984). Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* **67**:1072-1089.
- LINDBERG JE, KNUTSSON PG (1981). Effect of bag pore size on the loss of particulate matter and on the degradation of cell wall fibre. *Agric. Environ.* **6(2-3)**: 171-182.
- LINDIG C (2014). Auswirkungen klimawandelbedingter Sommertrockenheit auf ruminale Fermentationsparameter von Gräsern und Leguminosen sowie die mikrobielle Population im Pansen, Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Almany.
- LIU D, GUO Y, WANG Z, YUAN J (2010). Exogenous lysozyme influence Clostridium perfringens colonization and intestinal barrier function in broiler chickens. *Avian Pathol.* **39**: 17-24.
- LOSSO JN, NAKAI S, CHARTER EA (2000). Natural Food Antimicrobial Systems. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
- MADIGAN MT, MARTINKO JM, PARKER J (2003). Zellbiologie. In: Brock Mikrobiologie. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH. p.: 55-114.
- McGUFFEY RK, RICHARDSON LF, WILKINSON JD (2001). Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. *J. Dairy Sci.* **84**: 194-203.
- MEYER JH, MACKIE RI (1986). Microbiological evaluation of the intraruminal in sacco digestion technique. *Appl. Environ microbiol.* **51(3)**: 622-629.

- NEWBOLD CJ, WILLIAMS PEV, MEKAIN N, WALKER A, WALLACE RJ (1990). The effect of yeast culture on yeast numbers and fermentation in the rumen of sheep. *Proc. Nutr Soc.* **49**: 47A.
- OBA M, ALLEN MS (2003). Effects of diet fermentability on efficiency of microbial nitrogen production in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **86**: 195-207.
- ODONGO NE, BAGG R, VESSIE G, DICK P, OR-RASHID MM, HOOK SE, GRAY JT, KEBREAB E, FRANCE J, MCBRIDE BW (2007). Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **90**: 1781-1788.
- OEZTUERK H, SCHROEDER B, BEYERBACH M, BREVES G (2005). Influence of Living and Autoclaved Yeasts of *Saccharomyces boulardii* on *in vitro* Ruminal Microbial Metabolism. *J. Dairy Sci.* **88**: 2594-2600.
- OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION (2003). Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition. Pages L268/29-L268/43 in OJEU of 18/10/2003.
- OLIVER WT, WELLS JE (2013). Lysozyme as an alternative to antibiotics improves growth performance and small intestinal morphology in nursery pigs. *J. Anim Sci.* **91**: 3129-36.
- OLIVER WT, WELLS JE, MAXWELL CV (2014). Lysozyme as an alternative to antibiotics improves performance in nursery pigs during an indirect immune challenge. *J. Anim Sci.* **92**: 4927-4934.
- OLIVER WT, WELLS JE (2015). Lysozyme as an alternative to growth promoting antibiotics in swine production. *J. Anim Sci Biotechnol.* **6** (1): 35.
- ØRSKOV ER, HOVELL FDB, MOULD F (1980). The use of the nylon bag technique for the evaluation of feed stuffs. *Trop. Anim Health Prod.* **5**: 195-213.
- ÖZTÜRK H (2003). *In vitro* Studien zum Einfluss von Topinamburmehl und *Saccharomyces boulardii* auf den mikrobiellen Vormagenstoffwechsel. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, 96, Alanya.
- ÖZTÜRK H (2007). Küresel ısınmada ruminantların rolü. *Vet Hekim Dern Derg.* **78**(1): 17-22.
- PERRY TW, PURKHISE ED, BEESON WM (1966). Effects of Supplemental Enzymes on Nitrogen Balance Digestibility of Energy and Nutrients and on Growth and Feed Efficiency of Cattle. *J. Anim Sci.* **25**(3): 760-764.
- PHILLIPS DC (1966). The three-dimensional structure of an enzyme molecule. In: Calvin M (Hrsg.): Organic Chemistry of Life: Readings from Scientific American. San Francisco, WH Freeman and Company. p.: 170-182.
- PRESSMAN BC (1985). The Discovery of ionophores: an historical account, Ed: SIGEL H. Antibiotics and their complexes. Marcel Dekker Inc, New York. P.: 1-18.

- PROCTOR VA, CUNNINGHAM FE (1988). The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **26**: 359-395.
- RESMÎ GAZETE (2006). Yem Katkıları ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı ve Kullanımı Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ (Tebliğ No: 2006/1), 21/01/2006 tarih ve 26056 sayı.
- ROVICS JJ, ELY CM (1962). Response of Beef Cattle to Enzyme Supplements. *J Anim Sci.* **21(4)**: 1012.
- RUSSEL JB, HESPELL RB (1981). Microbial rumen fermentation. *J. Dairy Sci.* **64**: 1153-1169.
- RUSSELL JB, HOULIHAN AJ (2003). Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. *FEMS Microbial. Rev.* **27**: 65-74.
- RUSSELL JB, STROBEL HJ (1989). Mini-Review: the effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ Microbiol.* **55**: 1-6.
- RUST JW, JACOBSON NL, MCGILLIA AD, HOTCHKIS DK (1965). Supplementation of Dairy Calf Diets with Enzymes. 2. Effect on Nutrient Utilization and on Composition of Rumen Fluid. *J Anim Sci.* **24(1)**: 156-160.
- SAHOO NR, KUMAR P, BHUSAN B, BHATTACHARYA TK, DAYAL S, SAHOO M (2012). Lysozyme in livestock: A guide to selection for disease resistance: A review. *J. Anim Sci Adv.* **2**: 347-360.
- SCHAEFER DM, DAVIS CL, BRYANT MP (1980). Ammonia saturation constants for predominant species of rumen bacteria. *J Dairy Sci.* **63**: 1248-1263.
- SCHNEIDER N (2011). Entwicklung von Nachweismethoden für Lysozym und Nisin in Milchprodukten. Dissertation, Naturwissenschaftlichen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität, Nürnberg, Almanya.
- TAMMINGA S (1992). Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. *J. Dairy Sci.* **75**: 345-357.
- TAMMINGA S (1996). A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. *J. Anim Sci.* **74**: 3112-3124.
- THEURER B, BURROUGHS W, WOODS W (1963). Influence of Enzyme Supplements in Lamb Fattening Rations. *J. Anim Sci.* **22(1)**: 150-154.
- ÜSTÜNKOL N (2006). Farklı ortam koşullarında nisin, lizozim ve bazı bitkisel kaynakların küf gelişiminin kontrol altına alınması üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul, Türkiye.
- Van NEVEL CJ, DEMEYER DI (1988). Manipulation of rumen fermentation. In: The Rumen Microbial Ecosystem, P.: 387-443. HOBSON PN. Ed. Elsevier Applied Science, New York, USA.
- Van SOEST PJ (1994). Nutritional ecology of the ruminant 2nd Ed., Cornell University Press.

- Van WALLEGHEM PA, AMMERMAN CB, CHICCO CF, MOORE JE, ARRINGTON LR (1964). Enzyme supplements and digestibility of protein and energy in rations high in dried up citrus pulp. *J Anim Sci.* **23**: 960-962.
- WEAKLEY DC, STERN MD, SATTER LD (1983). Factors affecting disappearance of feed stuffs from bags suspended in the rumen. *J. Anim. Sci.* **56**: 493-507.
- WOLIN MJ (1960). A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.* **43**: 1452-1459.
- YANG WZ, BENCHAAR C, AMETAJ BN, CHAVES AV, HE ML, MCALLISTER TA (2007). Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. *J. Dairy Sci.* **90**: 5671-5681.
- ZHANG G, DARIUS S, SMITH SR, RITCHIE SJ (2006). *In vitro* inhibitory effect of hen egg white lysozyme on *Clostridium perfringens* type A associated with broiler necrotic enteritis and its α -toxin production. *Lett. Appl Microbiol.* **42**: 138-143.



EKLER

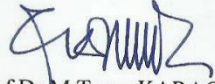
Ek-1. Etik Raporu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ : 07/12/2016
TOPLANTI NO : 2016-24
DOSYA NO : 2016-139
KARAR NO : 2016-24-203

Yürüttüğü Üversitemiz Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr.Hakan Öztürk'ün yaptığı, araştırmacı olarak Vet.Hek.Saad Ahmed Adem Musa'nın katıldığı "Lizozimin Rumen Mikrobiyel Fermantasyonu Üzerine Etkilerinin Rumen Simülasyon Tekniğı (RUSITEC) ile Araştırılması" başlıklı araştırma projesinin içeriğı Kurulumuzca incelenmiştir. Söz konusu çalışma Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"nin 7. maddesi (h) kapsamında ele alınmış olup, çalışmanın Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu iznine tabi olmadığına oy birliğı ile karar verilmiştir.

ASLININ AYNIDIR
07/12/2016



Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU
A.Ü. HADYЕК Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

I. BİREYSEL BİLGİLER:

ADI: Saad Ahmed Adam

SOYADI: MUSA

DOĞUM YERİ: AL-Gezira Aba - SUDAN

DOĞUM TARİHİ: 10.12.1988

ADRES: Fizyoloji Anabilim Dalı - Veteriner Fakültesi - Al-Butana
Üniversitesi - Tamboul - Sudan.

TEL (CEP): 05365806270 - 00249122489056

E-POSTA: saadbutana@gmail.com - smusa@ankara.edu.tr

II. EĞİTİM:

LİSANS: Veteriner Fakültesi - Al- Gezira Üniversitesi - Sudan.

LİSE: Al-Gezira Aba Algadida Lisesi

İLKOKUL: Al-Imam Abdalrahman İlkokulu

YABANCI DİL: Türkçe ve İngilizce

III. UNVANLAR:

Veteriner Hekim

Araştırma Görevlisi - Fizyoloji Anabilim Dalı - Veteriner Fakültesi - Al-
Butana Üniversitesi - Sudan.

Tezli Yüksek Lisans öğrencisi.