



**T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

**UÇUCU YAĞLARIN BAZI RUMEN FUNGUSLARININ YAŞAMSAL
VE FİBROLİTİK ENZİM SİSTEMLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Kadriye DALFESOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KAHRAMANMARAŞ
Eylül 2009**

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOOTEKNİ ANABİLİM DALI

**UÇUCU YAĞLARIN BAZI RUMEN FUNGUSLARININ YAŞAMSAL
VE FİBROLİTİK ENZİM SİSTEMLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Kadriye DOLFESOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kod No:

Bu Tez 14 / 09 / 2009 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oy Birliğı ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Şengül KARAMAN
ÜYE

.....
Doç. Dr. Emin ÖZKÖSE
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Süleyman TOLUN
Enstitü Müdürü

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.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

İÇİNDEKİLER.....	I
ÖZET.....	IV
ABSTRACT	V
ÖNSÖZ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
EK ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Rumen ve Rumenin Mikrobiyal Ekosistemi	1
1.2. Anaerobik Rumen Funguslarının Keşfi ve Taksonomisi.....	1
1.3. Anaerobik Fungusların Yaşam Döngüsü	2
1.4. Rumen Funguslarının Enerji Metabolizması ve Fermentasyon.....	4
1.5. Bitki hücre duvarının yapısı	5
1.5.1. Selüloz.....	5
1.5.2. Ksilan	6
1.5.3. Pektin	6
1.5.4. Lignin.....	7
1.6. Anaerobik Fungusların Bitki Hücre Duvarını Yıkımı.....	7
1.7. Anaerobik Fungusların Fibrolitik Enzimleri.....	8
1.7.1. Selülaz.....	8
1.7.2. Ksilanaz	9
1.7.3. Pektinaz	10
1.7.4. Amilaz.....	10
1.7.5. Ligninin parçalanması	11
1.7.6. Proteaz	11
1.8. Bitkisel Uçucu Yağlar	12
1.8.1. Uçucu Yağların Kökeni ve Sınıflandırılması.....	12
1.8.2. Uçucu Yağların Biyolojik Özellikleri ve Hareket Mekanizmaları	14
1.8.3. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Etkileri.....	14
1.8.4. Uçucu Yağların Rumen Fermentasyonunda Kullanımı	15
1.9. Çalışmanın Önemi ve Kapsamı	16
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	17
2.1. Rumen Funguslarının Sahip Olduğu Enzimler Üzerine Yapılan Bazı Çalışmalar	17
2.2. Antimikrobiyal Maddelerin Rumen Mikroorganizmaları ve Fermentasyonu Üzerine Etkileriyle İlgili Çalışmalar	19
2.3. Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar	19
2.4. Bitki Uçucu Yağlarının Rumen Mikroorganizmaları ve Fermentasyonu Üzerine Etkileriyle İlgili Çalışmalar.....	21
3. MATERYAL VE METOT	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. Kimyasallar	22
3.1.2. Aletler	22
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Anaerobik Funguslar	22

3.1.4. Bitkisel Uçucu Yağlar.....	22
3.2. Metot.....	22
3.2.1. Anaerobik Besi Yeri	22
3.2.1.1. Anaerobik Besi Yerinin Hazırlanması.....	23
3.2.1.2. Anaerobik Besi Yerinde Bakteriyel Büyümeyi Engelleyici Antibiyotik İlavesi	24
3.2.2. Bitkisel Uçucu Yağlar	24
3.2.2.1. Uçucu Yağların Ekime Hazırlanması	24
3.2.2.2. Uçucu Yağların Besi Yerlerine İlave Edilmesi ve Fungus Ekimi	24
3.2.3. Anaerobik Fungusların Fibrolitik Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	25
3.2.3.1. Süpernatantların Hazırlanması	25
3.2.3.2. Enzim Testi	25
3.2.4. Protein Analizi.....	26
3.2.5. İstatistiksel Analiz	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	27
4.1. Bitkisel Uçucu Yağların Anaerobik Fungus Gelişimi Üzerine Etkisi	27
4.2. Bitkisel Uçucu Yağ İçeren Kültürlerde Büyütülen Anaerobik Fungusların Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi	29
4.2.1. Uçucu Yağların <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF2'nin Toplam ve Spesifik KMSaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	29
4.2.2. Uçucu Yağların <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF2'nin Toplam ve Spesifik Ksilanaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	31
4.2.3. Uçucu Yağların <i>Orpinomyces</i> sp. GMLF18'in Toplam ve Spesifik KMSaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	32
4.2.4. Uçucu Yağların <i>Orpinomyces</i> sp. GMLF18'in Toplam ve Spesifik Ksilanaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	33
4.3. Anaerobik Fungus Kültüründe Elde Edilen Protein Miktarları.....	35
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR.....	40
EKLER.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	55

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZET

UÇUCU YAĞLARIN BAZI RUMEN FUNGUSLARININ YAŞAMSAL VE FİBROLİTİK
ENZİM SİSTEMLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Kadriye DALFESOĞLU

Danışman : Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ

Year: 2009, Pages: 55

Jüri : Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ
: Prof. Dr. Şengül KARAMAN
: Doç. Dr. Emin ÖZKÖSE

Rumen fermentasyonunu düzenlemede kullanılan antibiyotik iyonoforlarının yasaklanması bilim adamlarını alternatif antimikrobiyal maddelerin kullanımıyla ilgili çalışmalar yapmaya yönlendirmiştir. Bitki uçucu yağları da bu alternatiflerden biridir. Bu çalışmada bitki uçucu yağlarının anaerobik rumen fungusları üzerindeki etkileri çalışılmıştır. Çalışma kapsamında mersin (*Myrtus communis*), ardıç (*Juniperus communis*), melisa (*Melissa officinalis*) ve kekik (*Thymus vulgaris*) bitki uçucu yağlarının farklı konsantrasyonlarının *Neocallimastix* sp. GMLF2 ve *Orpinomyces* sp. GMLF18 anaerobik funguslarının büyümeleri ve enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Buna göre, bitkisel uçucu yağlar etil alkolde çözülerek besiyerlerine ilave edilmiş ve besiyerleri 39 °C'lik inkübatörde 3 gün büyümeye bırakılmıştır. 3. günün sonunda santrifüjle çöktürülen besiyerlerinin üst kısmı süpernatant olarak enzim ve protein analizlerinde kullanılmak üzere -20 °C'lik dondurucuya alınmıştır. Çalışma sonunda *Neocallimastix* sp. GMLF2 ve *Orpinomyces* sp. GMLF18'in uçucu yağların 1 mg/ml konsantrasyonunda büyümelerinin tamamen inhibe edildiği ve fungusların karboksimetilselülaz ve ksilanaz aktivitelerinin de 0.5 mg/ml konsantrasyondan sonra düştüğü belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Rumen, anaerobik fungus, bitkisel uçucu yağ, karboksimetilselülaz, ksilanaz, enzim aktivitesi

**UNIVERSITY OF KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES IN SCIENCE AND ENGINEERING
DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCE**

MSc THESIS

ABSTRACT

**THE EFFECTS OF ESSENTIAL OILS ON THE SURVIVAL AND FIBROLITIC ENZYME
ACTIVITIES OF SOME RUMEN FUNGI**

Kadriye DALFESOĞLU

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ

Year: 2009, Pages: 55

**Jury : Assoc. Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ
: Prof. Dr. Şengül KARAMAN
: Prof. Dr. Emin ÖZKÖSE**

Since usage of the antibiotics on animal production has been banned, scientists have focused on evaluating other alternatives to control of modulate rumen fermentation. Plant essential oils are the main alternatives. The aim of this study was to determine the effects of plant essential oils on rumen anaerobic fungi. For this response, the effects of myrtle (*Myrtus communis*), juniper (*Juniperus communis*), melissa (*Melissa officinalis*) and thyme (*Thymus vulgaris*) plant essential oil, which have antimicrobial properties, were investigated on growth and enzyme activity the of *Neocallimastix* sp. GMLF2 and *Orpinomyces* sp. GMLF18. Accordingly, plant essential oils were solved in ethyl alcohol and was added the media. The cultures were incubated at 39°C for 3 days and collapsed using centrifuges. The upper part of culture were collected as supernatant and stored at - 20°C untill required. Supernatant is used for enzyme and protein analysis. Our results showed that, fungal growth was completely inhibited at the level of 1 mg/ml essential oil concentration and their carboxymethylcellulase and xylanase activities were decreased remarkably after 0.5 mg/ml concentration.

Keywords: Rumen, anaerobic fungus, plant essential oil, carboxymethylcellulase, xylanase, enzyme activity

ÖNSÖZ

Tez konusunun belirlenmesi, çalışmanın yürütülmesi ve yazım aşamasında beni yönlendiren danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Sait EKİNCİ'ye ve hocam Doç. Dr. Emin ÖZKÖSE'ye, katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. İsmail AKYOL'a, çalışmanın her aşamasında emeğini ve yardımlarını esirgemeyen Ar. Gör. Dr. Uğur ÇÖMLEKÇİOĞLU'na, istatistik analizlerin hesaplanmasında ki yardımlarından dolayı Ar. Gör. Dr. Mustafa ŞAHİN'e ve tüm BİGEM laboratuvarındaki arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmam boyunca hoşgörü ve desteklerini esirgemeyen başta Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürü M. Nefi KISAKÜREK olmak üzere Bahçe Bitkileri Bölüm Başkanı Dr. B. Bülent ARPACI ve tüm bölüm elemanları ile diğer mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman bana olan inançları ve destekleriyle yanımda olan aileme teşekkürü borç bilirim.

Eylül 2009, KAHRAMANMARAŞ**Kadriye DALFESOĞLU**

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. Anaerobik fungusların cins düzeyinde morfolojik özellikleri	3
Çizelge 3.1. Anaerobik fungus sıvı besi yeri içeriği.....	23
Çizelge 4.1. Uçucu yağların KMS'li besi ortamında büyütülen anaerobik fungusların gelişimi üzerine etkisi.....	28
Çizelge 4.2. Uçucu yağların ksilanlı besi ortamında büyütülen anaerobik fungusların gelişimi üzerine etkisi.....	29
Çizelge 4.3. <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF2'nin KMS kültüründe toplam KMSaz aktivitesi	30
Çizelge 4.4. <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF2'nin KMS kültüründe spesifik KMSaz aktivitesi	31
Çizelge 4.5. <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF2'nin ksilan kültüründe toplam ksilanaz aktivitesi	31
Çizelge 4.6. <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF2'nin ksilan kültüründe spesifik ksilanaz aktivitesi	32
Çizelge 4.7. <i>Orpinomyces</i> sp. GMLF18'in KMS kültüründe toplam KMSaz aktivitesi	33
Çizelge 4.8. <i>Orpinomyces</i> sp. GMLF18'in KMS kültüründe spesifik KMSaz aktivitesi	33
Çizelge 4.9. <i>Orpinomyces</i> sp. GMLF18'in ksilan kültüründe toplam ksilanaz aktivitesi	34
Çizelge 4.10. <i>Orpinomyces</i> sp. GMLF18'in ksilan kültüründe spesifik ksilanaz aktivitesi	35

EK ŞEKİLLER DİZİNİ**SAYFA**

Ek Şekil 1. Uçucu yağ uygulaması sonrasında <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF2'nin toplam KMSaz aktivite grafiği.....	51
Ek Şekil 2. Uçucu yağ uygulaması sonrasında <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF2'nin spesifik KMSaz aktivite grafiği	51
Ek Şekil 3. Uçucu yağ uygulaması sonrasında <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF2'nin toplam ksilanaz aktivite grafiği.....	52
Ek Şekil 4. Uçucu yağ uygulaması sonrasında <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF2'nin spesifik ksilanaz aktivite grafiği.....	52
Ek Şekil 5. Uçucu yağ uygulaması sonrasında <i>Orpinomyces</i> sp. GMLF18'in toplam KMSaz aktivite grafiği	53
Ek Şekil 6. Uçucu yağ uygulaması sonrasında <i>Orpinomyces</i> sp. GMLF18'nin spesifik KMSaz aktivite grafiği	53
Ek Şekil 7. Uçucu yağ uygulaması sonrasında <i>Orpinomyces</i> sp. GMLF18'in toplam ksilanaz aktivite grafiği.....	54
Ek Şekil 8. Uçucu yağ uygulaması sonrasında <i>Orpinomyces</i> sp. GMLF18'in spesifik ksilanaz aktivite grafiği	54

EK ŞEKİLLER DİZİNİ**SAYFA**

Ek Şekil 1. Uçucu yağ uygulaması sonrasında <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF2'nin toplam KMSaz aktivite grafiği.....	51
Ek Şekil 2. Uçucu yağ uygulaması sonrasında <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF2'nin spesifik KMSaz aktivite grafiği	51
Ek Şekil 3. Uçucu yağ uygulaması sonrasında <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF2'nin toplam ksilanaz aktivite grafiği.....	52
Ek Şekil 4. Uçucu yağ uygulaması sonrasında <i>Neocallimastix</i> sp. GMLF2'nin spesifik ksilanaz aktivite grafiği.....	52
Ek Şekil 5. Uçucu yağ uygulaması sonrasında <i>Orpinomyces</i> sp. GMLF18'in toplam KMSaz aktivite grafiği	53
Ek Şekil 6. Uçucu yağ uygulaması sonrasında <i>Orpinomyces</i> sp. GMLF18'nin spesifik KMSaz aktivite grafiği	53
Ek Şekil 7. Uçucu yağ uygulaması sonrasında <i>Orpinomyces</i> sp. GMLF18'in toplam ksilanaz aktivite grafiği.....	54
Ek Şekil 8. Uçucu yağ uygulaması sonrasında <i>Orpinomyces</i> sp. GMLF18'in spesifik ksilanaz aktivite grafiği	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AA	: Amino asit
ark.	: Arkadaşları
BİGEM	: Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği Laboratuvarı
BSA	: Bovin serum albumin
°C	: Santigrad derece
dk	: Dakika
DNS	: 3-5 dinitrosalisilik asit
dH ₂ O	: Distile su
E.C.	: Enzim kodu
gr	: Gram
H ₂	: Hidrojen
KMS	: Karboksi metil selüloz
KMSaz	: Karboksi metil selülaz
lt	: Litre
MgSO ₄ ·7H ₂ O	: Magnezyum sülfat
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
NFC	: Non Fiber Carbohydrates
NH ₃ -N	: Amonyak azotu
nm	: Nanometre
sp.	: Tür
U.Y.	: Uçucu Yağ
UYA	: Uçucu yağ asiti

1. GİRİŞ

1.1. Rumen ve Rumenin Mikrobiyal Ekosistemi

Sindirim sistemi ruminantlarda 4 bölümden meydana gelmektedir. İlk 3 ön mide bölümü özefagusun değişimi ile oluşmuştur. Dördüncü bölüm olan abomasum ise gastrik sindirimin gerçekleştiği yerdir ve bu kısım monogastrik memelilerdeki mideye karşılık gelen bölümdür. Rumen, ruminant sindirim sisteminin hacim olarak en büyük kısmını teşkil eder ve retikulumla beraber, sığırlarda 100–150lt, koyunlarda 10lt hacmine ulaşan (Hobson ve Wallace, 1982) ve yoğun bir mikroorganizma popülasyonu içeren, büyük bir fermentasyon kabı vazifesi görür. Ayrıca rumenin mikrobiyal popülasyonu lif sindirimi için çok büyük potansiyele sahiptir (Akin, 1986). Evcil ruminantlar tüketilen hayvansal proteinin %70'ini ve insanlar tarafından kullanılan doğal liflerin (yün, tiftik vs.) %10'unu sağlarlar (Wilson, 1994).

Yeni doğmuş ruminantların ana besin kaynağını sadece süt oluşturduğundan sindirim sistemi özellikle selülitik mikroorganizmaları içermez, buna karşın rumen mikroflorasına *Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Clostridium* gibi laktik asit bakterileri hakimdir (Hobson ve Wallace, 1982). Bakteri ve protozaların yetişkin hayvanlardan yavrulara geçişinin emzirmeyle, salyayla, havayla veya ortak kullanılan su ve yem vasıtasıyla olduğu düşünülmektedir. Geviş getirme esnasında bol miktarda rumen içeriği ağıza taşınmakta ve burada kaldığı süre içerisinde rumen mikroorganizmaları salya ile temas etmektedir (Hobson, 1971). Anaerobik fungusların yetişkin hayvanlardan yavrulara geçişinin ise gerek salya gerekse yeme bulaşmış olan dışkı yoluyla gerçekleştiği ileri sürülmektedir (Lowe ve ark., 1987c; Milne ve ark., 1989).

Rumenin mikrobiyal ekosistemi stabil ve aynı zamanda dinamiktir. İyi kurulmuş ve fonksiyonlarını yerine getiren stabil bir ekosistem besinleri uçucu yağ asitlerine kadar indirger. Sağlıklı bir ruminantta ekosistemde her gün tüketilen gıda, içilen su ve hava yoluyla alınan milyonlarca mikrop tarafından istila edilmesine rağmen kontaminasyon gerçekleşmez. Ekosistem aynı zamanda dinamiktir çünkü uygulanan rasyon içerisindeki yiyeceklerle bağlı olarak sürekli değişir. Bu olayın nedeni rumen canlılarının hayatta kalabilmek için ortama adapte olabilmeleridir (Kamra, 2005).

Rumen sıvısı içerisinde bakteriler (50'den fazla cinsle temsil edilen $10^{10} - 10^{11}$ hücre/ml), kamçılı protozoalar ($10^4 - 10^6$ hücre/ml, 25cins), anaerobik funguslar ($10^3 - 10^5$ zoospor/ml, 6 cins), ve bakteriyofajlar ($10^8 - 10^9$ /ml) bulunur (Hobson, 1989).

Anaerobik funguslar, rumen, omasum, abomasum, ince bağırsak, sekum ve kalın bağırsaktan izole edilmişlerdir. Bu sonuçlar anaerobik fungusların ağızdan anüse kadar ruminantların tüm sindirim kanalında ve dışkıda canlılıklarını sürdürebileceklerini göstermektedir (Davies ve ark., 1993a).

1.2. Anaerobik Rumen Funguslarının Keşfi ve Taksonomisi

Rumende ilk defa Liebetanz (1910) ve Braune (1913) tarafından gözlemlenen anaerobik funguslar *Sphaeromonas communis* ve *Callimastix frontalis* adlarıyla kayıtlara geçirilmiş ancak o dönemde bu organizmaların kamçılı protozoa olduğuna inanılmıştır.

Orpin'in (1974; 1975) yaptığı çalışmalar sonucu anaerobik fungusların rumendeki keşifleri gerçekleşmiş ve *Neocallimastix frontalis* adıyla taksonomideki yerini almıştır. Anaerobik fungusların, Orpin (1975) tarafından ilk defa tanımlanmalarından bu yana 6 farklı cins altında 18 tür, karakterize edilmiş ve sınıflandırılmıştır (Ho ve Barr, 1995; Özköse ve ark., 2001; Chen ve ark., 2007).

Anaerobik fungusların tamamı zoospor oluşturur ve belirli bir hücre duvarına sahiptirler. Bu sebepten dolayı ilk kez Eumycota bölümünün Mastigomycotina alt bölümünde yer almışlardır. Heath ve ark., (1983) ile Barr (1988) tarafından fungusların Mastigomycotina alt bölümünün Chytridiomycetes sınıfında yer aldıkları bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar (Li ve Heath, 1992; Li ve ark., 1993) Chytridiomycetes sınıfının bireyleri ile aerobik Spizellomycetales takımının birbirleriyle anaerobik funguslardan çok daha yakın olduklarını dolayısıyla anaerobik fungusların Spizellomycetales'ten ziyade Neocallimastigales takımında yer almaları gerektiğini önermektedir. Munn (1994) ise rumen funguslarının aerobik Spizellomycetales takımında değil Anaeromycetales takımında yer almaları gerektiğini önerse de, anaerobik fungusların Neocallimastigales takımında yer almaları gerektiği kabul görmüştür. Yapılan filogenetik analizlere göre rumen funguslarının Chytridiomycota içerisindeki en temel grup olarak diğer takımlardan ayrıldığı bildirilse de (James ve ark., 2006) güncel moleküler filogenetik analizler kullanılarak fungal alemin kapsamlı bir filogenetik sınıflandırılması yapılmış ve anaerobik rumen fungusları için Neocallimastigomycota adında yeni bir filum oluşturularak Chytridiomycota'dan ayrılmıştır (Hibbett ve ark., 2007).

Yukarıda anlatılan çalışmaların ışığı altında anaerobik fungusların taksonomisi şu şekilde belirlenmiştir:

Alem:	Fungi
Filum:	Neocallimastigomycota
Sınıf:	Neocallimastigomycetes
Takım:	Neocallimastigales
Familiya:	Neocallimastigaceae
Cinsler:	<i>Caecomycetes</i> (zoospor tek kamçılıdır)
	<i>Neocallimastix</i> (zoospor çoklu kamçılıdır)
	<i>Piromyces</i> (zoospor tek kamçılıdır)
	<i>Orpinomyces</i> (zoospor çoklu kamçılıdır)
	<i>Anaeromyces</i> (zoospor tek kamçılıdır)
	<i>Cyllamyces</i> (zoospor tek kamçılıdır)

1.3. Anaerobik Fungusların Yaşam Döngüsü

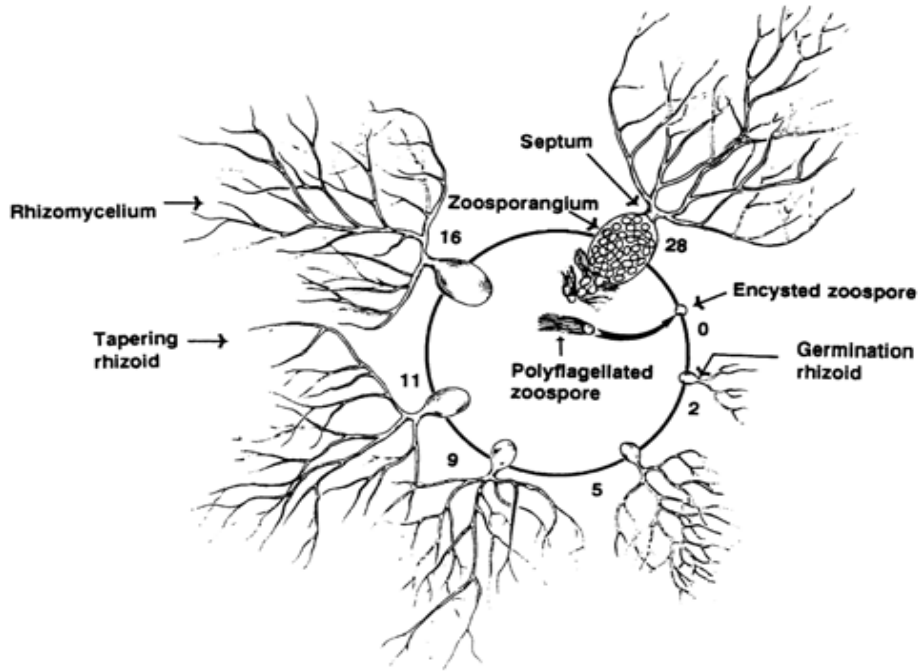
Morfolojik yapıları itibariyle *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Orpinomyces*, ve *Anaeromyces* dallanmış rizoid yapısına sahip olduklarından oldukça sınırlı ve küresel rizoid yapısına sahip cinsler olan *Caecomycetes* ve *Cyllamyces* cinslerinden oldukça farklıdır. *Neocallimastix* ve *Piromyces* monosentrik yaşam, *Orpinomyces* ve *Anaeromyces* cinsleri polisentrik yaşam halkasına sahiptirler. *Neocallimastix* ve *Orpinomyces*'in zoosporları çok kamçılı (>4 kamçı) iken *Piromyces* ve *Anaeromyces* cinslerinin zoosporları tek kamçılıdır (≤4 kamçı). Küresel rizoid yapısına sahip olan *Cyllamyces* ve *Caecomycetes* cinsleri arasındaki farklılık ise *Caecomycetes* cinslerine ait türler

monosentrik, *Cyllamyces* cinsine ait bireyler ise polisentrik yaşam göstermesinden ileri gelir (Ozkose, 2001; Özköse ve ark., 2003) (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Anaerobik fungusların cins düzeyinde morfolojik özellikleri

Cins	Üreme Yapısı	Rizoid Yapısı	Zoospor Kamçı Sayısı
<i>Neocallimastix</i>	Tek (Monosentrik)	Dallanmış rizoid	Çok (>4)
<i>Piromyces</i>	Tek (Monosentrik)	Dallanmış rizoid	Tek (≤ 4)
<i>Caecomyces</i>	Tek (Monosentrik)	Küresel rizoid	Tek (≤ 4)
<i>Anaeromyces</i>	Çok (Polisentrik)	Dallanmış rizoid	Tek (≤ 4)
<i>Orpinomyces</i>	Çok (Polisentrik)	Dallanmış rizoid	Çok (>4)
<i>Cyllamyces</i>	Çok (Polisentrik)	Küresel rizoid	Tek (≤ 4)

Rumendeki anaerobik fungusların hayat döngüsü, rumen sıvısındaki hareketli zoospor evresi ile onu izleyen fungal talli evresi olmak üzere iki evreden meydana gelir. Fungal talli evresi anaerobik fungusların koloni kurdukları ve kuru maddeleri sindirdikleri evredir. Bağırsağın aşağı kısmında ve dışkıda görülen üçüncü evre ise hayatta kalma evresidir (Davies ve ark., 1993a; Nielsen ve ark., 1995). İn vitro da hayat döngüleri 24–32 saat aralığında tanımlandığı halde in vivo da uygun şartlar altında 8 saat sonra kist oluşturabilirler (France ve ark., 1990; Theodorou ve ark., 1996; Ozkose ve ark., 2001) (Şekil 1.1)



Şekil 1.1. Tipik bir monosentrik anaerobik fungusun yaşam döngüsü (Theodorou ve ark., 1996). Rakamlar (saat) yaşam döngüsünün evrelerini göstermektedir.

Monosentrik funguslar basit bir eşeysiz hayat döngüsüne sahiptir. Geriye yönelmiş kamçılı hareketli zoospor, uygun bir substrat ya da genellikle yemin bir parçasıyla teması halinde kamçılarını dökerek kist oluşturur. Kistlerin (encysts) gelişmesiyle rizoidler oluşur, fungus rumen sıvısında bulunan bitki parçasına tutunur ve esas hücre gövdesi büyümesi sporesi içinde gerçekleşir (Orpin, 1988). Gold ve ark., (1988)'na göre hücre gövdesi

genişlemesinin değişkenlik derecesinden sonra zoospor üretme (zoosporogenesis) başlatılmış olabilir. Sporesesi duvarının sindirilmesiyle zoosporlar serbest kalır ve yaşam döngüsü tamamlanmış olur (Heath ve ark., 1983).

Polisentrik funguslar üremek için zoospor formasyonuna bağımlı değildir. Büyüme yapıları yüksek funguslara benzer ve fungal büyüme liflerle olur. Spor kesesindeki genetik materyal nükleer bölünmeyle çoğalır ve kese boynundan geçerek miseller içerisine yerleşir ve bu noktalarda yeni spor keseleri oluştururlar (Ho ve ark., 1991). Zoosporlar seyrek olarak üretilir ya da zoosporogenez (zoospor oluşturma) yoktur (Phillips, 1989).

1.4. Rumen Funguslarının Enerji Metabolizması ve Fermentasyon

Rumen özel ekolojik şartları bulunan bir sistemdir. Bu ekolojik şartların oluşmasında gerekli unsurlar nem, pH, anaerob ortam, mikroorganizmaların varlığı, nötralizasyon, sürekli besin maddelerinin varlığı ve fermentasyon sonucunda oluşan ürünlerin uzaklaştırılmasıdır (Bolat ve ark., 1996).

Ruminant hayvan, besin madde bileşenlerinin (örn. selüloz, hemiselüloz, nişasta, protein gibi) parçalanması için aynı zamanda ruminal mikroorganizmaların ihtiyacı olan karbon kaynağı, enerji, amino asitler (mikrobiyal protein) ve vitaminlerin bu mikroorganizmalara sağlanması gereklidir (Selinger ve ark., 1996).

Rumende besin maddelerinin metabolize olabilmesi ve rumendeki metabolik olayların optimum düzeyde gerçekleşmesi uygun bir pH ile mümkündür. Üreaz aktivitesi hariç diğer tüm fizyolojik olaylar için optimum rumen pH'sı 5.5-7.0 arasındadır (Dufva ve ark., 1983).

Rumende karbonhidrat, protein ve yağ fermentasyonu sonucu ortaya çıkan en önemli son ürün Uçucu Yağ Asitleri (UYA)'dır. UYA'ların başlıcaları asetik, propiyonik, bütirik, formik, valerik, izovalerik, kaproik ve kaprilik asitlerdir (Ergün ve Tuncer, 2001). Rumende nişasta, selüloz, hemiselüloz, şekerler ve pektin gibi karbonhidratlar mikroorganizmalar tarafından salınan ekstraselüler enzimlerin yardımıyla önce monosakkaritlere, intraselüler enzimlerin yardımıyla da pirüvik asit ve son olarak da uçucu yağ asitleri (UYA), CO₂, metan ve hidrojene kadar parçalanırlar. Rumende UYA, karbonhidratların dekarboksilasyonu ile meydana geldiği gibi aminoasitlerin deaminasyonu sonucunda da oluşmaktadır. Ruminantlar enerji ihtiyaçlarının % 60'ını UYA'den karşılamaktadırlar (Hobson, 1988).

Ruminant rasyonlarının % 70-80'i karbonhidratlardan oluşmaktadır. Yemlerdeki karbonhidratlar ikiye ayrılırlar. Yapısal olmayan karbonhidratlar (NFC = Non Fiber Carbohydrates), nişasta ve şekerlerden oluşan hücre içi; yapısal karbonhidratlar ise, selüloz, hemiselüloz, lignin ve pektinlerden oluşan hücre duvarı materyalleridir. NFC'lar bakteri, protozoa ve maya gibi mikroorganizmaların çoğalabilmeleri için tek enerji kaynaklarıdır (Davis, 1992).

Anaerobik funguslar mitokondriye sahip değildir ve hem aerobik hem de anaerobik solunum için enerji üretemezler (Yarlett ve ark., 1986; O'Fallon ve ark., 1991). Onun

yerine hidrojenozomları vardır ve enerji ihtiyaçlarını karbonhidratların fermentasyonu ile karşılarlar. Bu süreçte enerji kaynağı hem elektron alıcısı hem de elektron vericisi gibi hareket ederler. Hidrojenozomlar hidrogenaz içerir (EC 1.18.99.1) ve metabolik atık ürünler olan H_2 , CO_2 ve asetat üretir (Yarlett ve ark., 1986; Brul ve Stumm, 1994). Bu substratlar karışık-asit fermentasyonu vasıtasıyla fermente edilmiş format, asetat, laktat, etanol, CO_2 ve H_2 verir (Lowe ve ark., 1987b). Bu ürünlerin bazılarının (format, etanol ve laktat) rumende bulunması normal değildir. Saf kültürlerde bunların birikimi metanojenik mikroorganizmaların kültür içinde yokluğu olarak düşünülmekte, bundan hareketle mikrobiyal etkileşimin yokluğu türler arası H_2 transferi ile ilişkilendirilmektedir (Bauchop ve Mountfort., 1981).

Anaerobik funguslar gelişimleri için çok çeşitli polisakkarit ve disakkaritleri kullandıkları halde glukoz, fruktoz ile ksiloz gibi monosakkarit kullanımları sınırlıdır (Lowe ve ark., 1987b; Phillips ve Gordon, 1988).

1.5. Bitki hücre duvarının yapısı

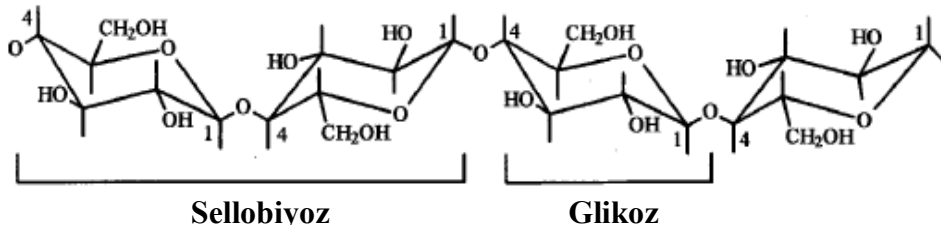
Bitki hücre duvarları dünyadaki 1.4 milyar'dan fazla ruminant hayvanın temel enerji kaynağını sağlar. Hücre duvarları kuru ağırlığın % 20-80'ini kapsar ve başlıca; selüloz, hemiselüloz, lignin, pektinden oluşur. Rumen mikroorganizmaları tarafından sindirilebilir hücre duvarları %30 ve %60 arasında değişir ve bireysel hücre çeşitlerinin sindirilebilirliği %0'dan %100'e kadar değişiklik gösterebilir (Susmel ve Stefanon, 1993; Wilson, 1994). Ayrıca hücre duvarının yapısında; su, iyonlar ve protein bulunur (Bacic ve ark., 1988; White ve ark., 1993a).

1.5.1. Selüloz

Selüloz yeryüzünde bulunan yüksek bitki hücre duvarları ve organik bileşiklerin temel bileşenidir (Whistler, 1997). Bitki biyokütlesinin yaklaşık % 40'ını oluşturan selüloz, yaklaşık 14.000 glikoz biriminin β -1,4- glikozidik bağlar ile doğrusal bir şekilde bağlanması ile oluşmuştur (Beguin, 1990) (Şekil 1.2).

Selüloz genellikle kristalin selüloz ve daha az miktarlarda şekilsiz (amorf) selüloz zincirleri formunda mevcuttur. Selülozun şekilsiz formu enzimatik parçalanmaya daha duyarlıdır (Pérez ve ark., 2002).

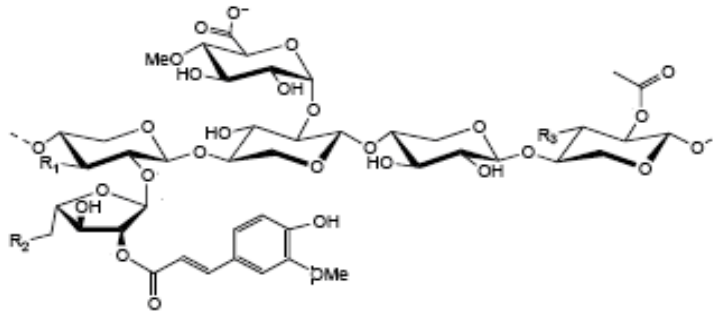
Selülozun bitki hücre duvarındaki oranı hücre tipine ve evresine göre değişmektedir. Örneğin; birincil duvarın kuru ağırlığının %20-40'ı selülozdan oluşurken, ikincil duvarın %40-60'ı selülozdan oluşur. Pamuk tohumunun ikincil duvarının %100'ü selülozdur. İkincil hücre duvarı mikrofibrilleri birincil hücre duvarının mikrofibrillerine göre daha yoğundur ve daha çok selüloz kristalleri içerir (Marchessault ve Sundararajan, 1983).



Şekil 1.2. Selülozu oluşturan sellobiyoz ve glikoz moleküllerinin yapısı (Beguin ve Aubert, 1994).

1.5.2. Ksilan

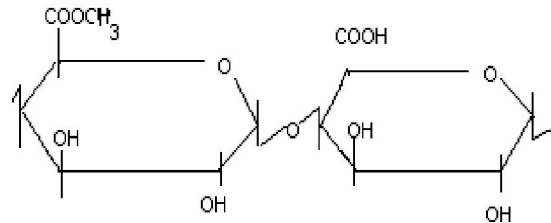
Ksilan, ana molekül zinciri glikozidik olarak bağlanmış 1–4 bağlı β -D-ksilopiranoz birimlerinden oluşmaktadır (Fengel ve Wegener, 1989) (Şekil 1.3). Yüksek bitkilerin hücre duvarının hemiselülozik kısmının temel bileşeni olan ksilan, yüksek potansiyelde kullanışlı son ürünlere parçalanabilen ve doğada en fazla bulunan ikinci kaynaktır (Christov ve ark., 1996; Gessesse, 1998). Pek çok bakteri ve fungus suşu ksilanı parçalayabilmek için ksilanaz enzimine gereksinim duyarlar (Gamerith ve ark., 1992; Gessesse ve Gashe, 1997).



Şekil 1.3. Ksilanın diyagramatik yapısı. Me, metil; R₁, OH ya da arabinofuranosil grubu; R₂, OH ya da ferulik asit; R₃, OH ya da asetil grubu (Shoham ve Shallom, 2003).

1.5.3. Pektin

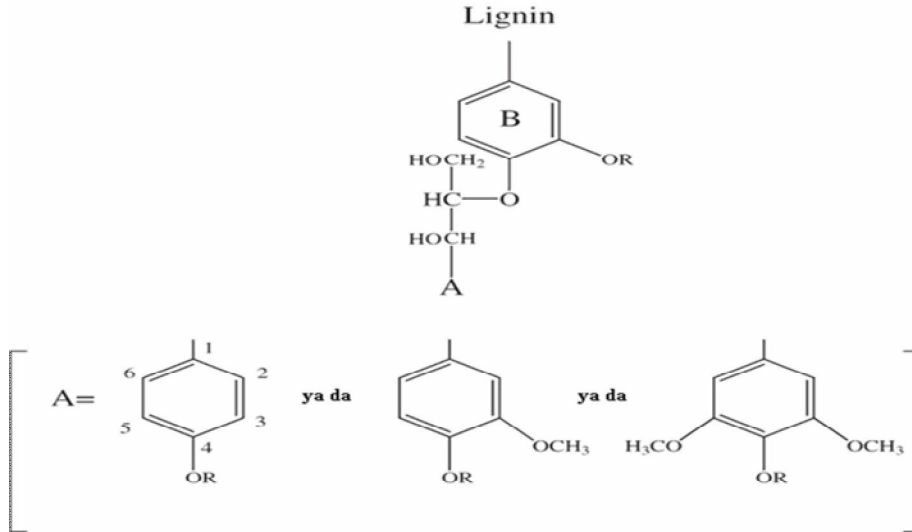
Pektinler genel olarak birbirlerine α -1,4-glikozidik bağlarla bağlanmış D-poligalakturonatlar ile asidik polisakkaritlerden meydana gelmişlerdir. Ana zincire α -1,2 bağlarıyla bağlanan L-ramnoz dalları polimere helikal bir yapı kazandırmaktadır (Nordkvist, 1987) (Şekil 1.4). Pektin yıkımı hemiselüloz ve lignin arasındaki bağların kırılması sonucu gerçekleşir ve bu biyolojik yıkımda anaerobik funguslar da görev alır.



Şekil 1.4. Pektin molekülünde tekrarlanan metilli ve metilsiz D-galakturonik asit birimleri (Romboutz ve Pilnik, 1980).

1.5.4. Lignin

Lignin odunlaşmış bitki hücrelerinin en önemli üçüncü kimyasal üyesidir. Amorf, heterojen, makro moleküler, polifenolik bir molekül yapısı göstermekte olup karbon-karbon ve eter bağlanmalarıyla değiştirilmiş fenolpropanların dallanmış polimerleridir (Wegener ve Fengel, 1983; Goring, 1989; Majjala, 2000) (Şekil 1.5). Lignin molekülü p-hidroksizimtalkol: *trans*-p-kumaralkol, *trans*-koniferilalkol ve *trans*-sinapinalkol olmak üzere üç monomer yapıtaşından oluşmaktadır (Sarkanen ve Ludwig, 1971).



Şekil 1.5. Ligninin diyagramatik yapısı. A= *p*- Hidroksifenil, guyasil ya da siringil olabilir (Rutherford ve ark. 2005).

1.6. Anaerobik Fungusların Bitki Hücre Duvarını Yıkımı

Rumen, bitki hücre duvarı ve bileşenlerinin (sellüloz, hemiselüloz ve lignin) kullanılabilir enerjiye dönüştürebildiği en iyi ekosistemlerden biridir (Heath, 1988). Hücre duvarlarının yıkımından büyük oranda rumen mikroorganizmaları sorumludur. Mikroorganizmalar rumende, sindirim içeriğinin likit fazında katı parçalarla birlikte bulunur ve rumen epitel hücrelerinin üzerini tıpkı astar gibi kaplarlar (Hungate 1966).

Orpin (1977), rumen funguslarının lif sindiriminde önemli rolleri olduğunu rapor etmiştir. Ancak rumen funguslarının ruminant sindirimindeki bilgisi henüz tamamlanmamıştır. Bu organizmaların genel karakteristikleri hücre duvarlarında yüksek lignin içeren bölgelerde büyük ölçüde kolonize olma yetenekleri ve lignoselülitik enzim sistemlerine sahip olmalarıdır (Akin ve Borneman, 1990).

Bitki polisakkaritlerinin rumendeki enzimatik yıkımı bakteri, fungus ve protozoanlar tarafından üretilen polisakkaridaz ve glukozid hidrolaz enzim gruplarının, polisakkaritlerin yıkımı için üretilmesiyle gerçekleşmektedir. (Williams 1988). Rumende, bitki polisakkaritleri bakteri ve fungusların ekstraselüler enzim kompleksleri ile yıkılmakta ve böylece oligosakkaritler oluşturulmaktadır (Hoover ve Stokes 1991).

Anaerobik funguslar bitki hücre duvarını parçalayarak ve takip eden fermentasyonda önemli etkilerinin bulunmasıyla rumen metabolizmasına katkı sağlarlar. Rumen fungusları

oluşturdukları rizoidler veya rizomiselyalar ile bitki hücre duvarının içine nüfuz ederek hem fiziksel hem de enzimatik olarak hücre duvarını parçalarlar (Borneman ve ark., 1993).

Anaerobik fungusların çoğu kez lignifiye sklerenkima ve vasküler dokular gibi yüksek fenolik içeriğe sahip bitki materyallerini kolonize ettikleri bildirilmiştir (Borneman ve ark., 1991,1992).

1.7. Anaerobik Fungusların Fibrolitik Enzimleri

Rumen fungusları ekosistemde kapsamlı şekilde kolonize olarak fibrolitik bakteri ve protozoanlara göre hızlı yayılabilir ve hayatta kalabilirler. Bu onların diğer rumen mikroorganizmalarının normalde ulaşamadığı bitki dokularına nüfuz etme ve sindirme yetenekleriyle ilgili olabilir. Rumen fungusları bitki liflerinin özellikle damarlı bitki fragmentlerinin birincil istilacılarıdır (Bauchop, 1981) ve bakterilere göre daha fazla bitki dokusuna ulaşabilirler (Theodorou ve ark., 1988).

Zorunlu anaerobik funguslar herbivor hayvanların rumen ve sindirim sistemlerinin diğer kısımlarında da bulunmuş ve lif sindiriminde gerekli çeşitli enzimlerin varlığı onların bu sindirimde aktif ve pozitif rol oynadıklarının kanıtı olarak gösterilmiştir (Williams ve Orpin 1987a; Paul ve Kamra 2003).

Anaerobik funguslar bitki hücre duvarını parçalayan, son derece etkin ve çok çeşitli enzimler üretirler (Pearce ve Bauchop., 1985). Bu enzimler yüksek lifli diyetle beslenen hayvanların rumeninde çok miktarda bulunurlar (Grenet ve Barry ., 1988). Ayrıca rumen fungusları çok sayıda hidrolitik enzimler ve basit şekerlerden kompleks polimerlere kadar değişen kullanılabilir karbon kaynakları üretirler. Hem örnek hemde doğal substratlara (selüloz, ksilan, pektin, sellobiyoz, likenan) karşı selüloolitik, ksilanolitik, glikolitik, amilolitik ve proteolitik enzim aktivitelerine sahip oldukları ispat edilmiştir (Pearce ve Bauchop, 1985; Mountfort ve Asher, 1989; Wallace ve Joblin, 1985; Wood ve ark., 1986; Lowe ve ark., 1987c, Williams ve Orpin 1987b).

Selüloz ve ksilanın monosakkaritlere parçalanması esansiyel iki enzim kompleksi olan önem sırasına göre selülaz ve ksilanazla başarılmıştır (Li ve Heath, 1993). Selüloz ya da hemiselüloza (çoğunlukla ksilan) karşı bu enzimlerin tüm aktiviteleri ruminal funguslarda bulunmuştur. (Akin ve Rigsby, 1987; Akin ve ark. 1990; Barichievich ve Calza, 1990; Hebraud ve Fevre, 1990). Selülozun parçalanması için gerekli enzimler fungal hücre duvarında yer alan büyük enzim kompleksleriyle ilişkili gibi görünmektedir ve kristal selülozu parçalayabilmeleri için bu ilişkinin zorunlu olduğu düşünülebilir (Wilson ve Wood, 1992). Sindirim enzimlerinin zoosporlarda, vejetatif devrede ve kültür süpernatantlarında da aktif olabileceği saptanmıştır (Williams ve Orpin, 1987a).

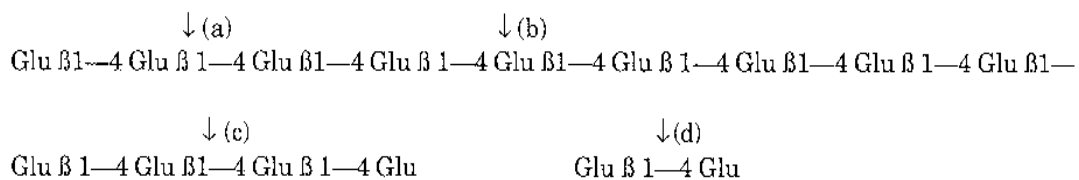
1.7.1. Selülaz

Selülaz enzim sistemleri, oligo ve/veya polisakkaritleri parçalayan glukozid hidrolaz enzim ailesinin üyeleridirler. Bütün selülazlar kimyasal olarak basit yapıdaki bir substratta tek bir bağı parçalarlar, β -1,4 glukozidik bağların hidrolizinden sorumludurlar. Selülozun yapısını oluşturan glukoz molekülleri arasındaki kapsamlı bağlanma deseni özellikle mikrobiyal parçalanmaya dirençli kristal bir yapı oluşturmaktadır (Ünay ve ark., 2008).

Selülozun rumende sindirimi bakteri, protozoa ve fungusları kapsayan yoğun bir mikrobiyal populasyon tarafından üstlenilmiştir. (Heath, 1988).

Anaerobik funguslar selülozun parçalanması için gerekli olan en az üç adet enzim olan endo-1,4- β -glukanaz (EC 3.2.1.4), ekzo-1,4- β -glukanaz (sellobiyohidrolaz EC 3.2.1.91) ve β -glukosidaz (EC 3.2.1.21) üretmektedirler. *N. frontalis*, *Piromyces* sp., *Caecomyces* sp., ve *Orpinomyces* sp. kültür ortamına yüksek düzeylerde endo-1,4- β -glukanaz (KMSaz) salgılamaktadırlar (Wood ve ark., 1986; Williams ve Orpin, 1987a; Borneman ve ark., 1989).

Endoglukanazlar (ya da endo-1,4- β -glukanaz), selüloz polimerinin orta kısmından (genelde amorf bölgeden) saldırır ve parçalarlar. Son ürün sellobiyozdur. Ekzoglukanaz selüloz polimerini bütün halinde veya endoglukanazlar tarafından parçalanan bölgelerdeki ara ürünlerin uçlarından parçalamaya başlarlar. Bunlarında son ürünleri sellobiyozdur. β -glukosidaz ise ara ürün olan sellobiyozları glukozaya kadar parçalar. (Lynd ve ark. 2002). Sellodekstrinaz ise sellodekstrini sellobiyozaya parçalar (Wood, 1989) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Selülozun yapısı ve selülozu parçalayan enzimlerin etki ettiği bölgeler. (a) ekzo-1,4- β glukanaaz (sellobiyohidrolaz), (b) endo-1,4- β glukanaaz, (c) sellodekstrinaz, (d) 1,4- β glikosidaz (Flint, 1993).

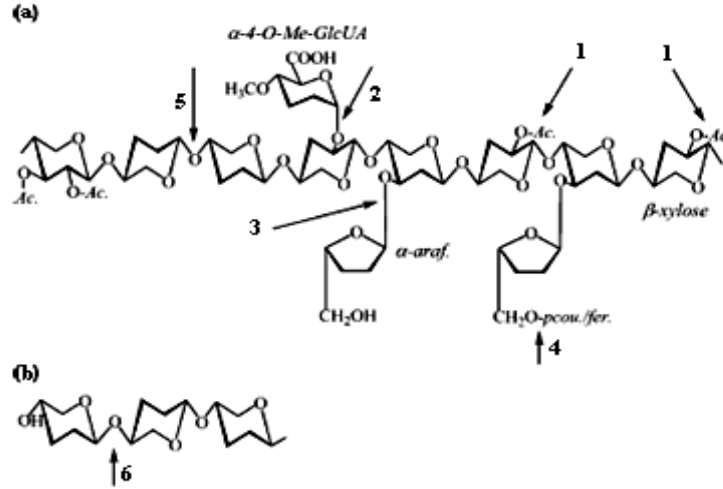
1.7.2. Ksilanaz

Ksilanların yıkımı için, endo 1,4- β -D-ksilanaz (EC 3.2.1.8), ve β -ksilosidaz (EC 3.2.1.37) enzimleri ksilan tipine bağılı olmak kaydıyla ana şeker zincirine etki ederler. (Orpin ve Letcher, 1979). Yan grupların yıkılması için gerekli olan enzimler ise α -D-glukuronidaz (EC 3.2.1.139), asetil ksilan esteraz (EC 3.1.1.72) α -L-arabinofuranosidaz (EC 3.2.1.55), ferulik asit esteraz (EC 3.1.1.73) ve p-kumarik asit (EC 3.1.1.-)'tir (Collins ve ark 2005) (Şekil 1.7).

Ksilanaz bir dizi ruminal bakteri de tanımlanmıştır (Pettipher ve Latham, 1979). Ayrıca ruminal protozoanların da ksilanolitik aktivite etkinliğine sahip oldukları gösterilmiştir (Prins, 1977). Uzun bir zaman, rumende bu organizmalar ksilanın en önemli parçalayıcıları olarak düşünülmüş ancak anaerobik fungusların rumende keşifleriyle ve yüksek lifli diyetle beslenen ruminantların rumenin de fungusların sayılarının fazlalığı onların ksilanolitik aktivilerinin etkin olma olasılığını düşündürmüştür (Bauchop, 1979).

Enzimin varlığı birkaç ruminal fungusta gösterilmiştir. *N. frontalis*, ksilanaz enzimini çoğunlukla kültür ortamına salgılamaktadır ve sadece küçük bir miktarının (<%10) fungal rizoidler ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Mountfort ve Asher, 1989). Ancak bazı çalışmalar

göstermiştir ki bazı anaerobik fungusların ksilanazlarının önemli miktarları rizoidleriyle ilişkilidir (Lowe ve ark., 1987c).



Şekil 1.7. Ksilanın yapısı ve ksilani parçalayan enzimlerin etki ettiği bölgeler. Ac: asetil grup; α-araf: α-arabinofuranoz; α-4-O-Me-GlcUA: α-4-O-metilglukuronik asit; pcou: p-kumarik asit; fer: ferulik asit. 1: asetil ksilan esteraz; 2: α-D-glukuronidaz; 3: α-L-arabinofuranosidaz; 4: p-kumarik asit ya da ferulik asit esteraz; 5: endo-β-1,4-ksilanaz (a). 6: β-D-ksilosidaz (b) (Sunna ve Antranikian 1997).

1.7.3. Pektinaz

Pektin, yüksek bitkilerde bulunan, D-galakturonik asit üniteleri ve metoksil gruplarını oluşturmak için α-1,4 bağlanmasıyla oluşan uzun zincirli bir dizi polisakkarittir (Maraş ve ark. 2004). Buğday samanında bulunan pektinin anaerobik funguslar tarafından parçalanma miktarının %20-40'dan daha az olduğu bildirilmiştir (Orpin 1984). Anaerobik funguslar tarafından tek karbonun kaynağı olarak hem pektin hem de alt ürünleri olan D-galakturonik asit ve poligalakturonik asidin, fermente edilemediği belirtilmiştir (Phillips ve Gordon 1988).

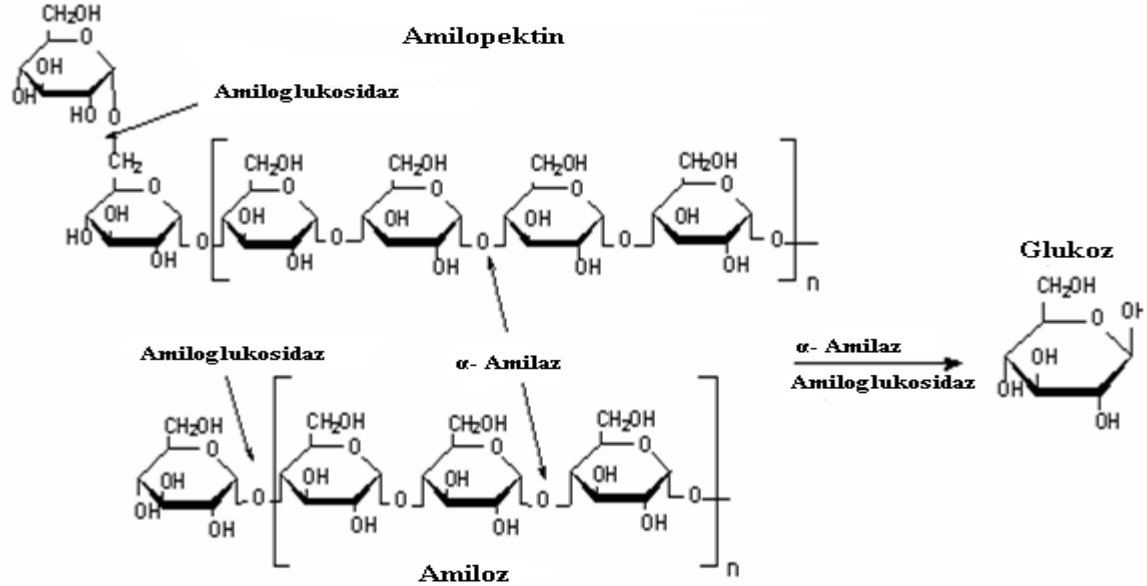
Anaerobik fungusların, büyümek için pektin yıkımı sonrası oluşan ürünleri kullanma yeteneğinin olmadığı bilinse de pektini parçalayabildiği, ayrıca pektinin lignin ve hemiselüloz ile eter ve ester bağları yapısında olabildiği ve ligninin hemiselüloza bağlanmasında önemli bir rol oynayabildiği rapor edilmiştir (Jeffries 1990).

1.7.4. Amilaz

Sanayi başta olmak üzere, nişastanın farklı şekerlere dönüşümünde kullanılan amilolitik enzimler ile ilgili pekçok çalışma yapılmıştır (Fogarty ve Kelly, 1980). α-amilaz enzimi (1-4-α-glukan glukanhidrolaz [EC 3.2.1.1]) nişastada bulunan α-1,4 bağlarını hidrolize ederek onu glukoz, maltoz ve dallanmış oligosakkaritlere parçalar (Strayer, 1981; Özcan ve Uyarlar, 1996) (Şekil 1.8).

N. frontalis α-amilaz enzimini çoğunlukla kültür ortamına bırakmaktadır ve %20'den az bir miktarı fungal rizoidlerle ilişkilidir. Yapılan analiz sonuçlarına göre *N. frontalis*'in α-amilaz enzimi son ürün olarak maltoz, maltotrioz, maltotetroz, maltopentoz uzun zincirli

oligosakkaritler meydana getirmiştir. Analizlerde glikoz görülmemiştir. Maltoz enzim üretiminde nişasta gibi etkili olurken, selüloz, sellobiyoz, ksiloz ve ksilan varlığında nispeten daha düşük enzim aktivitesi görülmüştür (Mountfort ve Asher, 1988).



Şekil 1.8. Nişastanın temel yapı polimerleri amiloz ve amilopektinin glukoza kadar parçalanması (Anonim 2009).

1.7.5. Ligninin parçalanması

Ruminal funguslar tercihen lignoselülozik dokuları kolonize eder ve bitki hücre duvarının en önemli yapısal karbonhidratlarını sindirebilecek yetenekteki ekstraselüler enzimler üretirler (Fonty ve Joblin 1991). Bununla birlikte onların ligninin degradasyonundaki rolleri tam olarak bilinmemektedir (Scalbert ve ark 1985). Rumen fungusları lignini çözebildiklerinde ligninde bulunan intermonomer bağları ya da bir karbon kaynağı gibi lignini kullanabildikleri ile ilgili delil bulunamamıştır (Lam ve ark. 1992).

Rumen fungusları lignin ve hemiselüloz kompleksinden *p*-kumaril ve feruloyl yan bağlarının kırılmasında rol oynayan extrasellüler feruloyl ve *p*-kumaril esteraz üretirler (Borneman ve ark 1990). Ancak, anaerobik fungusların ürettiği enzimlerin lignin parçalama yeteneği olmadığı belirtilmiştir (Theodorou ve ark. 1989).

N. patriciarum'un ligninin C-C ve C-O-C intermonomer bağlarını kıramadığı görülmüştür (McSweeney ve ark. 1994). Çünkü lignin yıkımı moleküler oksijen gerektirir (Kivaisi ve ark. 1990).

1.7.6. Proteaz

Rumen funguslarının proteazlarının büyümek için amino asit sağlamak, bitki materyalinin içine girmeye yardım etmek ya da diğer ekstraselüler enzimlerin aktiviteleri üzerine değişiklik yaptığı bildirilmiştir. Tek ya da bakteri ile ilişkili anaerobik fungal proteazın, rumendeki besinsel proteinlerin yıkımına dikkat çekici katkıda bulunduğu ileri

sürülmüştür (Wallace ve Joblin 1985). *Neocallimastix* spp.'nin proteolitik aktivitesinin *Piromyces* spp.'den daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Asao ve ark., 1993).

1.8. Bitkisel Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar, oda sıcaklığında sıvı halde olup, kolay kristalleşebilen, kuvvetli kokulu, uçucu, su buharı ile sürüklenebilen yağimsı karışımlardır. Bu maddeler açıkta bırakıldıklarında oda sıcaklığında bile buharlaşabildiklerinden ‘uçucu yağ’ ya da ‘eterik yağ’ olarak adlandırılır. Birçok bitkinin karakteristik kokusu içerdiği bu yağlardan kaynaklanır (Ceylan, 1996).

Bitkiler, büyümelerinde ve gelişimlerinde doğrudan fonksiyonu yok gibi görünen ikincil metabolitlerden türemiş bileşiklerin geniş varyetelerini üretirler (Balandrin ve Klocke, 1985). Yıllar boyunca bu maddeler birincil metabolitlerin atık ürünleri olarak değerlendirilmiştir. Ancak onlar bitkilerin ve baharatların koku ve renklerinden sorumludur, bitkiyle onun çevresi arasında kimyasal habercileri gibi önemli ekolojik fonksiyonlara sahiptir ve çoğu kez çeşitli bakteri, maya ve küflere karşı antimikrobiyal aktivite sergilemektedirler (Gershenzon ve Croteau, 1991).

İkincil metabolitlerin sentezlerinin metabolik yolları, özellikleri ve hareket mekanizmalarının sık sık örtüşmesi sebebiyle aralarındaki farklılıkların tespit edilmesi de zorlaşmaktadır. Ancak bu metabolitler genellikle yapısal olarak 3 grup içinde incelenebilir; saponinler, taninler ve esansiyel (uçucu) yağlar. (Cheeke, 1999; Min ve ark., 2003; Piacente ve ark., 2005).

Sıcak iklim bölgelerinde yetişen çok sayıda bitki daha fazla uçucu yağ verir. Diğer iklim bölgelerinde de uçucu yağlı bitkiler bulunur; ancak, bitki çeşidi ve uçucu yağ miktarı daha azdır. Labiatae, Umbelliferae, Myrtaceae, Lauraceae, Zingiberaceae, Compositae, Pinaceae gibi familyalar uçucu yağ veren bitkilerce zengindir. Bazı bitkilerde uçucu yağ reçine, zamk veya reçine ve zamkla birlikte bulunabilir (Akgül, 1993).

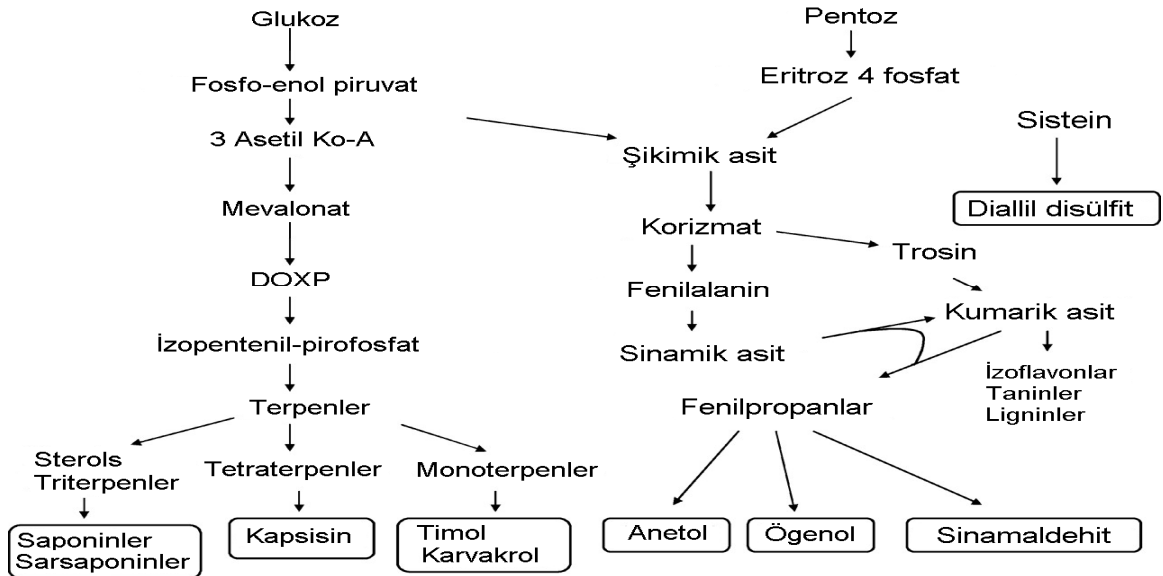
Uçucu yağ; bitkinin bütününde (çam ve bazı Umbelliferae’lar), taç yaprakta (gül), ağaç kabuğunda (tarçın), çiçek tomurcuğunda (karanfil), stigmada (safran), meyve kabuğunda (portakal), yaprakta (defne), meyvede (yenibahar), tohumda (hardal), kökte (melekotu), rizomda (zencefil), soğanda (sarımsak) oluşabilir. Bazı bitkilerde birden fazla organ uçucu yağ taşır (yabankerevizi, rezene, turunç gibi). Uçucu yağın oluştuğu özel salgı cebi, kanalı, hücresi veya tüyü ya da parankima hücreleri bulunmaktadır. Bu, familya, bitki ve organa göre değişir (Akgül, 1993).

1.8.1. Uçucu Yağların Kökeni ve Sınıflandırılması

Uçucu (esansiyel) yağlar, buhar distilasyonu yoluyla bitki uçucu kısımlarından elde edilen ikincil metabolitlerin karışımlarıdır (Gershenzon ve Croteau ., 1991). “Essential” terimi anlamını koku yada tat manasına gelen “essence” kelimesinden alır ve bu maddeler çoğu bitki için spesifik tat ve koku sağlayan özelliklerle bağlantılıdır. Çok çeşitli kompozisyon, tabiat ve aktivite ile karakterize edilirler (Calsamiglia ve ark., 2006).

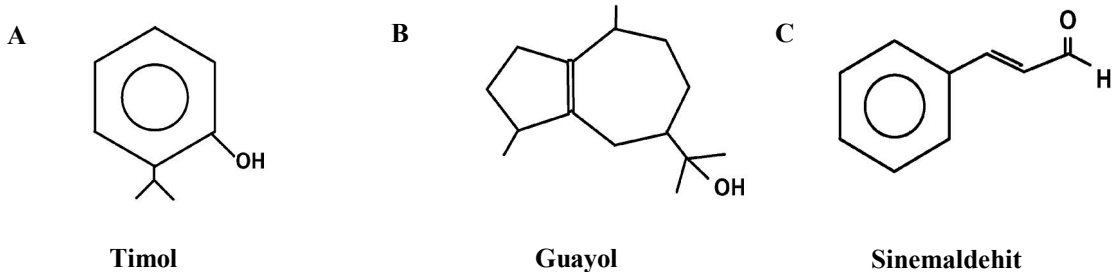
Kimyasal olarak uçucu yağlar; terpenoidlerin değişken karışımları, özellikle monoterpenler (C_{10}) ve sesquiterpenler (C_{15}) bazen de diterpenler (C_{20}) ve çeşitli düşük moleküler ağırlığa sahip alifatik hidrokarbonlar (doğrusal, dallanmış, doymuş ve doymamış), asitler, alkoller, aldehytler, asiklik ester ya da laktonlar ve bazen nitrojen ve sülfür içeren bileşenler, kumarinler ve fenilpropanoidlerin homologlarından oluşurlar. (Dorman ve Deans, 2000).

En önemli aktif bileşenler ise 2 kimyasal grup içindedir. Bunlar: terpenoidler (monoterpenoidler ve sesquiterpenoidler) ve fenilpropanoidler (Calsamiglia ve ark., 2006) (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Başlıca bitki ekstraktlarının aktif bileşen biyosentezinin metabolik yolu (Gershenzon ve Croteau, 1991).

Terpenoidler, bitki ikincil metabolitlerinin çok sayıda, çeşitlendirilmiş gruplarıdır ve literatürlerde yaklaşık 15000 farklı bileşen tanımlanmıştır (Gershenzon ve Croteau, 1991). Bu bileşenler 5 karbonlu (C_5H_8) ana yapıdan türetilerek karakterize edilmişlerdir. Genellikle 1 izopren birim olarak adlandırılmış ve bu üniteler iskelet numarasına bağlı olarak sınıflandırılmıştır. Bitkilerde bulunan uçucu yağların en önemli bileşenleri (Şekil 1.9), terpenoidler içinde yeralan monoterpenoid ve sesquiterpenoid familyasına aittir (Gershenzon ve Croteau, 1991).



Şekil 1.9. Başlıca uçucu yağ bileşenleri: Monoterpenoid (A), sesquiterpenoid (B), ve fenilpropanoid (C) (Gershenzon ve Croteau, 1991).

Fenilpropanoidler, uçucu yağların en yaygın bileşenlerinden değildir, ancak bazı bitkilerde önemli oranlarda bulunurlar. Fenilpropanoide ait bileşikler 6 karbonlu aromatik bir halkaya bağlı 3 karbonlu bir zincirden oluşur (Sangwan ve ark., 2001).

1.8.2. Uçucu Yağların Biyolojik Özellikleri ve Hareket Mekanizmaları

Uçucu yağlar, bazı tümörler, enflamatuar süreçleri, serbest radikallerin tahrip edici ve kontrolsüz çoğalması ve kardiovasküler hastalıklarda dahil olmak üzere pek çok hastalığın tedavisinde olumlu etkilere sahiptir (Harborne ve Williams, 2000; Reddy ve ark., 2003; Trouillas ve ark., 2003). Bu özellikler serbest radikalleri uzaklaştırma, membran lipidlerin peroksidasyonunu (yağların oksijenle yükseltgenmesi sonucu bozulması) engelleme, şelat metaller ve antioksidan enzim aktivitesini teşvik etme yetenekleriyle bağlantılıdır (Gutierrez ve ark., 2003; Lee ve ark., 2003).

Bununla birlikte bu bileşiklerin en önemli aktiviteleri antiseptik ve antimikrobiyal etkileridir. Antik çağlardan beri pek çok bitkinin antiseptik özelliğe sahip olduğu biliniyordu. Bitkilerin kullanımı 5000 yıl önce tıbbi terapilerde Çinlilerle başlamış ve yine M.Ö. 1550'de Mısırlılar yiyecekleri koruyucu ve mumyalama törenlerinde bitkileri kullanmışlardır (Davidson ve Naidu., 2000).

Yine de bitkilerin antimikrobiyal özelliklerini kanıtlayan ilk bilimsel deliller 20.yy'ın başlangıcına kadar ortaya çıkmamıştır (Hoffmann ve Evans ., 1911). O zamandan buyana pek çok uçucu yağın bileşenleri ile güçlü antimikrobiyal aktiviteleri üzerinde çalışılmıştır (Burt, 2004)

1.8.3. Uçucu Yağların Antimikrobiyal Etkileri

Bitkilerin antimikrobiyal etkilerinin, çoğunlukla içerdikleri etkili maddelerden ileri geldiği saptanmıştır (Conner ve Beuchat, 1984; Farag ve ark., 1989). Etkili maddeyi oluşturan bileşiklerin miktarı bitkiden bitkiye değişiklik gösterir. Ayrıca bu bileşiklerin etkinlikleri ise, bitkinin yetiştiği yer, iklim koşulları ve mikroorganizma türlerine bağlı olarak da değişmektedir (Thompson ve Cannon, 1987).

Uçucu yağların gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerde dahil olmak üzere birçok mikroorganizma üzerinde antimikrobiyal etkileri mevcuttur. Uçucu yağların bu antimikrobiyal etkileri içerdikleri bir dizi terpenoid ve fenolik bileşiklere (Panizzi ve ark., 1993; Helander ve ark., 1998; Chao ve ark., 2000), ilaveten uçucu yağlardaki kimyasal bileşenler ve fonksiyonel grupların oranları ve birbirleriyle olan etkileşimleriyle de ilişkilendirilmektedir (Dorman ve Deans, 2000).

Kekik uçucu yağının etken maddesi olan timol fenolik yapıli bir bileşiktir ve fenolik yapıda hidroksil gruplarının varlığı nedeniyle diğ er non-fenolik sekonder bitki metabolitlerine oranla daha fazla miktarda antimikrobiyal etkilidir (Helander ve ark., 1998; Ultee ve ark., 2002). Ayrıca timolün moleküler ağırlığının düşük olması eksternal duvar gözenekleri yoluyla hücre membranlarına erişime olanak sağlar. Ayrıca gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı güçlü ve geniş spektrumlu aktivite, uygun ve toksik doz arasında dar güvenlik sınırı ve etkilerin her zaman istenen yönde olmadığı da rapor edilmiştir (Castillejos ve ark., 2006).

Aeromonas sobria, *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus* türleri arıç uçu u yağının etken maddeleri olan kadinen ve pinene karşı duyarlı patojen mikroorganizmalardır (Hammer ve ark., 1999).

1.8.4. Uçu u Yağların Rumen Fermentasyonunda Kullanımı

Yapılan pek çok araştırma da ruminant hayvanlar ve rumen mikroorganizmaları arasında simbiyotik bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Konakçı hayvan yemlerin fermentasyonu için gıda ve optimal çevresel koşullar sağlarken mikroorganizmalar da lifleri parçalayarak ve mikrobiyal protein sentezleyerek hayvan için gerekli enerji ve proteini sağlarlar. Bununla birlikte bu simbiyotik ilişki özellikle metanojenik mikroorganizmalar için verimsiz enerji (metan kaybı) ve proteine (N amonyak kaybı) sahiptir (Van Nevel ve Demeyer., 1988). Bu kayıplar sadece üretim performansını düşürmez, aynı zamanda çevreyi kirleten maddelerinde serbest kalmasına katkıda bulunur (Tamminga, 1996).

Ruminant beslemeciler, rumendeki enerji ve protein kullanımının verimliliğini geliştirmek amacı ile uzun zamandır farklı mikrobiyal populasyonlar arasındaki rekabeti merakla izlemişlerdir. Bu verimlilik diyet formülasyonlarının optimizasyonu ve kullanılan yem katkılarının rumendeki ortamı değiştirip belirli mikroorganizmaları inhibe etmesi ya da arttırmasıyla başarılmıştır (Calsamiglia ve ark., 2006).

Amino asitlerden amonyak üretiminin inhibisyonu uçu u yağların temel etki mekanizmasıdır. Bu etki ise uçu u yağların yüksek oranda amonyak üreten (YOAÜ) bakteriler üzerine etkileri aracılığıyla olmuştur. YOAÜ bakterilerinin amino asitlerden amonyak meydana getirme yetenekleri yüksektir. Bu bakteriler rumen bakteriyal populasyonunun sadece %1'ini oluşturur ancak amonyak üretim oranında küçük bir azalma bile besleme açısından yararlı olabilir (Molero, 2004; Wallace ve ark., 2002).

Antibiyotik iyonoforları rumendeki enerji ve protein kaybını azaltmada çok başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Van Nevel ve Deyemer, 1988). Ancak hayvan beslemede, bakterilerde direncin artması ve ürünlerde kalıntıya neden olmasından dolayı antibiyotik kullanımının sosyal çevrelerce kabulü azalması sonucu, Avrupa Birliğince Ocak 2006'dan itibaren kullanımları yasaklanmıştır (Talimat 1831/2003/CEE Avrupa Komisyonu, 2003).

Ülkemizde de karma yemlere ilave edilen büyümeyi artırıcı maddelerden her türlü hormon ve hormon benzeri maddeler ile antibiyotiklerin kullanımı yasaklanmış, kullanımına izin verilen hariç antioksidantlar ve ilaç niteliğinde olan diğer maddelerin kullanımı da yasaklanmıştır (Anonim, 2005).

Bu sebeplerden dolayı bilim adamları mayalar, organik asitler, bitki ekstraktları, probiyotikler ve antikorların kullanımını içeren diğer alternatifleri değerlendirerek rumen fermentasyonunu modüle etmeye yönelik çalışmalara yoğunlaşmışlardır (Calsamiglia ve ark., 2006).

1.9. Çalışmanın Önemi ve Kapsamı

Antibiyotiklerin hayvansal gıdalarda kalıntı bırakması ve patojen mikroorganizmaların direnç kazanması gibi sebeplerle kullanımın yasaklanması üzerine yemlere katılmak üzere hem doğal hemde antimikrobiyal özellikleri nedeniyle bitkisel uçucu yağların antibiyotikler yerine kullanımı gündeme gelmiştir.

Uçucu yağlarla yapılan çalışmalar bu yağların antimikrobiyal özellikleri nedeniyle genelde patojen mikroorganizmalar üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak uçucu yağların yararlı mikroorganizmalar açısından etkileri üzerine yapılan çalışmalar sınırlı kalmıştır. Bu amaçla ruminantların sindirim sisteminde yaşayan ve ürettikleri enzimlerle biyoteknolojik uygulamalarda yüksek öneme sahip anaerobik rumen funguslarının yaşamları ve bazı fibrolitik enzimleri üzerine uçucu yağların etkisi çalışılmıştır. Çalışmanın bu konuda yapılan ilk çalışmalardan biri olması sebebiyle de ayrı bir önemi vardır.

Bu kapsamda tez boyunca gerçekleştirilen çalışma aşağıdaki gibidir;

Anaerobik fungus besi ortamlarında yetiştirilen ve BİGEM anaerobik kültür koleksiyonundan sağlanan *Neocallimastix* sp. (GMLF2) ve *Orpinomyces* sp. (GMLF18)'in farklı konsantrasyonlarda (0.01, 0.1, 0.5 ve 1 mg/ml) uçucu yağ eklenmiş besiyerlerinde hangi konsantrasyona kadar yaşayabilecekleri ve enzim üretimlerinin ne şekilde etkileneceğini belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla bitkisel uçucu yağların anaerobik fungusların üremeleri ve bu fungusların önemli fibrolitik enzimlerinden olan ksilanaz ve karboksimetilselülaz (KMSaz)'ın toplam ve spesifik aktiviteleri üzerine etkisi incelenmiş, ayrıca fungusların ürettikleri protein miktarları da yapılan protein analizi ile belirlenmiştir. Tüm enzim aktiviteleri iki paralel, üç tekerrür şeklinde çalışılmış ve tez kapsamında yaklaşık olarak 1530 veri değerlendirilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Rumen Funguslarının Sahip Olduğu Enzimler Üzerine Yapılan Bazı Çalışmalar

Wood ve ark. (1986), *N. frontalis* kültüründen elde edilen enzim ekstraktının pamuk fibrillerini 72 saat içerisinde % 16 oranında parçalayabildiğini, ayrıca rumen metanojenleri ile birlikte kültüre alındığında ise bu karışık kültürün aynı süre içinde pamuk fibrillerini %98 oranında parçaladığını bildirmişlerdir. Anaerobik fungus ve rumen metanojen karışık kültüründen elde edilen selüloz aktivitesinin, en aktif selüloz kaynağı olarak bilinen *Trichoderma reesei* C-30 suşunun ürettiği selülozdan çok daha yüksek aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Akin ve Rigsby (1987), aslında fungusların sklerenkimayı sindiren ve bitki dokusunu zayıflatan selüloolitik bakterilerden daha yetenekli olduklarını ve tek başlarına bitki hücre duvarının tümünü sindirebileceklerini ileri sürmüşlerdir.

Lowe ve ark. (1987a), *Neocallimastix* sp. R1 suşunun, KMSaz, sellobiaz ve ksilanaz enzimlerinin optimum pH'larının sırasıyla; 6.0, 5.5, ve 6.0 olduğunu, enzimler için optimum sıcaklığın ise 50°C olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca buğday samanında büyütülen fungusun kolonizasyonu sonucu bitki dokusu kuru madde kaybının en az %43 ile %58 arasında olduğunu rapor etmişlerdir.

Rumen funguslarının sahip olduğu selüloz enziminin optimum pH ve sıcaklık isteği sırasıyla 5.0–6.0 ve 45–55°C'dir, ve karboksimetilselüloz, sellobiyaz ve aviselaz aktivitelerini içerdikleri belirtilmiştir. Selüloz üretimi karışık kültürlerde daima hemiselüloz ve diğer glikosidaz enzimleriyle birlikte üretilir (Williams ve Orpin, 1987a, 1987b ; Lowe ve ark., 1987c).

Mountfort ve Asher (1988), ruminal anaerobik fungus *Neocallimastix frontalis*'in α -amilaz üretimini incelemişlerdir. Fungusun enzimi çoğunlukla kültür sıvısına bıraktığını, enzimin optimum sıcaklık ve pH isteğinin sırasıyla 55°C ve 5.5 olduğunu ve nişasta için Km değerinin 0,8 mg/ml olduğunu bildirmişlerdir.

Heath, (1988) rumenin bitki hücre duvarları ve bileşenlerinin (selüloz, hemiselüloz, lignin) kullanılabilir enerjiye dönüşümü için en verimli ekosistemlerden biri olduğunu, selülozun rumende sindiriminin, bakteri, protozoa ve fungusları içeren yoğun bir mikrobiyal popülasyon tarafından üstlenildiğini rapor etmişlerdir.

Gordon ve Phillips (1989), karbon kaynağı olarak ince öğütülmüş buğday samanı içeren anaerobik sıvı ortamda 10 gün boyunca inkübe ettikleri *Neocallimastix* sp. LM-1, *Piromonas* sp. (*Piromyces*) SM-1, ve *Sphaeromonas* sp. (*Caecomyces*) NM-1 izolatlarının ekstraselüler glukosidaz, KM-selüloz, β -ksilosidaz, ve ksilanaz aktivitelerini incelemişler ve enzim aktivitelerinin 5–7. günde en yüksek seviyeye ulaştığını bildirmişlerdir.

Mountfort ve Asher (1989), rumen funguslarının sahip olduğu diğer bir enzim olan ksilanazın esasen ekstraselüler ya da kısmen hücre bağlantılı olarak salgılanabildiğini ve enzimin optimum pH'sının 5.5–6.0 arası, optimum sıcaklığının ise 50 °C olduğunu bildirmişlerdir.

Borneman ve ark. (1992), lignoselüloz sindiriminde hemiselülozdan ligninin ayrılması için anaerobik funguslar tarafından önemli oranda üretilen esterazın kullanıldığını bildirmişlerdir.

Rezaeian ve ark. (2005), in-vitro da sodyum hidroksitle muamele edilmiş ve edilmemiş arpa samanında kültüre alınan rumen funguslarının fibrolitik enzim (selüloz ve ksilanaz) aktivitelerini incelemişlerdir. Fungusların büyüme, gelişme ve genel biyokütle değişiklikleri kitin assay ve elektron mikroskopi taraması yapılarak takip edilmiştir. İnkübasyon sonunda sodyum hidroksit ile muamele edilmiş samanda kuru madde kaybı %38, edilmemiş ise %35 bulunmuştur. Kitin assay ile belirlenen fungal biyokütle muamele edilmiş kültürde önemli ölçüde yüksek çıkmıştır. Selüloz ve hemiselüloz degradasyonu da muamele edilmiş kültürde daha fazla bulunmuştur.

Ekinci ve ark., (2006)'ın yaptığı çalışmada rumen fungusu *Neocallimastix hurleyensis* farklı 3 enerji kaynağı üzerinde yetiştirilerek uzun süreli adaptasyonu incelenmiştir. Fungusun avisel, ksilan ve glikoz üzerinde 31 alt kültüre kadar yetiştirilmiş ve fungusun hayatta kalabilmesi ve enzimatik aktivitesi gözlemlenmiştir. Sonuçta anaerobik fungusun bu enerji kaynaklarının her biri üzerinde yaşayabildiği ve *N. hurleyensis*'in ksilan üzerindeki 31'inci alt kültürden sonraki ksilanaz aktivitesinde ve avisel üzerindeki 31'nci alt kültürden sonraki aviselaz ve karboksimetilselüloz aktivitelerinde önemli miktarda artış olduğu gözlemlenmiştir. Ancak fungusun enerji kaynağı olarak glikoz içeren besi ortamı üzerindeki 31'nci alt kültürden sonraki ksilanaz, aviselaz ve karboksimetilselüloz aktivitelerinde önemli düzeyde düşüşler olduğunu bildirmişlerdir.

Çömlekçioğlu ve ark. (2008), karboksimetilselüloz (KMS), fibril selüloz, avisel ve buğday samanında canlılığını devam ettirebilen ruminal fungus *Neocallimastix* sp. GMLF7'yi izole etmişlerdir. Fungusun adı geçen karbon kaynaklarında karboksimetilselüloz (KMSaz) üretimini incelemişler ve KMS (73.75 U/ml), fibril selüloz (72.68 U/ml) ve avisel (70.03 U/ml)'de yüksek KMSaz aktivitesi elde etmişlerdir. Mikroorganizmanın büyüme sıcaklığı 39 °C iken, KMSaz aktivitesi için optimum sıcaklık 50 °C ve optimum pH 6.5 olmuştur. Ayrıca enzimin maksimum aktiviteye 50 °C'de 60-180dk'da ulaştığını bildirmişlerdir.

Çömlekçioğlu ve ark. (2009), genetik modifikasyonlar ile laktik asit bakterilerine fibrolitik özellik kazandırılması ve bu mikroorganizmaların silajlama esnasında inokulant olarak kullanılmasını sağlamak amacıyla yaptıkları çalışmalarında bitkisel materyalin sindirilebilirliğini artırabilmek için anaerobik rumen fungusu olan *Neocallimastix* sp. GMLF4'e ait ksilanaz genini izole ederek kısmi karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra ise bu geni, *Lactococcus lactis*'e ve *Streptococcus thermophilus*'a aktarmışlar ve rekombinant bakterilerin ksilanaz üretimlerini belirlemişlerdir.

Akyol ve ark. (2009), sığır dışkısından izole ettikleri anaerobik rumen fungusu *Neocallimastix* sp. GMLF2'den polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yoluyla ksilanaz kodlama genini taramışlar ve bu geni (*Xyn2A*) *Escherichia coli*'de klonlamışlardır. Enzim aktivitesi enzim analizi ile yürütülerek kültür ve hücresel aktivite hem fungal ksilanaz hem de klon ksilanaz (*Xyl2A*) için belirlenmiştir. Enzimin optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 6.5 ve 50°C bulunduğunu bildirmişlerdir. Enzim 20 dk'da 40°C ve 50°C'de sabittir. Fakat

en fazla aktivite kaybının 60°C'de 5 dk'lık inkübasyon zamanında olduğunu bildirmişlerdir. Fungusun ksilanazı çoğunlukla kültür ortamına bırakırken, klon ksilanaz aktivitesinin hücre ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir.

2.2. Antimikrobiyal Maddelerin Rumen Mikroorganizmaları ve Fermentasyonu Üzerine Etkileriyle İlgili Çalışmalar

Devendra ve Lewis (1974), yağ asitlerinin ruminal mikroorganizmaların büyümelerini ve metabolizmalarını engelleyebileceğini ve bitki fibrilleri üzerinde bir kılıf oluşturarak bakteriyel enzimlerin aktivitesini bloke edebileceğini bildirmişlerdir.

Orpin ve Letcher (1979), bazı doymamış yağ asitlerinin in vitroda *N. frontalis*'in gelişimini teşvik edici etkilerinin olduğunu bildirmişleridir.

Bergen ve Bates (1984), ruminantlarda iyonofor (monensin, lasalocid, narasin, salinomycin, laidlomycin vs.) kullanımı sonucu ruminal fermentasyondaki değişimleri, propiyonik asit oranında artma, metan üretiminde azalma, rumen N metabolizmasında iyileşme, protein parçalanabilirliği, aminoasit deaminasyonunda azalma, laktik asit üretiminde azalma, rumende köpük oluşumunda azalma ve ruminal düzensizliklerin önlenmesi olduğunu rapor etmişlerdir.

Makkar (1987), taninin karbonhidrat metabolizması ile ilgili enzimlerin (selüloz, amilaz, galaktosidaz) faaliyetlerini engellediğini bildirmiştir.

Russell ve Strobel (1989), antibiyotik iyonoforlarının rumendeki fermentasyon olayları üzerine önemli etkileri olduğunu ve iyonofor kullanımı sonucunda meydana gelen canlı ağırlık artışı ve yemden yararlanmadaki iyileşmelerin ruminal fermentasyondaki değişikliklere bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Ha ve ark. (2001), doymuş yağ asitleri olan kaprik, kaprilik ve stearik asitin farklı konsantrasyonlarının *N. frontalis* C5-1'in gelişimi ve enzim aktivitesi üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında; yüksek yağ asidi konsantrasyonlarında (% 0.1, w/v) selüloz sindiriminin ve polisakkarit fermentasyonunun düştüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca fungusun doymuş yağ asitlerine olan duyarlılığı sırasıyla kaprilik, kaprik ve stearik asite doğru azalmaktadır.

Barahona ve ark. (2005), kondense taninin anaerobik rumen fungusu *Neocalimastix hurleyensis*'in fibrolitik enzimleri üzerindeki etkisini incelenmişler ve 40 mg/ml kondense taninin karboksimetilselüloz aktivitesinin tamamını ve 5,5 mg/ml kondense taninin ksilenaz aktivitesinin yarısını durdurmaya yettiğini bildirmişlerdir.

Kuloğlu (2007), tanik asitin % 0,3'lük konsantrasyonda rumen bakterilerinin enzim aktivitesini azalttığını ve üremelerini engellediğini bildirmiştir.

2.3. Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

Deans ve Ritchie (1987), 50 farklı bitkinin uçucu yağının 25 patojen bakteri türüne karşı antibakteriyel özellikleri incelemişler ve çalışma sonucunda en çok inhibisyon

özelliğine sahip on uçucu yağın kekik, tarçın, defne, karanfil, acıbadem, yenibahar, mercanköşk, melekotu ve küçük hindistan cevizi olduğu bulunmuştur. Melekotu 25 türe karşı inhibisyon özelliği gösterirken, defneyaprağı 24, tarçın, karanfil ve kekik 23, acıbadem, mercanköşk ve yenibahar 22, sardunya 21, yaban kerevizi ise 20 türe karşı etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Garg ve Dengre (1988), mersin bitkisi ile yaptıkları bir çalışmada mersin uçucu yağının *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Candida lipolytica*'ya karşı belirgin bir antibakteriyel aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca mersin yağının antifungal etkisinin de olduğunu ve alkolik ekstraktında da antimikrobik aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Akgül (1993), kekik uçucu yağının en etkin maddesi ve güçlü bir antimikrobiyal olan timolün uçucu yağda %5–60 oranında, diğer bir antimikrobiyal madde olan karvakrolün ise uçucu yağda %5–40 oranında bulunduğunu bildirmiştir.

Uçucu yağların antibakteriyel ve antifungal özelliklerinden başka antiviral özellikleri de rapor edilmiştir. Bammi ve arkadaşları (1997), beş ayrı uçucu yağ ile yapmış oldukları bir çalışmada bu uçucu yağların Epstein-Barr virüsü (EBV) üzerinde etki gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Araujo ve ark., (2003) *Melisa officinalis* (melisa), *Lavandula angustifolia* (lavanta), *Salvia officinalis* (adaçayı), ve *Mentha piperita* (nane) bitkilerinin uçucu yağlarının gıdaların bozulmasında etkili beş maya olan *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pichia membranifaciens*, *Dekkera anomala*, ve *Yarrowia lipolytic*'e karşı antimikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir. Araştırmacılar *Melissa officinalis* uçucu yağının 500 µg/ml'sinin tüm maya türlerinin gelişimini tamamen inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Sartoratto ve arkadaşları (2004), 8 farklı aromatik bitkiden elde edilen uçucu yağların 11 farklı mikroorganizma üzerinde farklı derecelerde inhibitör etki gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Koçak ve Boyraz (2006), fitopatojenik funguslar olan *Alternaria mali*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* ve *Colletotrichum circinans*'a karşı kekik, kimyon, ardiç, nane, çörtük, okaliptus ve yavşan bitkilerinin uçucu yağlarının antifungal etkilerini araştırmışlardır. Uçucu yağlar 1 µl, 10 µl ve 50 µl/petri dozunda uygulanmıştır. Uygulama sonunda uçucu yağların 1 µl/petri dozunda hiçbir fungusa karşı fungisidal etkinin olmadığını, ancak uçucu yağların 10 µl ve 50 µl/petri dozlarında fungisidal etkinlikteki üstünlüklerine göre sırasıyla yavşan, kekik, nane, kimyon, okaliptus, ardiç ve çörtük uçucu yağlarının izlediğini bildirmişlerdir.

Rasooli ve arkadaşları (2006a), kekik esansiyel yağlarının *Listeria monocytogenes*'e karşı inhibitör etki gösterdiğini ve bu etkiyi de stoplazmada eksiklik ve sertliğini artırarak hücre duvarını bozmakla ya da kalınlaştırmakla gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar kekik yağının nisinle kombinasyonu ile elektrik şoku etkisinden daha fazla güçlü etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle bazı gıda çeşitlerini *Listera* kontaminasyonlarından korumak için kekik yağının kullanılabileceği araştırma sonucu

belirtilmiştir. Rasooli ve ark. (2006b)'nın yaptığı diğer bir çalışmada ise, kekik esansiyel yağlarının hücrenin organellerini, membranını ve duvarını bozarak *Aspergillus niger*'e karşı da inhibitör etki gösterdiği rapor edilmiştir.

2.4. Bitki Uçucu Yağlarının Rumen Mikroorganizmaları ve Fermentasyonu Üzerine Etkileriyle İlgili Çalışmalar

Uçucu yağlar ve bileşenlerinin ruminal azot metabolizması üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla in-vitroda çok sayıda çalışmalar yürütülmüştür.

Borchers (1965), kazein içeren ruminal sıvı içine kekik uçucu yağının etkin maddesi olan timol (1gr) eklemenin AA birikimine ve amonyak N ($\text{NH}_3\text{-N}$) konsantrasyonunda düşüşe yol açtığını göstermiş, ruminal bakterilerin amino asit deaminasyonunu inhibe ettiğini öne sürmüştür.

Oh ve ark., (1967) tek başına kullanılan uçucu yağların rumen bakterileri üzerinde farklı etkilere sahip olduğu, monoterpen hidrokarbonların oksijenat bileşikleri, monoterpen alkoller ve aldehitlerle karşılaştırıldığında daha az zararlı (toksik) etkiye sahip olduğu ve bazı durumlarda mikrobiyal aktiviteyi uyardığı bildirilmektedir.

Nagy ve Tengerdy (1968)'nin yaptığı çalışmada pelin otu uçucu yağının (*Artemisia tridentata*) ruminal bakteri etkinliğini önemli derecede inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir.

Broderick ve Balthrop, (1979) timolün rumende bulunan AA' lerden $\text{NH}_3\text{-N}$ deaminasyonunu inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir.

McIntosh ve ark. (2003)'nin uçucu yağların rumen mikroorganizmaları ve bu organizmaların protein metabolizmaları üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; uçucu yağların aminoasitlerin deaminasyon oranını inhibe ettiğini belirtilmiştir. Saf kültür çalışmaları göstermiştir ki; aşırı amonyak üreten bakteri ve anaerobik funguslar uçucu yağlara karşı en hassas türlerdir.

Rasmussem ve ark. (2005), 19 farklı uçucu yağla yaptıkları çalışmalarında ruminal protozoalar üzerinde en etkili yağın biberiye (*Rosmarinus officinalis*) olduğunu rapor etmişlerdir. 100 mg/ml konsantrasyonda protozoaların yaşama güçlerinde etkisinin olmadığını ancak 1000, 10000 ve 40000 mg/ml'lik yüksek konsantrasyonlarda yaşama yeteneğini sırasıyla %50, %90 ve %90 oranında azalttığını bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT**3.1. Materyal****3.1.1. Kimyasallar**

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler aksi belirtilmediği sürece Sigma ve Merck'ten alınmıştır.

3.1.2. Aletler

Çalışmada kullanılan teknik malzemeler; santrifüj (JP Selecta), otoklav (Nüve), su banyosu (JP Selecta), inkübatör 39°C (Nüve), hassas terazi (Vibra), ısıtmalı manyetik karıştırıcı (Velp), otomatik dispenser (Ismatec; MCP), vortex (Velp), spektrofotometre (Spectromax) kullanılmıştır.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Anaerobik Funguslar

Çalışmada Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği Laboratuvarı Anaerobik Fungus Kültür koleksiyonuna ait olan *Neocallimastix* sp. GMLF2 ve *Orpinomyces* sp. GMLF18 izolatları kullanılmıştır.

3.1.4. Bitkisel Uçucu Yağlar

Bu çalışmada; antimikrobiyal etkisi bilinen Kekik (*Thymus vulgaris*), Ardıç (*Juniperus communis*), Melisa (*Melissa officinalis*), Mersin (*Myrtus communis*) bitkilerinden elde edilen ve ticari olarak satılan bitkisel uçucu yağlar kullanılmıştır.

3.2. Metot**3.2.1. Anaerobik Besi Yeri**

Bu çalışmada kullanılan bazal anaerobik besi ortamı Orpin (1976) temel alınarak hazırlanmıştır. Besi yerlerine son konsantrasyon 5 ml olacak şekilde enerji kaynağı olarak glikoz, sellobioz, ksilan ya da yaklaşık 0,05 g buğday samanı eklenmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Anaerobik fungus sıvı besi yeri içeriği

			Sıvı Besi Ortamı (100 ml)
Mineral Solusyon 1	[*]	ml	15.0
Mineral Solusyon 2	**]	ml	15.0
Rumen Sıvısı		ml	15.0
NaHCO ₃		gr	0.60
Maya Özü		gr	0.25
Pepton		gr	1.00
Resazurin (% 0,1)		ml	1.00
Sistein HCl		gr	0.10
Enerji Kaynağı		gr	0.50
Saf su		ml	55.0
[*] Mineral Solusyon 1:			
	K ₂ HPO ₄	gr	3.0
	Saf su	ml	1000
**]Mineral Solusyon 2:			
	KH ₂ PO ₄	gr	3.0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	gr	6.0
	NaCl	gr	6.0
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	gr	0.6
	CaCl ₂	gr	0.6
	Saf su	ml	1000

3.2.1.1. Anaerobik Besi Yerinin Hazırlanması

Bir erlen içinde Cystein-HCl hariç anaerobik besiyerinde kullanılan; tüm kimyasallar, saf su, Mineral solüsyon 1, Mineral solüsyon 2 ve rumen sıvısı ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde sürekli ısıtılarak çözünmüş, aynı zamanda ortama sürekli CO₂ verilerek O₂'nin ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Resazurin indikatörünün ilave edilmesiyle besi yeri mavi-mor bir renk almıştır. Besi yeri ısı etkisiyle kaynamaya başlayınca Cystein-HCl ilave edilmiş ve ısıtma işlemi durdurularak manyetik karıştırıcı ile karıştırılmaya devam edilmiştir. CO₂'in erlen içine verilmeye devam edilmesi ve Cystein-HCl etkisiyle ortam rengi anaerobik besi yerinin gerçek rengi olan solgun sarıya dönmüştür.

Hazırlanan besi ortamı, ihtiyaca göre Hungate tüplerine dispenser (Ismatec; MCP) yardımı ile dağıtılmadan önce tüplerin içerisine CO₂ verilerek ortamdaki O₂ uzaklaştırılmış ve besi ortamı ilave edilen tüplerin kapakları hızlı bir şekilde kapatılarak otoklavda sterilize edilmiştir.

Anaerobik besi ortamı Hungate tüpleri içerisine son konsantrasyon 5 mg/ml olacak şekilde enerji kaynağı (örn. glikoz, selüloz, ksilan veya buğday samanı) içeren besi ortamının koyulması ile hazırlanmıştır. Substrat olarak saman, selüloz veya ksilan kullanılan besi yerleri 121°C'de 15 dakika, substrat olarak glikoz kullanılan besi yerleri ise 110°C'de 10 dakika otoklavlanmıştır (Orpin, 1976).

3.2.1.2. Anaerobik Besi Yerinde Bakteriye Büyümeyi Engelleyici Antibiyotik İlavesi

Anaerobik besi yerinde muhtemel bakteri büyümesini önlemek amacıyla, % 96'lık etil alkolde çözülmüş ve besi yeri içindeki son konsantrasyonları amfisin 100 µg/ml, streptomisin 140 µg/ml, eritromisin 200 µg/ml, kloramfenikol 100 µg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu karışım anaerobik besi yerlerine fungus ekimi yapıldıktan sonra enjektör yardımıyla 0.5 ml'lik oranlarda ilave edilmiş ve bu şekilde bakterilerin anaerobik ortamda gelişimi engellenmiştir.

3.2.2.Bitkisel Uçucu Yağlar

3.2.2.1. Uçucu Yağların Ekime Hazırlanması

Bitkisel uçucu yağlar anaerobik sıvı besi yerinde tam olarak çözünmediği için Ha ve ark. (2001)'nın organik bir çözücü olan, etil alkolde (%96'lık) çözme yöntemine dayanılarak gerçekleştirilmiş ve uygulanan metodoloji aşağıda belirtilmiştir.

Her bir yağ etil alkolde çözülerek besi ortamına anaerobik şartlar altında ve son konsantrasyon 0.01, 0.1, 0.5 ve 1 mg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Böylece kullanılan yağların 1000 µl' ye karşılık gelen gram cinsinden ağırlıkları göz önüne alınarak ilave edilecek etil alkol oranı tespit edilmiştir. Daha sonra vorteksle uçucu yağların ve etil alkolün birbiriyle tam karışması sağlanmıştır. Buna göre;

1000 µl'lik karışım:119 µl kekik yağı +881 µl etil alkol
1000 µl'lik karışım:116 µl ardıç yağı +884 µl etil alkol
1000 µl'lik karışım:118 µl mersin yağı +882 µl etil alkol
1000 µl'lik karışım:120 µl melisa yağı +880 µl etil alkol içermektedir.

Ayrıca elde edilen sonuçların etil alkolden değil de kullanılan bitkisel uçucu yağlardan kaynaklandığını doğrulamak amacıyla kontrol grubu niteliğinde 115 µl saf su + 885 µl etil alkol karışımı hazırlanarak fungus ekimi bu karışıma da uygulanmıştır.

3.2.2.2. Uçucu Yağların Besi Yerlerine İlave Edilmesi ve Fungus Ekimi

Hazırlanan anaerobik besi yerleri otoklavlandıktan sonra 39 °C'lik inkübatöre alınmıştır. Enerji kaynağı olarak glikoz kullanılan besi yerlerine fungus ekimi yapılmış ve olası bakteri büyümesini engellemek için antibiyotik ilavesi yapılmıştır. Birkaç kez alt kültüre alınan ve herhangi bir bakteri gelişimi gözlenmeyen besi yerleri çalışmada kullanılmıştır. Uçucu yağ eklenirken çalışmada iki cins anaerobik fungus (*Neocallimastix* sp. ve *Orpinomyces* sp.) ve enerji kaynağına göre yine iki çeşit (KMS ve ksilanlı) anaerobik besi yeri kullanılmıştır.

Çalışmada önce ksilanlı besiyerine otomatik pipetler kullanılarak 1 µl, 10 µl, 50 µl, ve 100 µl oranında etil alkol ve yağdan oluşan karışımlar içerisine oksijen girişini engellemek için CO₂ verilerek ilave edilmiş ve 39°C'lik inkübatörde 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra her bir besi yerine şırınga ile 0,5 ml glikozlu besi yerinde üretilen *Orpinomyces* sp. ve *Neocallimastix* sp. cinsi izolatlardan ayrı ayrı enjekte edilerek ekimi yapılmıştır. Ayrıca bazı tüplere hiç yağ eklemeyerek yine ksilanlı besi yerine fungus

ekimi yapılarak kontrol grupları oluşturulmuştur. Aynı işlemler KMS'li besi yerlerine de uygulanmıştır. Uçucu yağları çözmede kullanılan etil alkolün etkisini görmek amacıyla da tıpkı uçucu yağlarda olduğu gibi 100 µl'lik etil alkol + saf su karışımında KMS ve ksilanlı besiyerlerine de ilave edilmek suretiyle bu tüplere de fungus ekimi yapılmıştır.

39 °C'lik inkübatörde 3 gün büyümeye bırakılan tüpler 3. günün sonunda santrifüjle çöktürülerek üst kısımda kalan süpernatant, enzim ve protein analizlerinde kullanılmak üzere -20 °C'lik dondurucuya alınmıştır.

3.2.3. Anaerobik Fungusların Fibrolitik Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.2.3.1. Süpernatantların Hazırlanması

Enzim üretimi araştırılacak olan kültürler, oda sıcaklığında 3200 devir/dak'da 10 dakika santrifüj edilerek hücre ve besi ortamı birbirinden ayrılmıştır. Hücre dışı sıvının bulunduğu süpernatant olan kısım boş hungate tüplerine alınmış ve enzim analizinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.3.2. Enzim Testi

Ksilanaz ve karboksimetilselülaz (KMSaz) enzimlerinin aktivitesi Miller (1959)'e ait yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 25 µl enzim ekstraktı ve 225 µl substrattan (% 0.5 substrat, 25 mM potasyum fosfat tamponu, pH 6.5) oluşmaktadır. Karışım 50 °C'de 45 dk inkübasyona bırakılmıştır. Karışım üzerine 250 µl 3-5 dinitrosalisilik asit (DNS) solüsyonu (% 30 sodyum potasyum tartarat, 2 N NaOH, % 1 DNS) eklenmiş ve 5 dk kaynar su banyosunda bekletilerek enzim reaksiyonu durdurulmuştur. Kontrol grubu sırasıyla 225 µl substrat üzerine 250 µl DNS ilave edilmiş ve 25 µl enzim ekstraktından eklenerek 5 dk kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Kontrol ve deney grubu karışımları saf su ile 1 ml'ye tamamlanarak spektrofotometrede 540 nm'de okutulmuştur. Standart çözeltisinde karboksimetilselülaz için glikoz, ksilanaz için ksiloz kullanılmıştır. Bütün enzim çalışmaları 2 tekerrür ve 3 paralel olarak yürütülmüştür. Bir ünite enzim aktivitesi 1 dk içerisinde alınan 1 µmol indirgenen şeker miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzim aktivitelerinin hesaplanması ise şu şekilde yapılmıştır:

Şeker konsantrasyonunun (µM/ml) optik yoğunluk (OD) olarak ifade edilmesinde kullanılan 1.0 değeri standart olarak hesaplanmıştır (X). Bu amaçla KMSaz ve ksilanaz aktivitelerini hesaplamak üzere glikoz kullanılmıştır. Sıfır (t_0 =kontrol grubu) zamanı ve 45 dk (t_{45} =deney grubu) arasındaki farklılıklar hesaplanmış ve formülde A olarak ifade edilmiştir. Spesifik aktivitelerin belirlenmesi için kültürlerin protein miktarları (P) da hesaplanmıştır. İnkübasyon zamanı 45 dk (C), her örnekteki kültür miktarı ise 10 ml alınmıştır (D). Sonuç olarak enzim aktiviteleri aşağıda gösterilen formüllerle hesaplanmıştır;

$$\text{Toplam Aktivite} = [(A * X) / (C * D)] \rightarrow \mu\text{mol/dk/ml kültür}$$

$$\text{Spesifik Aktivite} = [(A * X) / P] / (C * D) \rightarrow \mu\text{mol/dk/mg protein}$$

Standart= 950 µl 0.05 M sodyum fosfat tamponu + 50 µl substrat (1 mg/ml ksiloz veya glikoz)

3.2.4. Protein Analizi

Protein analizi için Lowry (1951) metodu uygulanmış ve bu amaçla Favorgen firmasına ait hazır protein kiti ve mikro plakalar kullanılmıştır. Mikro plaka üzerinde yukarıdan aşağı olmak üzere sırasıyla her hücreye 10 µl olacak şekilde blank (saf su), standartlar ve en son olarak ta örnekler konulmuştur. Daha sonra her bir göz üzerine örnek sayısına göre kural olarak; 1 ml hazır protein kiti + 4 ml dH₂ O olacak şekilde hazırlanan solüsyondan otomatik pipetlerle 200 µl ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda okutulmuştur. Analizde protein standartı olarak 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000 mg/ml'lik farklı konsantrasyonlarda sığır serum albumini (BSA) solüsyonları hazırlanmış ve bu standartlar analizde örneklerle beraber spektrofotometrede okutulmuştur.

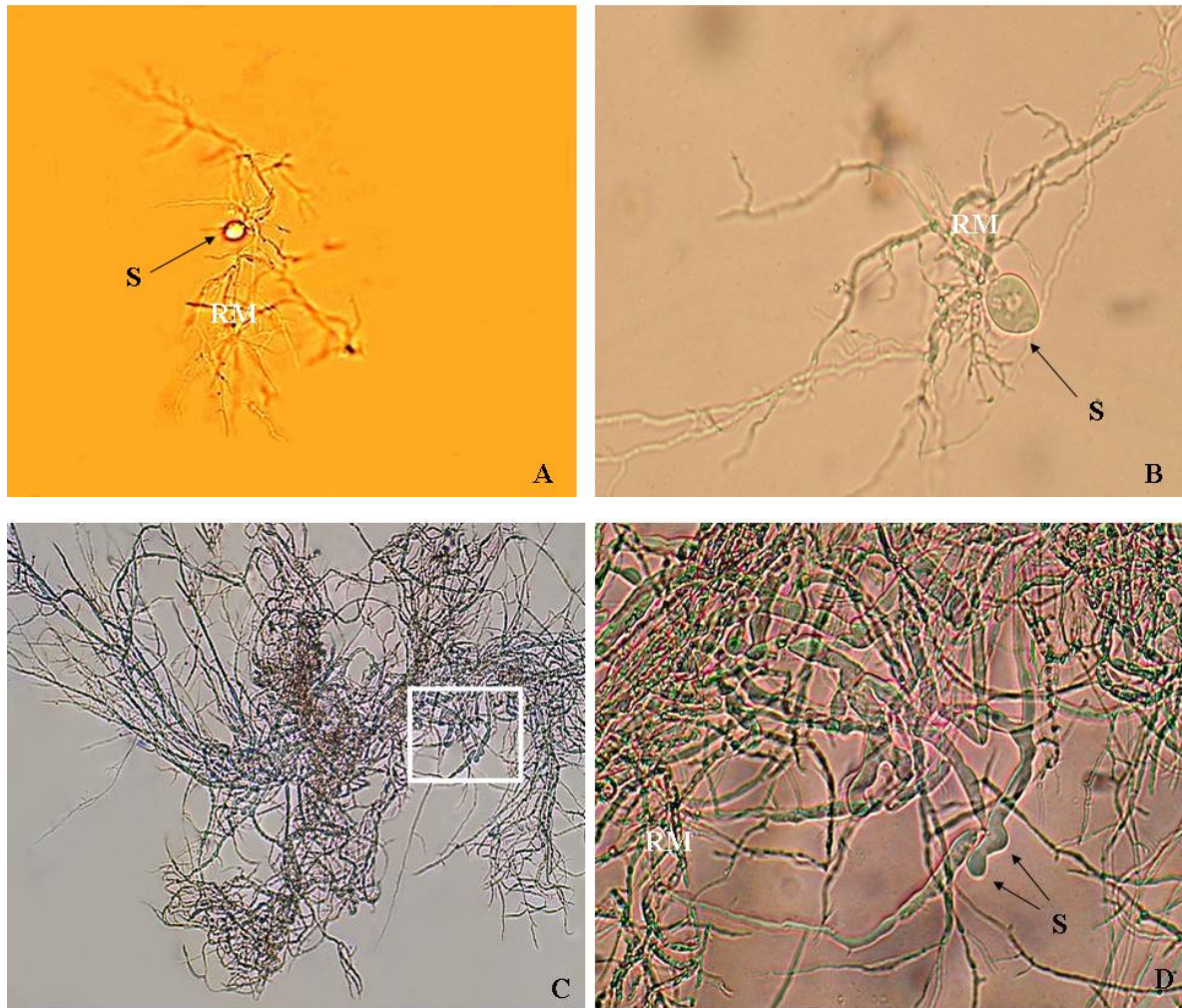
3.2.5. İstatistiksel Analiz

Çalışma bulgularının istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde SPSS paket programı kullanılmış ve önemli bulunan muamele gruplarının karşılaştırılmasında ise Tukey çoklu karşılaştırma testi dikkate alınarak sonuçlar çizelgelere yansıtılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bitkisel Uçucu Yağların Anaerobik Fungus Gelişimi Üzerine Etkisi

Bitkisel uçucu yağlarla yapılan çalışmada farklı konsantrasyonlarda uçucu yağ içeren karboksimetilselülozlu (KMS) ve ksilanlı besi ortamlarında *Neocallimastix* sp. GMLF2 ve *Orpinomyces* sp. GMLF18 fungal izolatlarının gelişimi incelenmiştir. *Orpinomyces* ve *Neocallimastix* cinsi funguslarda filamentli rizoidal gelişim görülmekle birlikte bu funguslar polisentrik (*Orpinomyces*) ve monosentrik (*Neocallimastix*) olarak ayrılmaktadır. Ayrıca *Orpinomyces* ve *Neocallimastix* türlerinin zoosporlarının kamçı sayısı >4 'tür (Özköse ve ark. 2003) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Çalışılan rumen funguslarının mikrograf görüntüleri. A: *Neocallimastix* sp. GMLF2 (100X), B: *Neocallimastix* sp. GMLF2 (200X), C: *Orpinomyces* sp. GMLF18 (100X), D: *Orpinomyces* sp. GMLF18 (200X). Rumen funguslarının spor keseleri (S) ve filamentli rizomiselyumları (RM) mikrograflar üzerinde gösterilmiştir.

Laboratuvar şartlarında anaerobik fungusların yaşatılması için funguslar sürekli olarak alt kültüre alınmıştır. Çözünür karbonhidratları içeren (örn. glikoz) besi ortamlarında geliştirilen kültürlerin daha sık (2-4 gün) alt kültürlerinin yapılması

gerekmektedir (Davies ve ark., 1993b). Alt kültürlerle alınması işlemi enerji kaynağı olarak buğday samanı içeren anaerobik sıvı besi ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Olası bakteri büyümesini önlemek içinde antibiyotik ilavesi yapılmıştır. Kontaminasyon gerçekleşmeyen kültürlerin glikozlu besi ortamına alınarak ekimine devam edilmiş ve alt kültüre alma işlemi 2 günde bir yapılarak zoosporların gelişimi için optimum sıcaklık olan 39 °C (Lowe ve ark., 1987b)'de funguslar büyütülmüştür.

Rumen funguslarının karboksimetilselülaz ve ksilanaz enzim üretimini tetiklemek için besi ortamlarına enerji kaynağı olarak ayrı ayrı KMS ve ksilan (% 0.5) ilave edilmiştir. Farklı anerobik fungus türleri ile yapılan çalışmada ksilanaz enzimi için en iyi substratın ksilan olduğu bulunmuştur (Yanke ve ark., 1996).

İnkübasyon sonunda etkisi denenen tüm uçucu yağların 1 mg/ml'lik konsantrasyonunda her iki fungusun da üreyemediği gözlenmiştir (Çizelge 4.1, 4.2). Ayrıca KMS'li besi ortamında her iki fungus türünün de ardıç yağının 0.5 mg/ml'lik konsantrasyonunda üreyemediği görülmüştür (Çizelge 4.1). Ksilanlı besi ortamında ise yine her iki fungus türünün ardıç yağının 0.5 mg/ml'lik konsantrasyonunda üreme gözlenmemiştir (Çizelge 4.2). Bunun sebebi olarak, yağ asitlerinde geçerli olan iki teori akla gelmektedir. Birincisi; yağ asitleri ruminal mikroorganizmaların büyümelerini ve metabolizmalarını engelleyebilir. İkincisi ise yağ asitleri bitki fibrilleri üzerinde bir kılıf oluşturarak bakteriyal enzimlerin aktivitesini bloke edebilir (Ha ve ark., 2001'den Devendra ve Lewis, 1974). Ha ve ark. (2001), *N. frontalis* C5-1'in gelişimi üzerine bazı doymuş yağ asitlerinin (kaprilik, kaprik ve stearik asit) etkisini incelemişlerdir. Ortam içerisindeki yağ asitlerini çözmek için eklenen etil alkolün de artmasıyla birlikte yüksek yağ asidi konsantrasyonlarının (% 2.5 ve 5) fungusun gelişimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Ancak besi ortamlarına 1 mg/ml etil alkol + saf su olacak şekilde ilave edilen tüplerde her iki fungusun da büyüdüğü gözlenmiştir. Bu da fungusların büyümesinde inhibitör etki gösteren faktörün uçucu yağlar olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.1. Uçucu yağların KMS'li besi ortamında büyütülen anaerobik fungusların gelişimi üzerine etkisi.

Konsantrasyon (mg/ml)	Anaerobik Funguslar							
	<i>Neocallimastix</i> sp.				<i>Orpinomyces</i> sp.			
	Kekik U.Y.	Mersin U.Y.	Ardıç U.Y.	Melisa U.Y.	Kekik U.Y.	Mersin U.Y.	Ardıç U.Y.	Melisa U.Y.
0	+	+	+	+	+	+	+	+
0.01	+	+	+	+	+	+	+	+
0.1	+	+	+	+	+	+	+	+
0.5	+	+	-	+	+	+	-	+
1	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) Üreme gözlendi, (-) Üreme gözlenmedi

Çizelge 4.2. Uçucu yağların ksilanlı besi ortamında büyütülen anaerobik fungusların gelişimi üzerine etkisi.

Konsantrasyon (mg/ml)	Anaerobik Funguslar							
	<i>Neocallimastix</i> sp.				<i>Orpinomyces</i> sp.			
	Kekik U.Y.	Mersin U.Y.	Ardıç U.Y.	Melisa U.Y.	Kekik U.Y.	Mersin U.Y.	Ardıç U.Y.	Melisa U.Y.
0	+	+	+	+	+	+	+	+
0.01	+	+	+	+	+	+	+	+
0.1	+	+	+	+	+	+	+	+
0.5	+	+	-	+	+	+	-	+
1	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) Üreme gözlemlendi, (-) Üreme gözlenmedi

4.2. Bitkisel Uçucu Yağ İçeren Kültürlerde Büyütülen Anaerobik Fungusların Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi

Çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri sebebiyle uçucu yağların, rumen de bitki dokularının parçalanmasında önemli etkileri bulunan anaerobik fungusların enzimleri üzerindeki etkilerini görmek amacıyla yapılan çalışmanın bu kısmında ise KMS'li ve klisanlı besi ortamında, 39 °C'de üç gün inkübasyona bırakılan funguslar inkübasyon sonunda 3200 devir/dk'da 10 dk santrifüj edilerek süpernatant olan üst kısım enzim ve protein analizinde kullanılmak üzere boş hungate tüplerine alınmıştır. Çalışma kolaylığı sağlaması açısından hungate tüplerinde bulunan süpernatantlar 1.5 ml'lik endorf tüplere alınarak kalan kısım tekrar -20 °C'de saklanmak üzere kaldırılmıştır. Enzimlerin sıcaklık etkisiyle bozulmalarını önlemek amacıyla içerisinde süpernatant bulunan 1.5 ml'lik tüpler sürekli buz içerisinde tutularak çalışılmıştır.

Ayrıca enzim aktivitesine ait elde edilen sonuçların istatistiki analizleri de çizelgeler içerisinde belirtilmiştir. Buna göre; muamele grupları (kontrol, 0.01, 0.1, 0.5 ve 1mg/ml) arasındaki farklılık (Efe ve ark., 2000) tüm uçucu yağlarda (mersin, ardıç, melisa ve kekik) istatistiki açıdan çok önemli bulunmuştur ($P < 0.01$).

4.2.1. Uçucu Yağların *Neocallimastix* sp. GMLF2'nin Toplam ve Spesifik KMSaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Uçucu yağlar birçok mikroorganizma üzerinde antimikrobiyal etkilere sahiptir. Uçucu yağların bu antimikrobiyal etkileri içerdikleri bir dizi terpenoid ve fenolik bileşiklere (Panizzi ve ark., 1993; Helander ve ark., 1998; Chao ve ark., 2000) ilaveten uçucu yağlardaki kimyasal bileşenler ve fonksiyonel grupların oranları ve birbirleriyle olan etkileşimleriyle de ilişkilendirilmektedir (Dorman ve Deans, 2000).

Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi uçucu yağlar kontrol grubuna göre *Neocallimastix* sp. GMLF2'nin toplam KMSaz aktivitesi üzerinde inhibitör etkiye sahiptir. Mersin ve ardıç uçucu yağlarında Tukey çoklu karşılaştırma testine göre (Efe ve ark., 2000) üçer farklı

ortalama grubu olduğu ve enzim aktivitesinin en yüksek kontrol gruplarında gerçekleştiği görülmektedir. Buna karşın mersin uçucu yağında en düşük ortalama grubu 1 mg/ml konsantrasyonunda iken ardıç uçucu yağında 0.5 ve 1 mg/ml konsantrasyonunda gerçekleşmiştir.

Tukey çoklu karşılaştırma testine göre melisa uçucu yağında, üç farklı ortalama grubu oluşurken kekik uçucu yağında ise iki farklı ortalama grubu oluşmuştur. Melisa uçucu yağında en yüksek ortalama grubunu kontrol ve 0.1 mg/ml konsantrasyonu oluştururken, en düşük ortalama grubunu 0.5 ve 1 mg/ml konsantrasyonu oluşturmuştur. Kekik yağında ise en yüksek ortalama grubunu kontrol, 0.01 ve 0.1 mg/ml konsantrasyonu oluştururken en düşük ortalama grubunu 0.5 ve 1 mg/ml konsantrasyonu oluşturmuştur.

Çizelge 4.3. *Neocallimastix* sp. GMLF2'nin KMS kültüründe toplam KMSaz aktivitesi.

	Uçucu yağ	Uçucu yağ konsantrasyonu (mg/ml)				
		0	0.01	0.1	0.5	1
Süpernatant KMSaz ($\mu\text{mol/dk/ml}$)	Mersin	25,9 $\pm$ 0,8 ^a	20,0 $\pm$ 0,7 ^b	18,4 $\pm$ 0,6 ^b	18,2 $\pm$ 0,7 ^b	7,8 $\pm$ 0,2 ^c
	Ardıç	25,9 $\pm$ 0,8 ^a	15,3 $\pm$ 0,9 ^b	12,4 $\pm$ 0,8 ^b	7,3 $\pm$ 0,9 ^c	4,1 $\pm$ 0,8 ^c
	Melisa	25,9 $\pm$ 0,8 ^a	16,3 $\pm$ 2,7 ^b	22,9 $\pm$ 2,1 ^{ab}	8,0 $\pm$ 0,4 ^c	6,8 $\pm$ 0,6 ^c
	Kekik	25,9 $\pm$ 0,8 ^a	24,8 $\pm$ 0,9 ^a	23,5 $\pm$ 1,6 ^a	11,5 $\pm$ 0,2 ^b	8,8 $\pm$ 0,9 ^b

Çizelge 4.4'te görüldüğü üzere toplam aktivite de olduğu gibi uçucu yağların fungusun spesifik aktivitesi üzerinde de inhibitör etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Tukey çoklu karşılaştırma testine göre mersin ve kekik uçucu yağlarında dörder farklı en yüksek enzim aktivitesi kontrol grubunda gözlenmiştir. Buna göre; mersin uçucu yağında en yüksek ortalama grubu kontrol grubunda gözlenirken en düşük ortalama grubu 1 mg/ml'lik konsantrasyonda gözlenmiştir. Ardıç uçucu yağında ise en düşük ortalama grubu 0.5 ve 1 mg/ml'lik konsantrasyonda gerçekleşmiştir. Yapılan çoklu karşılaştırma testine göre melisa uçucu yağında üç farklı ortamla grubu oluşmuş ve en yüksek ortalama grubu kontrol grubunda, en düşük ortalama grubu ise 0.5 ve 1 mg/ml'de, gerçekleşmiştir. Kekik uçucu yağında ise en düşük ortalama grubunu 1 mg/ml'lik konsantrasyon oluşturmuştur.

Bu etkinin nedeni olarak uçucu yağların enzimin substratına bağlanması ve dolayısıyla enzimin etkinliğini azattığı düşüncesini akla getirmektedir (Çizelge 4.4). Ruminal selülitik bakteri (*B. flavefaciens*, *R. albus* ve *R. flavefaciens*) ve protozoanlarda yağ asitlerinin düşük konsantrasyonlarının bile selülaz aktivitesi üzerinde inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir (Henderson, 1973; Maczulak ve ark., 1981). Ancak Ha ve ark., (2001)'nin doymamış yağ asitlerinin düşük konsantrasyonlarının fungus gelişimi ve KMSaz aktivitesini teşvik edici etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir. *Neocallimastix frontalis* C5-1'in kültür süpernatantında KMSaz aktivitesi üzerinde kontrol grubuna göre en fazla inhibitör etki gösteren yağ asidinin kaprilik asidin %0.1'lik konsantrasyonunun olduğunu, ayrıca kaprik ve stearik asidin daha düşük (%0.01 ve 0.001) konsantrasyonlarında ise enzim aktivitesini artırdığını gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar anaerobik fungusların gelişim oranı ya da enzim aktivitesi ile yağ asitlerinin düşük konsantrasyonlarının inhibisyonu arasında ters orantı mevcut olduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 4.4. *Neocallimastix* sp. GMLF2'nin KMS kültüründe spesifik KMSaz aktivitesi.

	Uçucu yağ	Uçucu yağ konsantrasyonu (mg/ml)				
		0	0.01	0.1	0.5	1
Süpernatant KMSaz (μmol/dk/mg protein)	Mersin	261,0±8,4 ^a	161,2±5,9 ^{bc}	165,0±5,7 ^b	135,7±5,4 ^c	74,0±2,0 ^d
	Ardıç	261,0±8,4 ^a	147,2±8,8 ^b	116,8±7,8 ^b	66,2±8,2 ^c	47,6±9,9 ^c
	Melisa	261,0±8,4 ^a	146,2±25,0 ^b	182,4±16,7 ^b	57,8± 3,5 ^c	61,3±5,8 ^c
	Kekik	261,0±8,4 ^a	176,2±6,9 ^b	135,31±9,6 ^c	103,3±2,6 ^{cd}	77,3±8,4 ^d

4.2.2. Uçucu Yağların *Neocallimastix* sp. GMLF2'nin Toplam ve Spesifik Ksilanaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Ksilanaz, anaerobik fungusların çalışılan tüm endo-polisakkarit hidrolaz enzimleri içerisinde en aktif olan enzimdir. *N. frontalis*, ksilanaz enzimini çoğunlukla kültür ortamına salgılamaktadır ve sadece küçük bir miktarının (<%10) fungal rizoidler ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Mountfort ve Asher, 1989). Çizelge 4.5'te görüldüğü gibi, Tukey çoklu karşılaştırma testine göre *Neocallimastix* sp. GMLF2'nin toplam ksilanaz aktivitesi üzerinde mersin yağında iki farklı ortalama grubu oluşmuş ve en yüksek ortalama grubunu kontrol, 0.01, 0.1 ve 0.5 mg/ml'lik konsantrasyonlar oluştururken en düşük ortalama grubunu 1 mg/ml konsantrasyon oluşturmuştur. Ardıç uçucu yağında da yine iki farklı ortalama grubu oluşmuş, en yüksek ortalama grubunu kontrol, 0.01 ve 0.1 mg/ml konsantrasyonlarda gerçekleştirirken en düşük ortalama grubunu 0.5 ve 1 mg/ml konsantrasyon oluşturmuştur. Melisa uçucu yağında ise dört farklı ortalama grubu oluşmuş ve en yüksek ortalama grubunu 0.01 mg/ml oluştururken en düşük ortalama grubunu 1 mg/ml'lik konsantrasyon oluşturmuştur. Kekik uçucu yağında en yüksek ortalama grubunu 0.01 ve 0.1 mg/ml'lik konsantrasyonlar oluştururken en düşük ortalama grubunu ise yine 1 mg/ml'lik konsantrasyon oluşturmuştur.

Çizelge 4.5. *Neocallimastix* sp. GMLF2'nin ksilan kültüründe toplam ksilanaz aktivitesi.

	Uçucu yağ	Uçucu yağ konsantrasyonu (mg/ml)				
		0	0.01	0.1	0.5	1
Süpernatant Ksilanaz (μmol/dk/ml)	Mersin	137,0±4,5 ^a	142,8±3,6 ^a	144,0±2,6 ^a	136,3±0,3 ^a	27,7±2,3 ^b
	Ardıç	137,0±4,5 ^a	128,7±0,8 ^a	127,7±2,7 ^a	10,4± 2,4 ^b	9,1±2,6 ^b
	Melisa	137,0±4,5 ^b	152,6±4,6 ^a	148,4±2,3 ^{ab}	120,8±1,4 ^c	25,3±1,4 ^d
	Kekik	137,0±4,5 ^b	148,8±1,3 ^a	149,5±1,6 ^a	137,3±0,9 ^b	13,2±1,4 ^c

Mersin ve melisa uçucu yağlarında Tukey çoklu karşılaştırma testine göre üçer farklı ortalama grubu oluştuğu ve enzim aktivitesinin en yüksek 0.01 ve 0.1 mg/ml konsantrasyonda en düşük ortalama grubunun ise 1 mg/ml konsantrasyonda gerçekleştiği görülmektedir. Ardıç uçucu yağında ise dört farklı ortalama grubu oluşmuş ve en yüksek ortalama grubu 0.01 mg/ml konsantrasyonunda gerçekleşmiştir.

Tukey çoklu karşılaştırma testine göre kekik uçucu yağında, dört farklı ortalama grubu oluşurken en yüksek ortalama grubunu 0.5 mg/ml konsantrasyonu oluştururken en düşük ortalama grubunu 1 mg/ml konsantrasyonu oluşturmuştur (Çizelge 4.6).

Melisa yağının 0.01 mg/ml'lik konsantrasyonda spesifik aktiviteyi yaklaşık % 30 artırdığı gözlenmiştir. Kekik yağı 0.5 mg/ml'de enzim üretiminde kontrol grubuna yakın sonuçlar vermesine karşılık spesifik aktivite üzerinde kekik yağının diğer konsantrasyonlarına oranla en fazla artışın olduğu doz olarak belirlenmiştir. Bu artışın nedeni fungusların bu miktarı enerji kaynağı olarak kullanması olabilir. Ancak 1mg/ml'lik konsantrasyon diğer yağlarda olduğu gibi fungus için toksik etki yaratmış ve hem enzim üretimi hemde aktivitesi üzerinde inhibitör etki göstermiştir. Uçucu yağların yüksek dozları rumen fermentasyonu üzerinde de olumsuz etkilere (toplam uçucu yağ konsantrasyonunda azalma) sahiptir (Basquet ve ark., 2006). Ha ve ark., (2001), doymuş yağ asitlerinin (kaprik, kaprilik ve stearik asit) *Neocallimastix frontalis* C5-1'in ksilanaz aktivitesini incelemişler ve 4 günlük inkübasyon sonunda etkisi denenilen yağ asitlerinin tümünün fungusun ksilanaz aktivitesinin inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Ancak bizim çalışmamızda 3 günlük inkübasyon yapılmış ve enzim aktivitelerinde melisa yağının 0.01 mg/ml'sinde % 31'lik bir artma gözlenmiştir. Inkübasyon süresinin yağların spesifik aktivite üzerindeki etkinliğinin artmasında rolü olabilir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. *Neocallimastix* sp. GMLF2'nin ksilan kültüründe spesifik ksilanaz aktivitesi.

	Uçucu yağ	Uçucu yağ konsantrasyonu(mg/ml)				
		0	0.01	0.1	0.5	1
Süpernatant Ksilanaz (µmol/dk/mg protein)	Mersin	895,8±29,4 ^b	1063,4±26,8 ^a	1020,3±18,4 ^a	985,5±2,4 ^{ab}	217,5±18,3 ^c
	Ardıç	895,8±29,4 ^b	1040,8±6,9 ^a	640,8±13,7 ^c	88,5±20,7 ^d	71,1±20,1 ^d
	Melisa	895,8±29,4 ^b	1176,2±35,8 ^a	1083,0±16,9 ^a	929,7± 10,9 ^b	211,5±12,4 ^c
	Kekik	895,8±29,4 ^c	928,9±8,4 ^{bc}	975,7±10,8 ^{ab}	1003,8±7,1 ^a	77,9±8,4 ^d

4.2.3. Uçucu Yağların *Orpinomyces* sp. GMLF18'in Toplam ve Spesifik KMSaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Tukey çoklu karşılaştırma testine göre Mersin ve melisa uçucu yağlarında üçer farklı ortalama grubu oluşurken, en yüksek ortalama grubu kontrol ve 0.01 mg/ml konsantrasyonda, en düşük ortalama grubunun ise 1 mg/ml konsantrasyonda gerçekleştiği görülmektedir.

Tukey çoklu karşılaştırma testine göre ardıç ve kekik uçucu yağlarında dört farklı ortalama grubu oluşmuştur. Ardıç uçucu yağında 0.01 mg/ml'lik konsantrasyonda en yüksek ortalama grubu, 0.5 ve 1 mg/ml konsantrasyonlarda ise en düşük ortalama grubunun oluşmuştur. Kekik uçucu yağında da 0.01 mg/ml konsantrasyonda en yüksek ortalama grubunun olduğu gözlenirken en düşük ortalama grubu 1 mg/ml'de gerçekleşmiştir (Çizelge 4.7).

Evans ve Martin (2000), kekik yağının etken maddesi olan timolün 45 ve 90 µg/ml'lik dozlarında ruminal bakteriler olan *Streptococcus bovis* JB1 ve *Selenomonas*

ruminantium HD4'ün gelişimi ve laktat üretimi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı ancak 180 µg/ml'de gelişimi ve laktat üretimini tamamen inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.7. *Orpinomyces* sp. GMLF18'in KMS kültüründe toplam KMSaz aktivitesi.

	Uçucu yağ	Uçucu yağ konsantrasyonu (mg/ml)				
		0	0.01	0.1	0.5	1
Süpernatant KMSaz (µmol/dk/ml)	Mersin	23,3±0,5 ^a	21,7±1,1 ^a	15,8±0,9 ^b	12,0±1,4 ^b	2,6±0,4 ^c
	Ardıç	23,3±0,5 ^b	31,6±0,8 ^a	15,4±1,0 ^c	4,9±0,7 ^d	3,4±1,4 ^d
	Melisa	23,3±0,5 ^a	20,9±1,4 ^a	16,3±0,4 ^b	12,8±0,6 ^b	1,4±0,04 ^c
	Kekik	23,3±0,5 ^b	33,0±1,4 ^a	24,3±0,4 ^b	13,7±0,4 ^c	4,0±0,9 ^d

Çizelge 4.8'te görüldüğü gibi *Orpinomyces* sp. GMLF18'in spesifik KMSaz aktivitesi üzerinde uygulanan tüm uçucu yağların 1 mg/ml'lik konsantrasyonlarının inhibitör etkisinin olduğu gözlenmiştir. Tukey çoklu karşılaştırma testine göre mersin ve melisa uçucu yağlarında üçer farklı ortalama grubu oluşmuş ve her iki yağın kontrol ve 0.01 mg/ml konsantrasyonları en yüksek ortalama grubunu oluştururken, aynı uçucu yağların 1 mg/ml'lik konsantrasyonu en düşük ortalama grubunu oluşturmuştur. Ardıç ve kekik uçucu yağlarında ise dörder farklı ortalama grubu oluşmuş ve en yüksek ortalama grubu 0.01 mg/ml'de, en düşük ortalama grubu ise ardıç uçucu yağında 0.5 ve 1 mg/ml'de, kekik uçucu yağında 1 mg/ml'de gerçekleşmiştir.

Nagy ve Tenderdy (1968), pelin otu (*Artemisia tiridentata*) uçucu yağının geyik rumeninde bulunan mikroorganizmalar üzerine etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar, 6 ml'lik selülozlu sıvı besiyeri içerisine 0.002 ml oranında pelin otu ucucu yağının ilave edilmesiyle ortamda bulunan selülozun parçalanma oranının azaldığını, 0.04 ml oranında ilave edilen pelin otu uçucu yağının ise parçalanmayı tamamen inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.8. *Orpinomyces* sp. GMLF18'in KMS kültüründe spesifik KMSaz aktivitesi.

	Uçucu yağ	Uçucu yağ konsantrasyonu (mg/ml)				
		0	0.01	0.1	0.5	1
Süpernatant KMSaz (µmol/dk/mg protein)	Mersin	161,2±3,7 ^a	172,6±8,8 ^a	104,5±6,5 ^b	78,3±9,1 ^b	23,6±4,0 ^c
	Ardıç	161,2±3,7 ^b	205,6±5,2 ^a	96,3±6,8 ^c	32,9±5,1 ^d	24,8±10,6 ^d
	Melisa	161,2±3,7 ^a	140,8±9,9 ^a	103,6±3,1 ^b	92,6±4,7 ^b	10,7±0,3 ^c
	Kekik	161,2±3,7 ^b	190,0±8,4 ^a	168,3±3,0 ^{ab}	87,0±3,0 ^c	30,6±7,3 ^d

4.2.4. Uçucu Yağların *Orpinomyces* sp. GMLF18'in Toplam ve Spesifik Ksilanaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Tukey çoklu karşılaştırma testine göre *Orpinomyces* sp. GMLF18 anaerobik fungusunun toplam ksilanaz aktivitesi üzerinde etkisi denenilen uçucu yağlardan ardıç, melisa ve kekik yağları üçer farklı ortalama grubu, mersin uçucu yağı ise dört farklı ortalama grubu oluşturmuştur. Uçucu yağlar arasında en yüksek ortalama grubunu mersin ve melisa yağlarında kontrol grubu, ardıç uçucu yağında ise kontrol ve 0.01 mg/ml'lik

konsantrasyon oluştururken, en düşük ortalama grubunu ise mersin yağında 1 mg/ml'lik konsantrasyon, ardıç ve melisa uçucu yağlarında ise 0.5 ve 1 mg/ml'lik konsantrasyon oluşturmuştur. Kekik uçucu yağı ise en yüksek ortalama grubunu 0.01 mg/ml konsantrasyon, en düşük ortalama grubunu ise 1 mg/ml'lik konsantrasyonda gerçekleştirmiştir. Kekik yağı diğer yağlara kıyasla 0.01, 0.1 ve 0.5 mg/ml'de aktiviteyi 1 mg/ml'ye kadar önemli ölçüde artırmıştır. Özellikle de 0.01 mg/ml'de aktivitede yaklaşık iki kat artış gözlenmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. *Orpinomyces* sp. GMLF18'in ksilan kültüründe toplam ksilanaz aktivitesi.

	Uçucu yağ	Uçucu yağ konsantrasyonu (mg/ml)				
		0	0.01	0.1	0.5	1
Süpernatant Ksilanaz (μmol/dk/ml)	Mersin	107,3±4,9 ^a	31,6±0,3 ^{bc}	42,89±3,1 ^b	26,6±5,3 ^c	12,1±1,0 ^d
	Ardıç	107,3±4,9 ^a	99,7±4,4 ^a	61,6±9,6 ^b	10,8± 0,8 ^c	8,0±4,1 ^c
	Melisa	107,3±4,9 ^a	48,5±4,8 ^b	31,7±2,9 ^b	11,4±4,7 ^c	3,7±2,6 ^c
	Kekik	107,3±4,9 ^b	189,8±7,7 ^a	164,7±1,9 ^a	133,8±9,3 ^b	19,1±4,4 ^c

Tukey çoklu karşılaştırma testine göre mersin ve ardıç uçucu yağlarında dörder farklı ortalama grubu oluşmuş ve mersin uçucu yağında en yüksek ortalama grubunu kontrol grubu oluştururken ardıç yağında en yüksek ortalama grubunu 0.01 mg/ml'lik konsantrasyon oluşturmuştur. En düşük ortalama grubu mersin yağında 1 mg/ml'de gözlenirken, ardıç uçucu yağında en düşük ortalama grubu 0.5 ve 1 mg/ml'lik konsantrasyonlarda gerçekleşmiştir.

Tukey çoklu karşılaştırma testine göre melisa uçucu yağında üç farklı ortalama grubu oluşurken en yüksek ortalama grubunu kontrol grubu, en düşük ortalama grubunu ise 0.5 ve 1 mg/ml'lik konsantrasyonlar oluşturmuştur. Kekik uçucu yağında ise beş farklı ortalama grubu ortaya çıkmış ve en yüksek ortalama grubunu 0.01 mg/ml'lik konsantrasyon, en düşük ortalama grubunu 1 mg/ml'lik konsantrasyon oluşturmuştur.

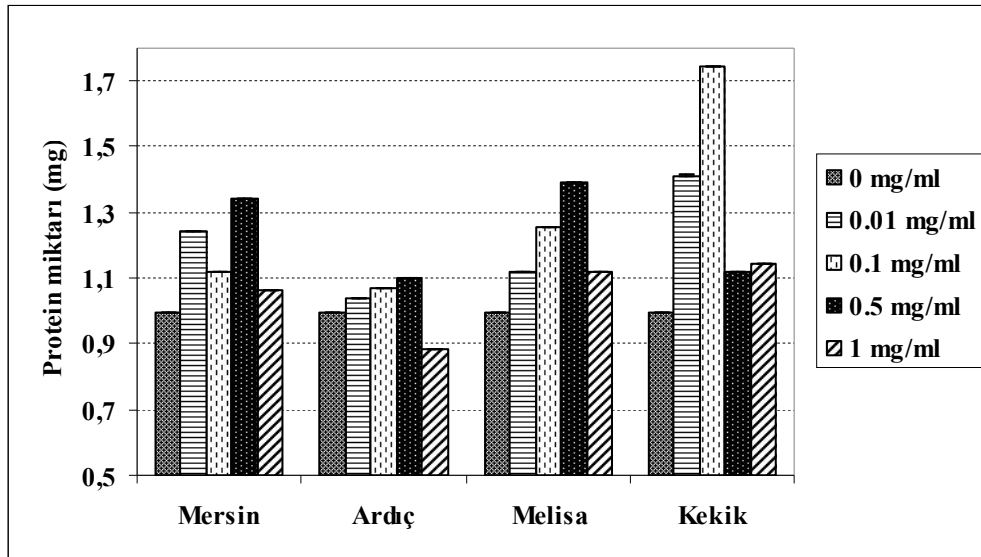
Ardıç ve kekik yağının 0.01 mg/ml'de spesifik aktiviteyi yaklaşık 2.5 kat artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca kekik yağının 0.1 ve 0.5 mg/ml'lik konsantrasyonlarının da spesifik aktivite üzerinde önemli artışlar yaptıkları gözlenmiştir (Çizelge 4.10). Ardıç yağının aynı konsantrasyonda toplam aktivitesinin az olmasına karşılık 0.01 mg/ml'lik konsantrasyonunun spesifik aktivitesinin çok yüksek çıkması, ardıç uçucu yağının bu miktarının enzimin substrata bağlanmasını teşvik ederek aktiviteyi artırmış olmasından kaynaklanabilir. Çünkü uçucu yağların düşük miktarları, doymuş yağ asitlerinde olduğu gibi (Nieman, 1954; Ha ve ark., 2001) aktivite üzerinde stimülatör etki göstermiş olabilir.

Çizelge 4.10. *Orpinomyces* sp. GMLF18'in ksılan kültüründe spesifik ksılanaz aktivitesi.

	Uçucu yağ	Uçucu yağ konsantrasyonu (mg/ml)				
		0	0.01	0.1	0.5	1
Süpernatant Ksılanaz (μmol/dk/mg protein)	Mersin	660,9±30,5 ^a	207,3±2,2 ^c	319,8±23,2 ^b	205,3±41,4 ^c	106,6±9,2 ^d
	Ardıç	660,9±30,5 ^b	1493,3±67,3 ^a	406,3±63,5 ^c	104,7±8,2 ^d	107,5±55,3 ^d
	Melisa	660,9±30,5 ^a	398,1±38,5 ^b	346,0±32,4 ^b	89,2±37,1 ^c	28,5±19,8 ^c
	Kekik	660,9±30,5 ^d	1444,9±59,0 ^a	1169,3±13,7 ^b	935,2±65,1 ^c	150,1±35,1 ^e

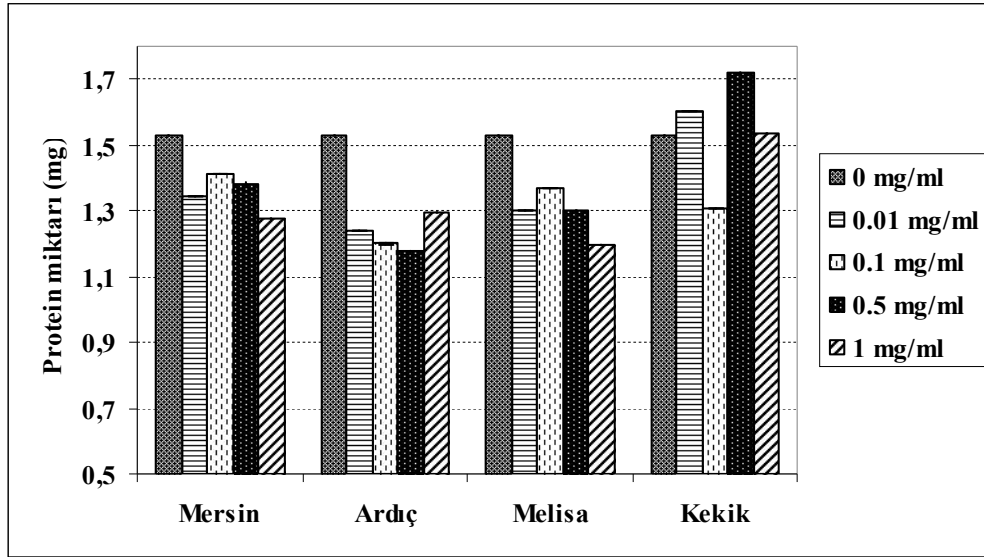
4.3. Anaerobik Fungus Kültüründe Elde Edilen Protein Miktarları

Çalışmada fungusların spesifik enzim aktivitelerinin hesaplanması ve bitkisel uçucu yağların anaerobik fungusların büyümeleri üzerine etkisini görmek amacıyla ürettikleri protein miktarları yapılan analizler sonucu belirlenmiş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca sonuç grafiklerinde standart hatalar çok düşük olduğu için hata barları da çok düşük çıkmış ve hesaplanmalarına rağmen grafiklerde görülmektedir. Buna göre; karboksimetilselülozlu ortamda büyütülen *Neocallimastix* sp. GMLF2'nin protein miktarları ardıç yağının 1 mg/ml'lik konsantrasyonu dışında kontrol grubuna göre yüksek çıkmıştır. Özellikle kekik yağının 0.1 mg/ml'sinde protein miktarı diğer konsantrasyonlara oranla en yüksek miktarı vermiştir. Oysa kekik yağının aynı konsantrasyonunda spesifik aktivitesi (bkz. Ek Şekil 2) kontrol grubuna göre çok düşük olmuştur. Bu da hücre dışına KMSaz enziminden daha çok diğer proteinlerin (örneğin ksılanaz, proteaz) salgılanmış olabileceğini akla getirmektedir (Şekil 4.2).

Şekil 4.2. KMS'li besi yerinde büyütülen *Neocallimastix* sp. GMLF2'nin protein miktarı grafiği.

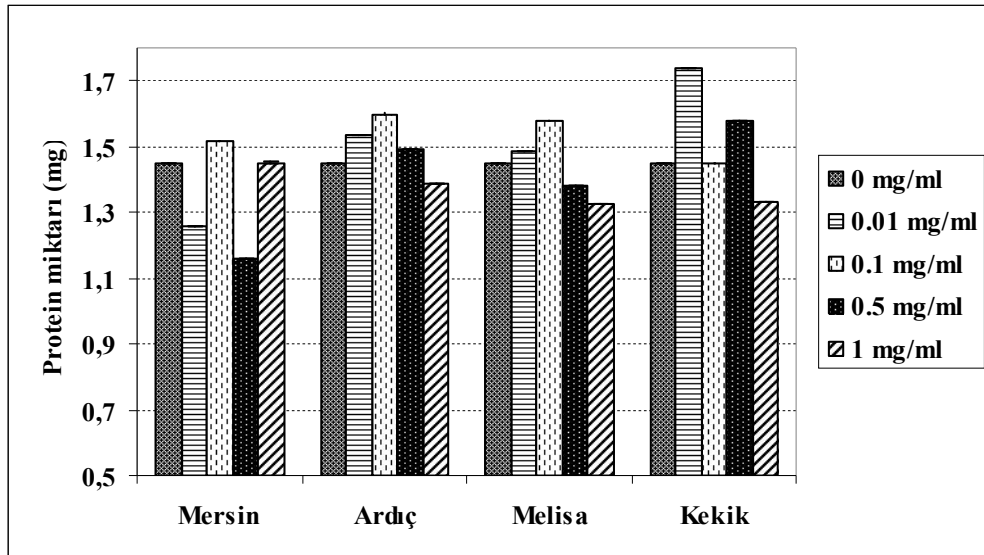
Grafiğe göre enerji kaynağı olarak ksılan kullanılan ve kekik yağı eklenen kültürlerde büyütülen *Neocallimastix* sp. GMLF2'nin protein miktarları kontrol grubuna göre fazla çıkmıştır. Oysa enzim aktivitesi grafiği (bkz. Ek Şekil 4) incelenecek olursa uçucu yağların düşük konsantrasyonlarında spesifik aktivitenin yüksek çıktığı görülmektedir. Bu

çelişkinin ise çoğunlukla enzimin hücre dışına salgılanmış olma ihtimalinden kaynaklanabileceği düşünülebilir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Ksılanlı besi yerinde büyütülen *Neocallimastix* sp. GMLF2'nin protein miktarı grafiği.

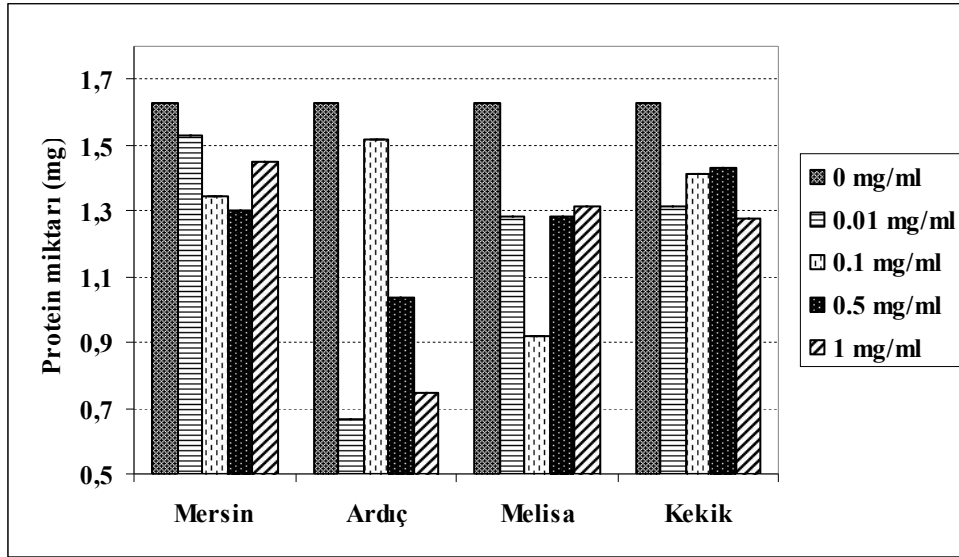
KMS'li ortamda büyütülen *Orpinomyces* sp. GMLF18 fungusunun protein miktarları mersin yağının 0.01 mg/ml'lik konsantrasyonu hariç uygulanan tüm uçucu yağların 0.01 mg/ml'sinde kontrol grubuna göre yüksek çıkmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. KMS'li besi yerinde büyütülen *Orpinomyces* sp. GMLF18'in protein miktarı grafiği.

Orpinomyces sp. GMLF18'in ksılan içeren besi ortamında uçucu yağ eklenerek büyütülmesi sonucu ürettiği protein miktarları Şekil 4.5'de görülmektedir. Buna göre en az miktarı ardıç yağının 0.01 mg/ml'lik konsantrasyonu vermiştir. Oysa GMLF18'in spesifik ksılanaz aktivitesindeki (bkz. Ek Şekil 8) oran en yüksek değeri vermiştir. *Neocallimastix*

sp. GMLF2'nin KMSaz aktivitesinde olduğu gibi burada da diğer proteinlerin hücre dışına salgılanmış olma ihtimali söz konusu olabilir.



Şekil 4.5. Ksılanlı besiyerinde büyütülen *Orpinomyces* sp. GMLF18'in protein miktarı grafiği.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hormon ve antibiyotik büyütme faktörlerinin tümünün hayvansal yemlerde kullanımı yasaklanması üzerine kullanımı gündeme gelen maddelerden biri de doğal olmaları ve antimikrobiyal etkileri nedeniyle bitkisel uçucu yağlardır. Bitkisel uçucu yağların rumende fibrolitik enzimlerinin varlığı nedeniyle çok önemli bir yere sahip olan anaerobik fungusların gelişimi ve bazı enzimleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışma sonucunda uçucu yağların hangi konsantrasyonda funguslar için inhibitör etki yaptığı belirlenmiştir. Ayrıca uçucu yağların anaerobik fungusların fibrolitik enzimlerinden olan KMSaz ve ksilanaz üzerindeki teşvik edici ve engelleyici etkilerinin hangi oranlarda ortaya çıktığı görülmüştür. Çalışma boyunca yapılan analizler sonucu görülen etkiler funguslara göre özetlenecek olursa;

Etkisi denenen bitkisel uçucu yağların 1 mg/ml konsantrasyonda çalışılan her iki rumen fungusunda üremesini engellediği ve enzim aktivitesini azalttığı görülmüştür.

Fungusların enzim aktiviteleri açısından sonuçları ayrı ayrı ele alacak olursak; *Neocallimastix* sp. GMLF2 fungusunun toplam ve spesifik KMSaz enzim aktivitesi üzerinde tüm yağların inhibitör etkisinin olduğu görülmüştür. Aynı fungusun toplam ksilanaz aktivitesi üzerinde ise, ardıç yağı enzim aktivitesini tüm konsantrasyonlarda inhibe etmesine rağmen 0.01 mg/ml'de spesifik aktiviteyi artırmıştır. Uygulanan yağların düşük konsantrasyonlarının spesifik aktiviteyi artırdığı, melisa yağının ise spesifik aktivite üzerinde diğer yağlara oranla daha olumlu sonuç verdiği gözlenmiştir. Kekik uçucu yağının 0.5 mg/ml'lik konsantrasyonda toplam aktivite üzerinde inhibitör etki göstermesine karşılık spesifik aktivite üzerinde artışa yol açtığı görülmüştür.

Üzerinde çalışılan diğer anaerobik fungus olan *Orpinomyces* sp. GMLF18 türünün toplam KMSaz enzim aktivitesi için ise ardıç ve kekik uçucu yağlarının 0.01 mg/ml'lik konsantrasyonda en fazla artışın gerçekleştiği ve aynı uçucu yağların yine 0.01 mg/ml'lik konsantrasyonunda spesifik aktiviteyi yaklaşık 2 kat arttırdıkları gözlenmiştir. Mersin yağının 0.01 mg/ml'lik konsantrasyonda toplam KMSaz aktivitesini düşürmesine rağmen spesifik KMSaz aktivitesini artırmıştır. Melisa uçucu yağı ise hem toplam hemde spesifik aktivite üzerinde inhibitör etki göstermiştir. Ayrıca kekik uçucu yağı 0.5 mg/ml konsantrasyona kadar toplam ve spesifik ksilanaz enzim üretimini ve spesifik aktiviteyi önemli miktarlarda arttırmıştır. Ancak mersin ve melisa uçucu yağlarının aynı fungusun toplam ve spesifik ksilanaz enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkilerinin olduğu görülmüştür.

Enzim aktivitelerindeki düşmeyi uçucu yağların enzimlere ya da enzimlerin substratına bağlanarak inhibitör görevi yaptığı, dolayısıyla enzimlerin aktivitesini azalttığı tahmin edilmektedir. Uygulanan tüm uçucu yağların özellikle kekik uçucu yağının düşük konsantrasyonlarının enzim aktivitelerinde olumlu sonuçlar verdiği görülmüştür. Ancak uçucu yağların 1 mg/ml konsantrasyonda çalışılan rumen funguslarının büyümelerini engellediği ve enzim aktivitesini azalttığı görülmüştür. Ancak bu uçucu yağların rumende diğer mikroorganizmalarla birlikte ne gibi etkiler göstereceği bilinmemektedir. Sonuç olarak uçucu yağ içeriği yüksek olan yemlerle beslemenin patojen mikroorganizmalar göz önünde bulundurulduğunda hayvan besleme açısından faydalı olacağı öngörülse de lignoselülitik metaryalin enzimler tarafından parçalanmasını azaltmasından dolayı

rasyonlara katılırken kullanılacak miktara dikkat edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca bitkisel uçucu yağların fungusların enzim mekanizmalarını nasıl etkilediğini belirlemek için başka çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca ileriki çalışmalarda uçucu yağların (her bitkinin sahip olduğu) içerdiği yağ asitlerinin belirlenmesi ve bunlardan hangi yağ asidinin büyüme ve aktivite üzerine daha fazla etkisinin olduğu belirlenmelidir.

KAYNAKLAR

- AKGÜL A. 1993. Baharat Bilimi ve Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:15 Ankara.
- AKIN, D.E. 1986. Interaction Of Ruminant Bacteria And Fungi With Southern Forages J. Anim Sci. 63:962–977.
- AKIN, D.E., RIGSBY, L.L. 1987. Mixed fungal populations and lignocellulosic tissue degradation in the bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol. 53:1987.
- AKIN, D.E., BORNEMAN, W.S. 1990. Role of rumen fungi in fiber degradation. J. Dairy Sci. 73:3023.
- AKIN, D.E., BORNEMAN, W.S., LYON, C.E. 1990. Degradation of leaf blades and stems by monocentric and polycentric isolates of ruminal fungi. Anim. Feed Sci, Technol. 31:205.
- AKYOL, I., COMLEKÇIOĞLU, U., KAR, B., EKİNCİ M.S., ÖZKOSE, E. 2009. Cloning of a xylanase gene *xyn2A* from rumen fungus *Neocallimastix* sp. GMLF2 in *Escherichia coli* and its partial characterization. Biologia 64/4: 664–670. Section Cellular and Molecular Biology DOI: 10.2478/s11756-009-0140-5.
- ANONİM, 2005. Karma Yemlere Katılması ve Hayvanlara Yedirilmesi Yasak Olan Maddeler Hakkında Tebliğ. Tarım ve Köyişleri Bakanlığında. 16 Haziran 2005. Sayı:25847 Tebliğ No:2005/24. Resmi Gazete.
- ANONİM, 2009. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzymatic-kits.html#gop>
- ARAUJO, C., SOUSA, M.J., FERREIRA, M.F., LEAO, C. 2003. Activity of essential oils from Mediterranean *Lamiaceae* species against food spoilage yeasts. Plant Physiol. Apr.; 131(4):1816-1825.
- ASAO, N., USHIDA, K., KOJIMA, Y. 1993. Proteolytic activity of rumen fungi belonging to genera *Neocallimastix* and *Piromyces*. Lett. Appl. Microbiol. 16: 247–250.
- BACIC, A., HARRIS, P.J., STONE, B.A. 1988. Structure and function of plant cell walls. In The Biochemistry of Plants (Ed. P. K. Stumpf, and E. E. Conn). pp. 297–371. Academic Press, New York.
- BALANDRIN, M.F., KLOCKE, J.A. 1985. Natural Plant Chemicals: Sources Of Industrial and Medicinal Materials. Science 228:1154–1160.
- BAMMI J., KHELIFA, R., REMMAL, A., VE ARK. 1997. Etudes de l'activite antivirale de quelques huiles essentielles, In Proceedings of the intern, Congr. Arom. Medicinal Plants & Essential Oils, Benjilali B., Ettalibi M., Ismaili-Alaoui M., Zrira S (eds), Actes Editions, Rabat, Morocco, 502.
- BARAHONA, R., SANCHEZ, S., LASCANO, C.E., OWEN E., MORRIS, P., THEODOROU, M.K. 2005. Effect of condensed tannins from tropical legumes on the activity of fibrolytic enzymes from the rumen fungus *Neocallimastix hurleyensis*. Enzyme and Microbial Technology 39: 281–288.
- BARICHIEVICH, E.M., CALZA, R.E. 1990. Supernatant protein and cellulase activities of the anaerobic ruminal fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. Appl. Environ. Microbiol. 56:43.
- BARR, D.J.S. 1988. How modern systematic relates to the rumen fungi. BioSystems, 21: 351–356.
- BAUCHOP, T. 1979. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. Appl. Environ. Microbiol. 38: 148–158.
- BAUCHOP, T. 1981. Anaerobic fungi in rumen fiber digestion. Agric. Environ. 6:339.

- BAUCHOP, T., MOUNTFORT, D. (1981). Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and presence of rumen methanogens. *Applied Environmental Microbiology* 42, 1103–1110.
- BÉGUIN, P. 1990. Molecular biology of cellulose degradation. *Ann. Rev. Microbiol.* 44: 219–248.
- BÉGUIN, P., AUBERT, J.P. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews* 13, 25–58.
- BERGEN, W.G., BATES, D.B. 1984. Ionophores: their effect on production efficiency and mode action. *J. Anim. Sci.* 58: 1465–1483.
- BOLAT, D., COŞKUN, B., BAYTOK, E., DENİZ, S. 1996. Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Ders Notları. YYÜ. Vet. Fak. Van.
- BORCHERS, R. 1965. Proteolytic activity of rumen fluid in vitro. *J. Anim. Sci.* 24, 1033–1038.
- BORNEMAN, W.S., AKIN, D.E., LJUNGDAHL, L.G. 1989. Fermentation Products And Plant Cell Wall Degrading Enzymes Produced By Monocentric And Polycentric Ruminant Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 9: 285–296.
- BORNEMAN, W.S., HARTLEY, R.D., MORRISON, W.H., AKIN, D.E., LJUNGDAHL, L.G. 1990. *Feruloyl* and *p-coumaroyl esterase* from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 345–351.
- BORNEMAN, W.S., LJUNGDAHL, L.G., HARTLEY, R.D., AKIN, D.E. 1991. Isolation and characterization of *p-coumaroyl esterase* from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain Mc-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2377–2344.
- BORNEMAN, W.S., LJUNGDAHL, L.G., HARTLEY, R.D., AKIN, D.E. 1992. Purification and partial characterization of two *feruloyl esterases* from anaerobic fungus *Neocallimastix* strain Mc-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3762–3766.
- BORNEMAN, W.S., LJUNGDAHL, L.G., HARTLEY, R.D., AKIN, D.E. 1993. *Feruloyl* and *p-coumaroyl esterases* From The Anaerobic Fungus *Neocallimastix* Strain Mc-2: Properties And Functions In Plant Cell Wall Degradation. In *Hemicellulose And Hemicellulases* (M.P. Coughlan And G.P. Hazlewood, Editor) Portland Press, London. P. 85–103.
- BRAUNE, R. 1913. Untersuchungen über die in Wiederkäuern vorkommenden Protozoen. *Archive Protistenk.* 32: 111–170.
- BRODERICK, G.A., BALTHROP, J.E. 1979. Chemical inhibition of amino acid deamination by ruminal microbes in vitro. *J. Anim. Sci.* 49, 1101–1111.
- BRUL, S., STUMM, C. K. 1994. Symbionts and organelles in anaerobic protozoa and fungi. *Tree* 9, 319–324.
- BURT, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *Int. J. Food Microbiol.* 94:223–253.
- BUSQUET, M., CALSAMIGLIA, S., FERRET, A., KAMEL, C. 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 89:761–771.
- CALSAMIGLIA, S., CASTILLEJOS, L., BUSQUET, M. 2006. Alternatives to antimicrobial growth promoters in cattle. Pages 129–167 in *Recent Advances in Animal Nutrition*. P. C. Garnsworthy, and J. Wiseman, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- CASTILLEJOS, L., CALSAMIGLIA, S., FERRET, A. 2006. Effect of essential oils active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems. *J. Dairy Sci.* 89:2649–2658.

- CEYLAN, A. 1996. Tıbbi Bitkiler II (Uçucu Yağ Bitkileri), E. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları No. 481.
- CHAO, S.C., YOUNG, D.G., OBERG, C.J. 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. J. Essent. Oil Res. 12, 639–649.
- CHEEKE, P.R. 1999. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. Proc. Am. Soc. Anim. Sci. E9:1–10.
- CHEN, Y.C., TSAI, S.D., CHENG, H.L. 2007. *Caecomyces sympodialis* sp. nov., a new rumen fungus isolated from *Bos indicus*. Mycologia, 99(1): 125–130.
- CHRISTOV, L.P., AKHTAR, M., PRIOR, B.A. 1996. Impact Of Xylanase And Fungal Pretreatment On Alkali Solubility and Brightness Of Dissolving Pulp. Biobleaching Of Sulphite Pulp. 50: 579–582.
- COLLINS, T., GERDAY, C., FELLER, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiology Reviews 29: 3–23.
- COONER, D.E., BEUCHAT, L.R. 1984. Effect of Essential of Oil From plants on Food Spoilage Yeasts. Journal of Food Science, 49: 429–434.
- COMLEKÇIOĞLU, U., AKYOL, I., ÖZKOSE, E., KAR, B., EKİNCİ, M.S. 2008. Carboxymethylcellulase production by the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix* sp. GMLF7. Annals of Microbiology, 58 (1) 115–119.
- ÇÖMLEKÇİOĞLU, U., GEZGİNÇ, Y., KAR, B., YAZDIÇ, F.C., AKYOL, İ., EKİNCİ, M.S., ÖZKÖSE, E. 2009. Laktik Asit Bakterilerine Ksilanolitik Özellik Kazandırılması. 6. Ulusal Zootečni Bilim Kongresi, Bildiri Kitabı, S: 85–89, Erzurum.
- DAVIDSON, P.M., NAIDU, A.S. 2000. Phyto-phenols. Pages 265–293 in Natural Food Antimicrobial Systems. A. S. Naidu, ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- DAVIS C.L. 1992. Feeding the High Producing Dairy Cow. Milk Specialties Company, Illinois.
- DAVIES, D.R., THEODOROU, M.K., LAWRENCE, M.I., TRINCI, A.P.J. 1993a. Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces. Journal of General Microbiology 139, 1395–1400.
- DAVIES, D.R., THEODOROU, M.K., BROOKS, A.E., TRINCI, A.P.J. 1993b. Influence of drying on the survival of anaerobic fungi in rumen digesta and faeces of cattle. FEMS Microbiol. Lett. 106:59–64.
- DEANS, S.G., RITCHIE, G. 1987: Antibacterial properties of plant essential oils. Int.J.Food Microbiol., 5(2):165-180
- DEVENDRA, C., LEWIS, D. 1974. The interaction between dietary and fiber in the sheep. Anim. Prod. 19:67–17
- DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88, 308–316.
- DUFVA, G.S., BARTLEY, E.E., DAYTON, A.D., RIDDELL, DO. 1983. Effect of Niasin Supplementation on Milk Production and Ketosis of Dairy Cattle. J. Dairy Sci.; 66, 2329- 2336.
- EFE, E., BEK, Y., ŞAHİN, M. 2000. SPSS’te Çözümleri ile İstatistik Yöntemler II. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Rektörlüğü Yayın No: 73, Ders Kitapları Yayın No: 9, K.S.Ü. Basımevi, Kahramanmaraş.
- EKİNCİ, M.S., ÖZKÖSE, E., AKYOL, İ. 2006. Effects of Sequential Sub-Culturing on the Survival and Enzyme Activity of *Neocallimastix hurleyensis*. Turk J Biol 30: 157–162 © TÜBİTAK.

- ERGÜN, T., TUNCER, Ş.D. 2001. Hayvan Besleme ve Besleme Hastalıkları. Medipres. Ankara.
- EUROPEAN COMMISSION. 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. Off. J. Eur. Union L:L268/29–L268/43.
- EVANS, J.D., MARTIN, S.A. 2000. Effects of Thymol on Ruminal Microorganisms. Dcurrent Microbiology Vol. 41, pp. 336–340.
- FARAG, R.S., DAW, Z.Y., ABO-RAYA, S.H. 1989. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxins in a synthetic medium. Journal of food science, 54 (1): 74–76.
- FENGEL, D., WEGENER, G. 1989. Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Walter de Gruyter Verlag, 612s. Berlin, New York.
- FLINT, H.J. 1993. Degradation of plant cell wall polysaccharides by rumen bacteria. pp. 49–69. En: R. A. Prins y C. S. Stewart (Eds.). Microorganisms in ruminant nutrition. Nottingham University Press, Nottingham.
- FOGARTY, W.M., KELLY, C.T. 1980. Amylases, amyloglucosidases and related glucanases, p. 115–170. In A. H. Rose (ed.), Economic microbiology-microbial enzymes and bioconversions, vol. 5. Academic Press, Inc., New York.
- FONTY, G.A., JOBLIN, K.N. 1991. Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion, p. 655–680. In T. Tsuda, Y. Sasaki, and R. Kawashima (ed.), Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. Academic Press, New York.
- FRANCE, J., THEODOROU, M.K., DAVIES, D. 1990. The use of zoospore concentrations and life cycle parameters in determining the population of anaerobic fungi in the rumen ecosystem. Journal of Theoretical Biology 147, 413–422.
- GAMERITH, G., GROICHER, R., ZEILINGER, S., HERZOG, P., KUBICEK, C.P. 1992. Cellulase-Poor Xylanases Produced By *Trichoderma Reesei* Rutc-30 On Hemicellulase Substrates. Appl Microbiol Biotechnol. 38: 315–322.
- GARG, S.C., DENGRE, S.I. 1988. Antifungal Activity of ten Essential Oil of *Myrtus Communis* var. *Microphylla*, *Herba Hungarica*.; 27 (2-3): 123-125.
- GERSHENZON, J., R. CROTEAU. 1991. Terpenoids. Pages 165–219 in *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. Vol. 1. G. A. Rosenthal, and M. R. Berenbaum, ed. Academic Press, San Diego, CA.
- GESSESSE, A. 1998. Purification And Properties Of Two Thermostable Alkaline Xylanases From An Alkaliphilic *Bacillus* Sp. Applied And Environmental Microbiology., 3533-3535.
- GESSESSE, A., GASHE, B.A. 1997. Production Of Alkaline Xylanase By *Anbacillus* Sp. Isolated From An Alkaline Soda Lake. Journal Of Applied Microbiology. 83. 402-406.
- GOLD, J.J., HEATH, I.B., BAUCHOP, T. 1988. Ultrastructural description of a new chytrid genus of caecum anaerobe, *Caecomycetes equi* gen. nov., sp. nov. assigned to the Neocallimasticaceae. BioSystems. 21: 403–415.
- GORDON, G.L.R., PHILLIPS, M.W. 1989. Degradation and utilization of cellulose and straw by three different anaerobic fungi from the ovine nunen. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1703–1710.
- GORING, D.A.I. 1989. The lignin paradigm. In: *Lignin Properties and Materials*. (Glasser, W., G., Sarkanen, S., -eds.) American Chemical Society, Washington D.C., s:2-9.

- GRENET, E., BARRY, P. 1988. Colonization of thick-walled plant tissues by anaerobic fungi. *Anim. Fd. Sci. Technol.*, 19: 25-31.
- GUTIERREZ, M.E., GARCIA, A.F., DE MADARIAGA, M.A., SAGRISTA, M.L., CASADO, F.J., MORA, M. 2003. Interaction of tocopherols and phenolic compounds with membrane lipid components: Evaluation of their antioxidant activity in a liposomal model system. *Life Sci.* 72:2337-2360.
- HA, J.K., LEE, S.S., GAO, Z., KIM, C.H., KIM, S.W., KO, J.Y., CHENG, K.J. 2001. The effect of saturated fatty acids on cellulase digestion by the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis* C5-1. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14(7): 941-946.
- HAMMER, K.A., CARSON, C.F., RILEY, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86:985-990.
- HARBORNE, J.B., WILLIAMS, C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55:481-504.
- HEATH, I.B., BAUCHOP, T., SKIPP, R.A. 1983. Assignment of the rumen anaerobe *Neocallimastix frontalis* to the Spizellomycetales (Chytridiomycetes) on the basis of its polyflagellate zoospore ultrastructure. *Canadian Journal of Botany.* 61: 295-307.
- HEATH, I.B. 1988. Gut fungi. *Trends Ecol. Evol.* 3:167.
- HEBRAUD, M., FEVRE, M. 1990. Purification and characterization of a specific glycoside hydrolase from the anaerobic ruminal fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3164.
- HELANDER, I.M., ALAKOMI, H.-L., LATVA-KALA, K., MATTILA-SANDHOLM, T., POL, L., SMID, E.J., GORRIS, L.G.M., VON WRIGHT, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3590-3595.
- HENDERSON, C. 1973. The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. *J. Agric. Sci.* 81:107-112.
- HIBBETT, D.S., BINDER, M., BISCHOFF, J.F., BLACKWELL, M., CANNON, P.F., ERIKSSON, O.E., HUHDORF, S., JAMES, T., KIRK, P.M., LÜCKING, R., LUMBSCH, H.T., LUTZONI, F., MATHENY, P.B., MCLAUGHLIN, D.J., POWELL, M.J., REDHEAD, S., SCHOCH, C.L., SPATAFORA, J.W., STALPERS, J.A., VILGALYS, R., AIME, M.C., APTROOT, A., BAUER, R., BEGEROW, D., BENNY, G.L., CASTLEBURY, L.A., CROUS, P.W., DAI, Y.-C., GAMS, W., GEISER, D.M., GRIFFITH, G.W., GUEIDAN, C., HAWKSWORTH, D.L., HESTMARK, G., HOSAKA, K., HUMBER, R.A., HYDE, K.D., IRONSIDE, J.E., KÖLJALG, U., KURTZMAN, C.P., LARSSON, K.-H., LICHTWARDT, R., LONGCORE, J., MIADLIKOWSKA, J., MILLER, A., MONCALVO, J.-M., MOZLEY-STANDRIDGE, S., OBERWINKLER, F., PARMASIO, E., REEB, V., ROGERS, J.D., ROUX, C., RYVARDEN, L., SAMPAIO, J.P., SCHÜBLER, A., SUGIYAMA, J., THORN, R.G., TIBELL, L., UNTEREINER, W.A., WALKER, C., WANG, Z., WEIR, A., WEISS, M., WHITE, M.M., WINKA, K., YAO, Y.-J., ZHANG, N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111: 509-547.
- HO, Y.W., BAUCHOP, T., ABDULLAH, N., JALALUDIN, S. 1991. Morphology of three rumen fungi and description of a procedure for the induction of zoosporogenesis and release of zoospores in cultures. *J. Gen. Microbiol.* 137:213.
- 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.

- HOBSON, P.N., 1971. Rumen microorganisms. *Progress in Industrial Microbiology*, 9: 42–77.
- HOBSON, P.N. 1988. The Rumen Microbial Ecosystem. Elsevier Applied Sci. London and New York.
- HOBSON, P.N. 1989. *The Rumen Microbial Eco-system*, Elsevier Applied Science, London.
- HOBSON, P.N. AND WALLACE, R.J. 1982. Microbial ecology and activities in the rumen, part 1. *Critical Reviews in Microbiology*, 9: 165–225.
- HOFFMANN, C., EVANS, C.A. 1911. The use of spices as preservatives. *J. Ind. Eng. Chem.* 3:835–838.
- HOOVER, W.H., STOKES, S.R. 1991. *Balancing carbohydrates and proteins for optimum Rumenmicrobial yield*. *J. Dairy Sci.*, 74:3630- 3644
- HUNGATE, R.E. 1966. The Rumen And Its Microbes. Academic Pres Inc., London Ltd., U.K.
- JAMES, T.Y., LETCHER, P.M., LONGCORE, J.E., MOZLEY-STANDRIDGE, S.E., PORTER, D., POWELL, M.J., GRIFFITH, G.W., VILGALYS, R. 2006. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and a proposal for a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* 98: 860–871.
- JEFFRIES, W.T. 1990. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation* 1: 163–196.
- KAMRA, D.N. 2005. Rumen Microbial Ecosystem, *Current Science*, Vol. 89, No (1): 124–135.
- KIVAIISI, A.K., OP DEN CAMP, H.J.M., LUBBERDING, H.J., BOON, J.J., VOGELS, G.D. 1990. Generation of soluble lignin-derived compounds during degradation of barley straw in a artificial rumen reactor. *Applied. Microbiology. Biotechnology*. 33: 93–98.
- KOÇAK, R., BOYRAZ, N. 2006. Bazı Bitki Uçucu Yağlarının Fungisidal ve Fungistatik Etkileri. *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 20 (38):76–81.
- KULOĞLU, R. 2007. Tanık Asitin Rumen Bakterilerinin Bazı Fibrolitik Enzimlerine Etkisi K.S.Ü. Yüksek Lisans Tezi, K.Maraş, 37s
- LAM, T.B.T., LIYAMA, K., STONE, B. A. 1992. Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and phalaris internodes *Phytochemistry* 31:1179–1183.
- LEE, S.E., HWANG, H.J., HA, J.S., JEONG, H.S., KIM, J. H. 2003. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sci.* 73:167–179.
- 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.
- LI, J., HEATH, I.B., PACKER, L. 1993. The phylogenetic relationships of the anaerobic chytridiomycetous gut fungi (Neocallimasticaceae) and the chytridiomycota. II. Cladistic analysis of structural data and description of the Neocallimasticales ord. nov. *Can. J. Bot.* 71: 393–407.
- LI, J., HEATH, I.B. 1993. Chytridiomycetous gut fungi, oft overlooked contributors to herbivore digestion. *Can. J. Microbiol.* 39:1003.
- LIEBETANZ, E. 1910. Die parasitischen protozoen des wiederkauermagens. *Archiv für Protistenk.*, 19: 19–80.
- LOWE, S.E., THEODOROU, M.K., TRINCI, A.P.J. 1987a. Growth and fermentation of an anaerobic Rumen fungus on various carbon sources and effect of temperature on development. *Applied Environmental Microbiology* 53, 12 10–121 5.

- _____. 1987b. Isolation of anaerobic fungi from saliva and faeces of sheep. Journal of General Microbiology, 133: 1829- 1834.
- _____. 1987c. Cellulases and xylanases of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose and xylan. Applied and Environmental Microbiology. 53: 1216–1223.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, M.J., FARR, A.L., RANDERL, R.J. 1951. Protein Measurement With Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193: 265–275.
- LYND, L.R., WEIMER, P.J., VANZYL, W.H., PRETORIUS, I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology, Microbiology And Molecular Biology Reviews, 66, 506–577.
- MACZULAK, A.E., DEHORITY, B.A., PALMQUIST, D.L. 1981. Effects of long-chain fatty acids on growth of rumen bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 42:856–862.
- MAIJALA, P. 2000. *Heterobasidion Annosum* and Wood Decay: Enzymology of Cellulose, Hemicellulose, and Lignin Degradation. Department of Biosciences, Division of Plant Physiology University of Helsinki, 90p, Helsinki.
- MAKKAR, S.P.H. 1987. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds Small Ruminant Research 49 (2003) 241–256
- MARAŞ, M., ÇAVUŞOĞLU, K., AKSÖZ, E., KIRINDI, T. 2004. Pektin, Poligalakturonik Asit ve Liyofilize Pektinaz Enziminin Yapısal Analizi. İTÜ Dergisi/C Fen Bilimleri Cilt:2, Sayı:1, 3–10
- MARCHESSAULT, R.H., SUNDARARAJAN, P.R. 1983. Cellulose in The Polysaccharides, Ed. Go. Aspinall. 2: 11–95.
- McINTOSH, F.M., WILLIAMS, P., LOSA, R., WALLACE, R.J., BEEVER, D.A., NEWBOLD, C.J. 2003. Effects of Essential Oils on Ruminant Microorganisms and Their Protein Metabolism. Applied and Environmental Microbiology, p. 5011–5014, Vol.69, No.8
- McSWEENEY, C.S., DULIEU, A., KATAYAMA, Y., LOWRY, J.B. 1994. Solubilization of lignin by ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix patriciarum*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2985–2989.
- MILLER, G.L. 1959. Use Of Dinitrosalicylic Acid Reagent For Determination Of Reducing Sugars. Anal. Chem. 31: 426–428.
- 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. Experimental Mycology, 13: 27–37.
- MIN, B. R., BARRY, T.N., ATTWOOD, G.T., MCNABB, W.C. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperature forages: A review. Anim. Feed Sci. Technol. 106:3–19.
- MOLERO, R., IBARS, M., CALSAMIGLIA, S., FERRET, A., LOSA, R. 2004. Effects of a Specific Blend of Essential Oil Compounds on Dry Matter and Crude Protein Degradability in Heifers Fed Diets with Different Forage to Concentrate Rations. Anim. Feed Sci. And Tech. (114):91–104.
- MOUNTFORT, D.O., ASHER, R.A. 1988. Production of α -amylase by the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis*. Appl. Environ. Microbiol. 54:2293–2299.
- MOUNTFORT, D.O., ASHER, R.A. 1989. Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1016–1022.

- MUNN, E.A. 1994. The ultrasutstructure of anaerobic fungi. In The Anaerobic Fungi, pp. 47–105 [C.G. Orpin and D.O. Mountfort, editors]. New York: Marcel Dekker.
- NAGY, J.G., TENGEDY, R.P. 1968. Antibacterial action of essential oils of *Artemisia* as an ecological factor. II. Antibacterial action of the volatile oils of *Artemisia tridentata* (big sagebrush) on bacteria from the rumen of mule deer. Appl. Microbiol. 16, 441–444.
- NIELSEN, B.B., ZHU, W.Y., TRINCI, A.P.J., THEODOROU, M.K. (1995). Demonstration of zoosporangia of anaerobic fungi on plant residues recovered from faeces of cattle. *Mycological Research* 99, 471–474.
- NORDKVIST, E. 1987. Composition and Degradation Of Cell Walls In Red Clover, Lucerne And Cereal Straw. The Swidish University, Agricultural Science. Uppsala
- O'FALLON, J. V., WRIGHT, R. W., CALZA, R. E. 1991. Glucose metabolic pathways in the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis* EB 188. Biochemical Journal 274, 595–599.
- OH, H.K., SAKAI, T., JONES, M.B., LONGHURST, W.M. 1967. Effect of various essential oils isolated from Douglas fir needles upon sheep, deer rumen microbial activity. Appl. Microbiol. 15, 777–784.
- ORPIN, C.G. 1974. The rumen flagellates *Callimastix frontalis* and *Monas communis*-zoospores of phycomycete fungi. Journal of Applied Bacteriology 37: IX-X.
- ORPIN, C.G. 1975. Studies in the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. J. Gen. Microbiol., 1975, 91, 249–262.
- ORPIN, C.G. 1976. Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. J. Gen. Microbiol. 94: 270–280.
- ORPIN, C.G. 1977. The occurrence of chitin in the cell walls of the rumen organisms *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and *Sphaeromonas communis*. J. Gen. Microbiol., 1977a, 99, 215–218.
- ORPIN, C.G. 1977a. The rumen flagellate *Piromonas communis*: Its life history and invasion of plant material in the rumen. J. Gen. Microbiol. 99:107.
- ORPIN, C.G., LETCHER, A.J. 1979. Utilization Of Cellulose, Starch, Xylan And Other Hemicelluloses For Growth By The Rumen Phycomycete *Neocallimastix Frontalis*. Curr. Microbiol. 3: 121–124.
- ORPIN, C.G. 1984. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. Anim. Feed. Sci. Technol. 10: 121–143.
- ORPIN, C.G. 1988. Nutrition and biochemistry of anaerobic Chytridiomycetes. BioSystems. 21:365.
- ÖZCAN, N., UYARLAR, A. 1996. *Bacillus subtilis* α -Amilaz Geninin *Escherichia coli*'de Klonlanarak Rekombinant α -Amilaz Enziminin Üretimi. Ç.Ü.Z.F. Dergisi, 11(4): 175–182.
- OZKOSE, E. 2001. Morphology and molecular ecology of rumen fungi. PhD thesis, University of Wales, Aberystvyth, UK
- OZKOSE, E., THOMAS, B.J., DAVIES, D.R., GRIFFITH, G.W., THEODOROU, M.K. 2001. *Cyllamyces aberensis* gen. nov. sp. nov., anew anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. Can. J. Bot. 79: 666–673.
- ÖZKÖSE, E., EKİNCİ, M.S., AKYOL, İ. 2003. Biyoteknolojik Potansiyel Olarak Anaerobik Funguslar: Kültüre Alınmaları ve Morfolojileri. KSU Fen ve Mühendislik Dergisi, 6(1): 129–139.

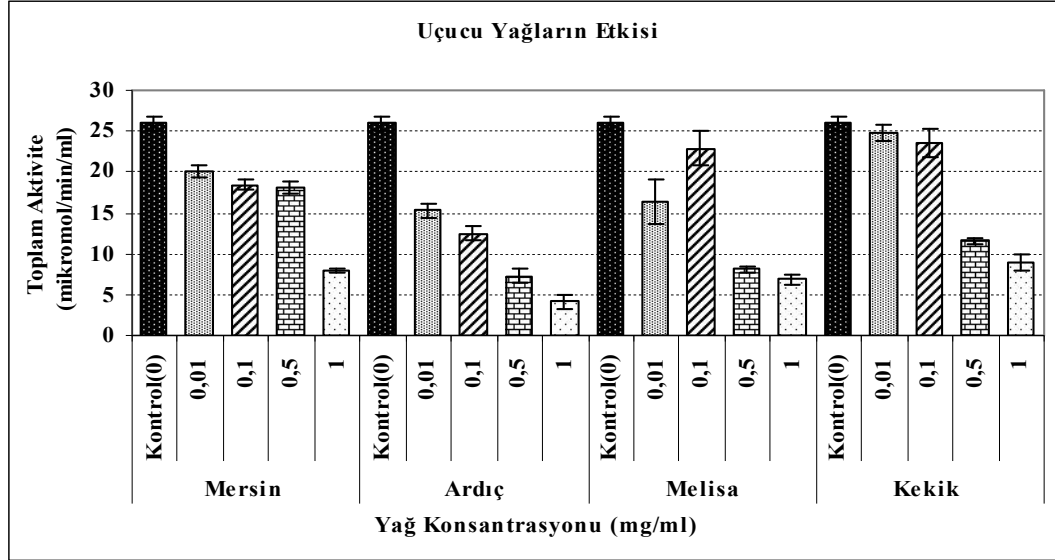
- PANIZZ, L., FLAMINI, G., CIONI, P.L., MORELI, I. 1993. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean *Lamiaceae*. *J. Ethnopharmacol.* 39, 167–170.
- PAUL, S.S., KAMRA, D.N., SASTRY, V.R.B., SAHU, N.P., KUMAR, A. 2003. Effect of phenolic monomers on growth and hydrolytic enzyme activities of an anaerobic fungus isolated from wild nilgai (*Boselaphus tragocamelus*). *Lett. Appl. Microbiol.*, 2003, 36, 377–381.
- PEARCE, P.D., BAUCHOP, T. 1985. Glycosidases of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* grown on cellulosic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1265.
- PETTIPHER, G.L., LATHAM, M.J. 1979. Production of enzymes degrading plant cell walls and fermentation of cellobiose by *Ruminococcus flaeifaciens* in batch and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 110:29–38.
- PÉREZ, J., MUÑOZ-DORADO, J., DE-LA-RUBIA, T., MARTÍNEZ, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol* 53–63.
- PHILLIPS, M.W., GORDON, G.L.R. (1988). Sugar and polysaccharide fermentation by anaerobic fungi from Australia, Britain and New Zealand. *Biosystems* 21, 377–383.
- PHILLIPS, M.W. 1989. Unusual rumen fungi isolated from northern Australian cattle and water buffalo. In: Nolan, J.V., R.A. Leng and D.I. Demeyer. (eds.). *The role of protozoa and fungi in ruminant digestion*. pp. 247–249. Peambur Books, Armidale, Australia.
- PIACENTE, S., PIZZA, C., OLESZEK, W. 2005. Saponins and phenolics of *Yucca schidigera* Roetz: Chemistry and bioactivity. *Phytochem. Rev.* 4:177–190.
- PRINS, R.A. 1977. Biochemical activities of gut micro-organisms, p. 73–173. In R. T. J. Clarke and T. Bauchop (ed.), *Microbiol ecology of the gut*. Academic Press, Inc. (London), Ltd., London.
- RASMUSSEM, M., FRANKLIN, S., MCNEFF, C., CARLSON, S. 2005. Control of pathogens using defaunation. In: *Proceedings of the Third International Conference on Enteric Diseases: Strategies in the Prevention of Enteric Disease and Dissemination of Food-Bourne Pathogens*, Rapid City, South Dakota, USA.
- RASOOLI, I., REZAEI, M.B., ALLAMEH, A. 2006-a. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International J. of Infections Diseases* 10(3)236–241
- 2006-b. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock* *Food Control* 17(5)359–364.
- REDDY, L., ODHAV, B., BHOOLA, K.D. 2003. Natural products for cancer prevention: A global perspective. *Pharmacol. Therap.* 99:1–13.
- REZAINAN, M., BEAKES, G.W., CHAUNDLURY, A.S. 2005. Relative fibrolytic activities of anaerobic fungi on untreated and sodium hydroxide treated barley straw in vitro culture. *Anaerobe* 11 :163–175.
- ROMBOUTZ, F.M., PILNIK, W. 1980. Pectic Enzymes, *Economic Microbiology*, A. H. Rose (Eds.), Academic Press, London, 33, 227–382.
- RUSSELL, J.B., STROBEL, H.J. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1–6.
- RUTHERFORD, D.W., WERSHAW, R.L., COX, L.G. 2005. Changes in Composition and Porosity Occurring During the Thermal Degradation of Wood and Wood

- Components. U.S. Geological Survey, Reston, Virginia. Scientific Investigations Report 2004-5292.
- SANGWAN, N.S., FAROOQI, A.H.A., SHABIH, F., SANGWAN, R.S. 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Reg.* 34:3-21.
- SARKANEN, K.V., LUDWIG, C.H. 1971. Definition and Nomenclature. In: *Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions*. Wiley Interscience, pp.95-163, New York.
- SARTORATTA, A., MACHADO, A.L., DELARMELINA, C., FIGUERIA, G.M., DUARTE, M.C.T., REHDER, V.L.G. (2004). Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Aromatic Plants Used in Brazil, 35: 275-280.
- SCALBERT, A., MONTIES, B., LALLEMAND, J.Y., GUITTET, E., ROLANDO, C. 1985. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry* 24:1359-1362.
- 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
- SHOHAM, Y., SHALLOM, D. 2003. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6:219-228.
- STRAYER, L. 1981. *Biochemistry*, (Second Edition). W.H. Freeman and Company, New York.
- SUNNA, A., ANTRANIKIAN, G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17, 39-67.
- SUSMEL, P., STEFANON, B. 1993. Aspects of lignin degradation by rumen microorganisms. *J. Biotechnology*. 30:141.
- TAMMINGA, S. 1996. A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. *J. Anim. Sci.* 74:3112-3124.
- THEODOROU, M.K., LOWE, S.E., TRINCI, A.P.J. 1988. The fermentative characteristics of anaerobic rumen fungi. *BioSystems*. 21:371.
- THEODOROU, M.K., LONGLAND, A.C., DHANOA, M.S., LOWE, S.E., TRINCI, A.P.J. 1989. Growth of *Neocallimastix* spp. Strain R1, on Italian grass hay removal of neutral sugars from plant cell walls. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1363-1367.
- THEODOROU, M.K., ZHU, W.Y., RICKERS, A., NIELSEN, B.B., GULL, K., TRINCI, A.P.J. 1996. Biochemistry and ecology of anaerobic fungi. In: *The Mycota: VI Human and Animal Relationship*. (Ed. D.H. Howard ve J.D. Miller), Springer-Verlag, New York, pp. 265-295.
- THOMPSON, D.P., CANNON, C. 1987. Mycoassay of fluorescent fractions from seven essential oils. *Bull. Environ. Contam. Tox.*, 39: 688-695.
- TROUILLAS, P., CALLISTE, C.A., ALLAIS, D.P., SIMON, A., MARFAK, A., DELAGE, C., DUROUX, J.L. 2003. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chem.* 80:399-407.
- ULTEE, A., BENNIK, M.H.J., MOEZELAAR, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1561-1568.
- ÜNAY, E., YAMAN, S., KARAKAŞ, V. 2008. Ruminantlarda Selülozun Sindirimi. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Dergisi* 2008, 48 (2) 93-99

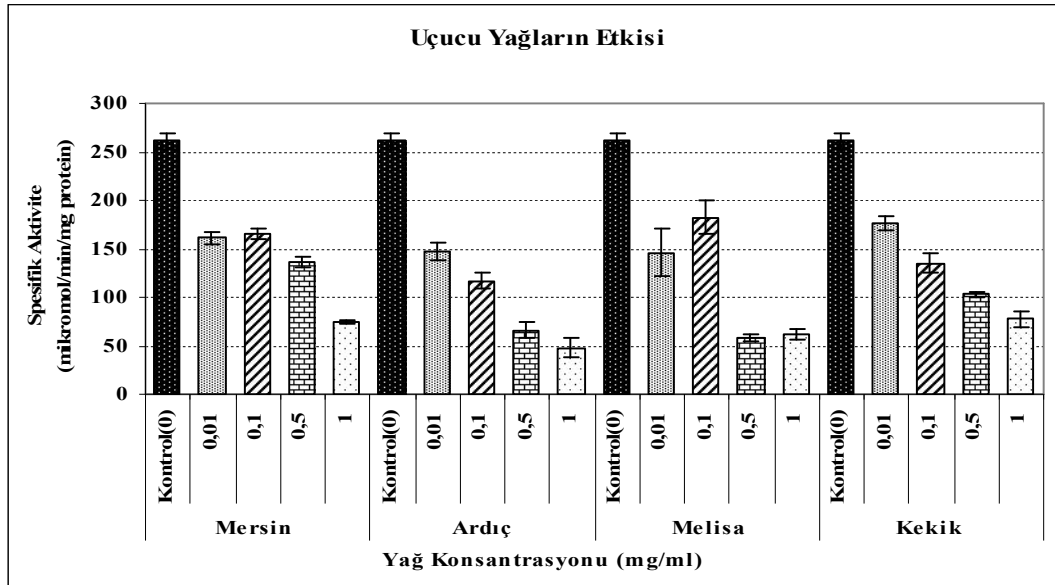
- VAN NEVEL, C. J., DEMEYER, I. 1988. Manipulation of Rumen Fermentation. Pages 387–443 in *The Rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson, ed. Elsevier Applied Science, New York, NY.
- WALLACE, R.J., JOBLIN, K.N. 1985. Proteolytic activity of a rumen anaerobic fungus. *FEMS Microbiol. Lett.* 29:19.
- WALLACE, R.J., Mc EWAN, N.R., Mc INTOSH, M., TEFEREDEGNE, B., NEWBOLD, C.J. 2002. Natural Products as Manipulators of Rumen Fermentation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol.(15), No;10, 1458–1468.
- WEGENER, G., FENGEL, D. 1983. Lignin Makromolekül, Zellwandkomponente Rohstoff, Das Papier 10A: V22-V31.
- WILLIAMS, A.G., ORPIN, C.G. 1987a. Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative growth stages of the rumen fungi *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and an unidentified isolate grown on a range of carbohydrate substrates, *Can. J. Microbiol.*, 33 (5), 427-434.
- _____. 1987b. Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi on a range of carbohydrate substrates. *Can. J. Microbiol.* 33: 418–426.
- WILLIAMS A.G. 1988. Factors affecting the formation of polysaccharide-degrading enzymes by Rumen micro-organisms. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 21:191
- WILSON, C.A., WOOD, T.M. 1992. Studies on the cellulase of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*, with special reference to the capacity of the enzyme to degrade crystalline cellulose. *Enzyme Microb. Technol.* 14:258.
- WHISTLER, R., BEMILLER, J.N. 1997. Carbohydrate Chemistry for Food Scientists. Chapter 7 - Cellulose. Eagan Press, St Paul, MN.
- WHITE, B.A., MACKIE, R.I., DOERNER, K.C. 1993a. Enzymatic hydrolysis of forage cell walls. In *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. (Eds. H. G. Jung, D. D. Buxton, R. D. Hatfield and Ralph) pp. 455–484. ASA-CSSA-SSSA Madison, USA.
- WILSON, J.R. 1994. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. *J. Agric. Sci. (Camb.)*. 122:173.
- WOOD, T.M., WILSON, C.A., MCCREA, S.I., JOBLIN, K.N. 1986. A highly active extracellular cellulose from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. *FEMS Microbiology Letter*, 34: 37–40.
- WOOD, T.M. 1989. Mechanism of cellulose degradation by enzymes from aerobic and anaerobic Fungi. In “*Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation*”, pp: 17–35. M.P. Coughlan. (ed.). London and New York; Elsevier Applied Science Publishers.
- YANKE, L.J., SELINGER, L.B., LYNN, J.R., CHENG, K.J. 1996. Comparison of the influence of carbon substrates on the fibrolytic activities of anaerobic rumen fungi. *Anaerobe*, 2: 373–378.
- YARLETT, N., ORPIN, C.G., MUNN, E.A., YARLETT, N.C., GREENWOOD, C.A. 1986. Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochemistry Journal*. 236: 729–739.

EKLER

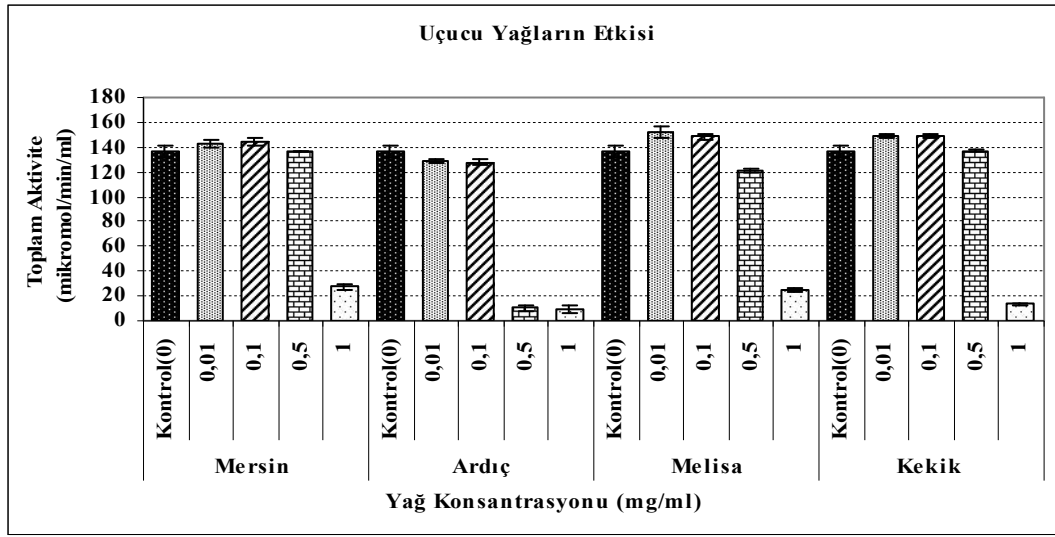
Ayrıca yapılan analizler sonucunda belirlenen toplam ve spesifik aktiviteler grafiklerle de aşağıda belirtilmiştir.



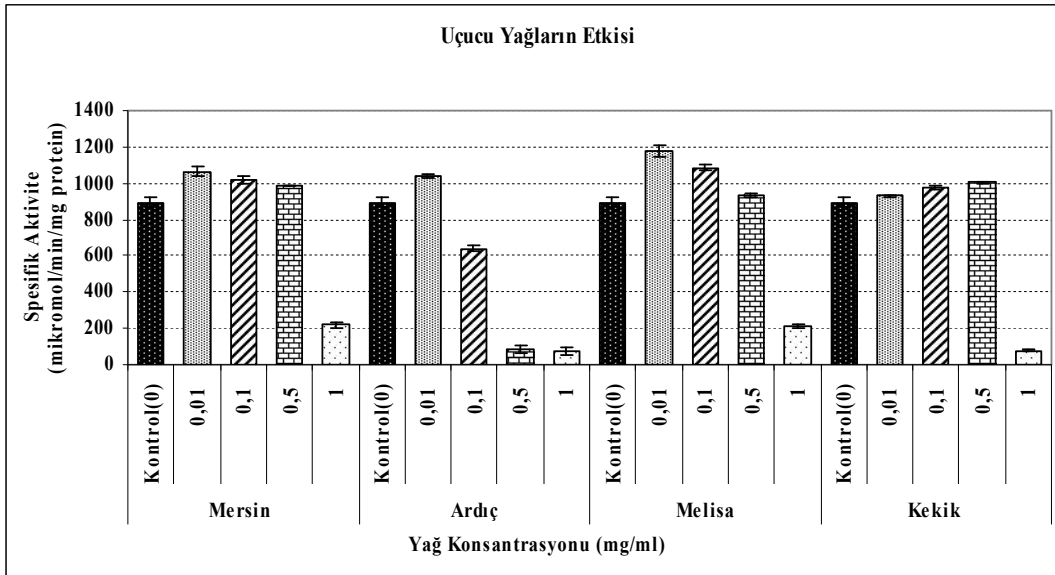
Ek Şekil 1. Uçucu yağ uygulaması sonrasında *Neocallimastix* sp. GMLF2'nin toplam KMSaz aktivite grafiği.



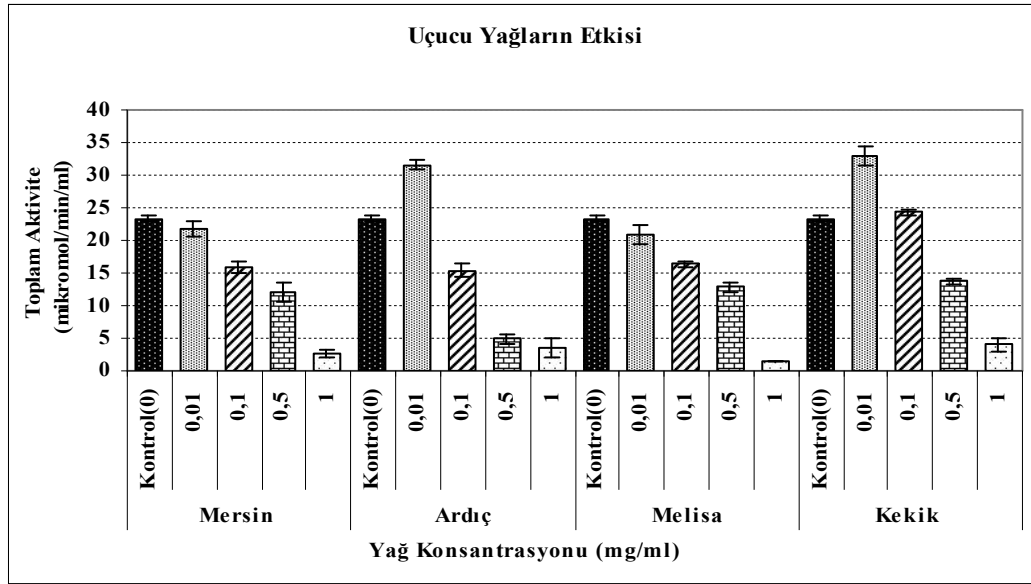
Ek Şekil 2. Uçucu yağ uygulaması sonrasında *Neocallimastix* sp. GMLF2'nin spesifik KMSaz aktivite grafiği.



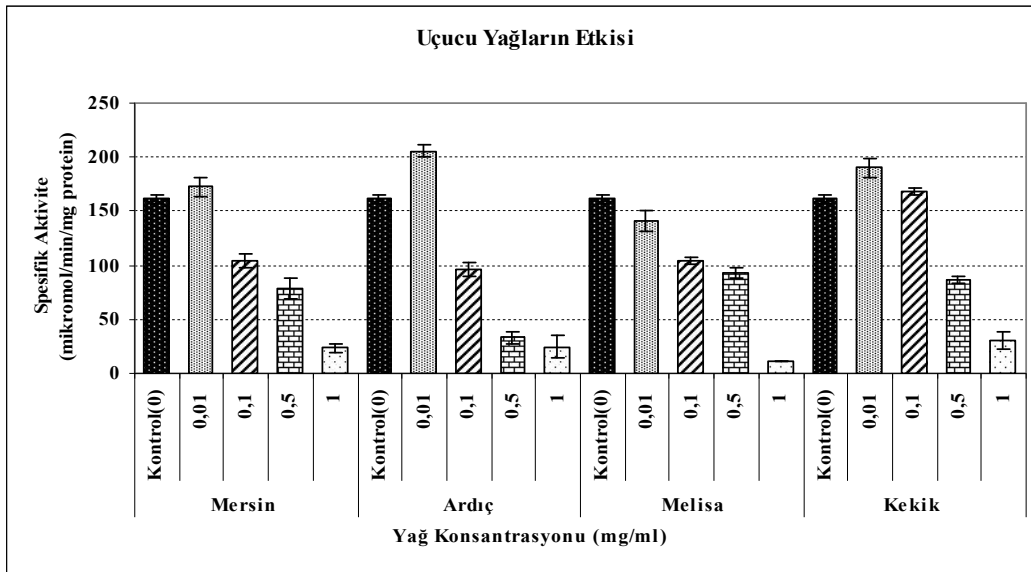
Ek Şekil 3. Uçucu yağ uygulaması sonrasında *Neocallimastix* sp. GMLF2'nin toplam ksilanaz aktivite grafiği.



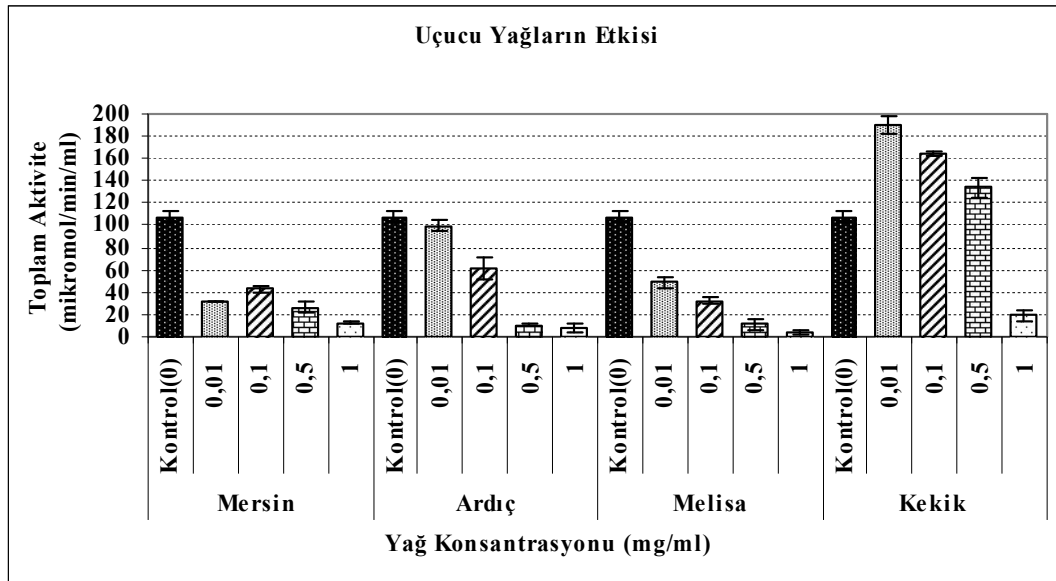
Ek Şekil 4. Uçucu yağ uygulaması sonrasında *Neocallimastix* sp. GMLF2'nin spesifik ksilanaz aktivite grafiği.



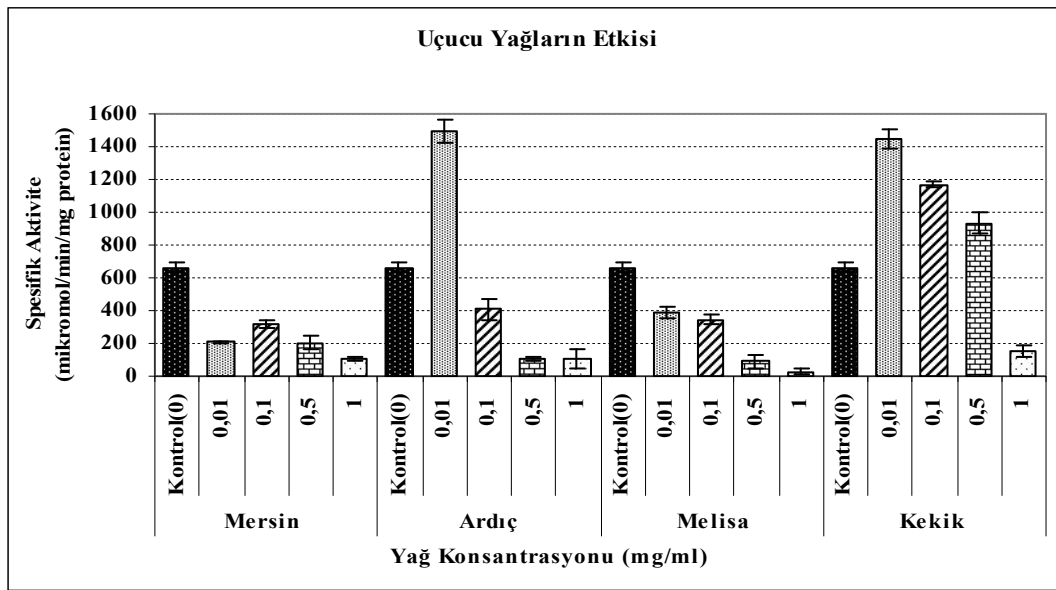
Ek Şekil 5. Uçucu yağ uygulaması sonrasında *Orpinomyces* sp. GMLF18'in toplam KMSaz aktivite grafiği.



Ek Şekil 6. Uçucu yağ uygulaması sonrasında *Orpinomyces* sp. GMLF18'nin spesifik KMSaz aktivite grafiği.



Ek Şekil 7. Uçucu yağ uygulaması sonrasında *Orpinomyces* sp. GMLF18'in toplam ksilanaz aktivite grafiği.



Ek Şekil 8. Uçucu yağ uygulaması sonrasında *Orpinomyces* sp. GMLF18'in spesifik ksilanaz aktivite grafiği.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Adana'nın Tufanbeyli ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini tamamladıktan sonra 2000 yılında Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Hayvansal Üretim Bölümünde başladığı lisans öğrenimini 2004 yılında Ziraat Mühendisi ünvanıyla tamamladı. 2006 yılında Kahramanmaraş Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne atandı. 2007 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootehni Anabilim Dalında yüksek lisans yapmaya başladı. Halen Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğündeki görevine devam etmektedir.