



T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RUMENDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERDEN
 α -AMİLAZ VE LİKENAZ GENLERİNİN
KLONLANMASI, GENLERİN VE ENZİMLERİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

DİLEK ÖZGÜN EKİZ

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK VE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2017

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RUMENDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERDEN
 α -AMİLAZ VE LİKENAZ GENLERİNİN
KLONLANMASI, GENLERİN VE ENZİMLERİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

DİLEK ÖZGÜN EKİZ

Bu tez,
Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalında
DOKTORA
derecesi için hazırlanmıştır.

KAHRAMANMARAŞ 2017

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Dilek ÖZGÜN EKİZ tarafından hazırlanan “RUMENDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERDEN α -AMİLAZ VE LİKENAZ ENZİMLERİNİN KLONLANMASI, GENLERİN VE ENZİMLERİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU” adlı bu tez, jürimiz tarafından 15/12/2017 tarihinde oy birliği / oy çokluğu ile Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ashabil AYGAN (DANIŞMAN)

.....

Biyomühendislik ve Bilimleri, KSÜ

Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN (ÜYE)

.....

Biyoloji Bölümü, OKÜ

Yrd. Doç. Dr. Makbule BAYLAN (ÜYE)

.....

Su Ürün. Temel Bil., ÇÜ

Yrd. Doç. Dr. Nazan ÇÖMLEKCİOĞLU (ÜYE)

.....

Biyoloji Bölümü, KSÜ

Yrd. Doç. Dr. Hüseyin TANIŞ (ÜYE)

.....

Biyoloji Bölümü, KSÜ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Mustafa ŞEKKELİ

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

Dilek ÖZGÜN EKİZ



Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 2014/3-37D

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.

**RUMENDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERDEN α -AMİLAZ VE
LİKENAZ GENLERİNİN KLONLANMASI, GENLERİN VE
ENZİMLERİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU
(DOKTORA TEZİ)**

DİLEK ÖZGÜN EKİZ

ÖZET

Rumen bakterileri yüksek aktivite ve geniş biyokütlesi sebebiyle, ruminant besinlerinin biyolojik parçalanmasında önemli bir göreve sahiptir. Bu çalışmada, rumen bakterileri rumen içeriği, rumen sıvısı ve ruminant dışkı örneklerinden izole edilmiş ve 16S rRNA geninin sekansı ile tanımlanmıştır. Tanımlanan bu bakteriler arasından, *S. bovis* RB4 ve *Bacillus licheniformis* RB16 suşları seçilmiş ve bu suşların enzim genleri çalışılmıştır. *S. bovis* RB4'ün amilaz ve *B. licheniformis* RB16'nın likenaz kodlayan genleri, tasarlanan primerlerinin yardımıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tarafından amplifiye edilmiştir. Bu genler pGEMT-Easy vektörüne klonlanmış ve *Escherichia coli* DH5 α 'da eksprese edilmiştir. Klonlanan enzim genlerinin moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. α -Amilaz geni (*amy1A*) 1640 bp uzunluğunda ve Alpha Amilaz Katalitik alana ait iki açık okuma çerçevesi (ORF) içermektedir. Bununla beraber, bu iki ORF ayrı ayrı aktivite göstermemiştir. Dolayısıyla, bunların birbirini tetiklediği düşünülmüştür. Likenaz geni (*lic1A*) 650 bp uzunluğunda ve glikozil hidrolaz 16 ailesine ait tek ORF içermektedir. Hücresel aktivite gösteren Amy1A amilaz ve Lic1A likenaz enzimlerinin optimum sıcaklık, pH, termal ve pH stabilitesi çalışılmıştır. Amy1A'nın optimum sıcaklığı 40 °C, pH'ı ise 7.5 olarak belirlenmiştir. Amy1A enzimi ince tabaka kromatografisi ile nişastayı glikoza kadar hidrolize etmiş ve amilaz enziminin SDS-PAGE'de moleküler ağırlığı 31.30 kDa olarak belirlenmiştir. Lic1A likenazın optimum enzim aktivitesi 45 °C ve 7.5 pH'da görülmüştür. Lic1A ince tabaka kromatografisinde likenanı parçalamıştır. Lic1A likenaz enziminin SDS-PAGE analizinde moleküler ağırlığı 26.97 kDa olarak tespit edilmiştir. Ek olarak ruminant dışkı örnekleri için ekonomik, kolay, yüksek DNA verimine sahip optimum metagenomik DNA izolasyon protokolü belirlenmeye çalışılmıştır. Bu protokolün belirlenmesi ile ticari kitlere olan bağımlılık azalacak ve ülke ekonomisine katkıda bulunulacaktır. Dolayısıyla, optimum metagenomik DNA izolasyonun protokolünün belirlenmesi büyük bir önem oluşturmaktadır. İleriki çalışmalarda metagenomik DNA'lar kullanılarak elde edilen enzim genlerinin tam sekanslarının belirlenmesi ve karakterizasyonunun yapılması amaçlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Rumen bakterisi, α -Amilaz, Likenaz, Enzim aktivitesi, Metagenomik DNA, Enzim geni

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalı, Aralık / 2017

Danışman: Doç. Dr. Ashabil AYGAN

Sayfa sayısı: 170



**CLONING OF α -AMYLASE AND LICHENASE GENES OF
BACTERIA ISOLATED FROM RUMEN, MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF GENES AND ENZYMES
(Ph.D. THESIS)**

DİLEK ÖZGÜN EKİZ

ABSTRACT

Rumen bacteria have important roles in the biodegradation of feeds ruminant due to high activity and large biomass. In this study, rumen bacteria were isolated from rumen content, rumen liquid and stool samples of ruminant and identified by sequencing of 16S rRNA gene. Among identifying these bacteria, *S. bovis* RB4 and *Bacillus licheniformis* RB16 strains were selected and enzyme genes of these strains were studied. The genes encoding amylase of *S. bovis* RB4 and lichenase of *B. licheniformis* RB16 were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the aid of designing primers. These genes were cloned into pGEMT-Easy vector and expressed in *Escherichia coli* DH5 α . Molecular characterization of the cloned enzyme genes were performed. The α -amylase gene has 1640 bp and contains two open reading frames (ORFs) belongs to Alpha Amylase Catalytic domain. However, these two ORFs did not indicate individual activities. Therefore, they are thought to trigger each other. The lichenase gene (*lic1A*) has 650 bp and contains an ORF belongs to glycosyl hydrolase family 16. Optimum temperature, pH, thermal and pH stability of intracellular Amy1A amylase and Lic1A lichenase enzymes were studied. The optimum temperature and pH for Amy1A activity was 40 °C and 7.5, respectively. Amy1A enzyme was hydrolyzed starch by thin layer chromatography to glucose and molecular weight of the amylase enzyme was determined as 31.30 kDa on SDS-PAGE. The optimum enzyme activity of Lic1A lichenase was obtained at 45 °C, pH 7.5. Lic1A was hydrolyzed lichenen by thin layer chromatography. Molecular weight of the Lic1A lichenase enzyme was detected as 26.97 on SDS-PAGE. Otherwise, the optimum metagenomic DNA isolation protocol as economic, simple, high DNA yields was determined for stool samples of ruminants. This protocol will decrease dependence to commercial kits and contribute to the economy of the country. Therefore, the optimization of metagenomic DNA isolation protocol is very important. *Subsequently*, determination of the complete sequences of isolated enzyme genes from metagenomic DNA and characterization of these genes is aimed.

Key Words: Rumen bacteria, α -Amylase, Lichenase, Enzyme activity, Metagenomic DNA, Enzyme gene

Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Bioengineering and Sciences, December / 2017

Supervisor: Doç. Dr. Ashabil AYGAN

Page number: 170



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında bilgi, tecrübe ve fikirlerinden destek aldığım başta danışman hocam Doç. Dr. Ashabil AYGAN'a, manevi desteği ve fikirleriyle katkılarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Nazan ÇÖMLEKCİOĞLU ve Doç. Dr. Uğur ÇÖMLEKCİOĞLU hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'ndaki her türlü destek ve arkadaşlıkları için Sevtap SARITÜRK, Mehtap KUTLU, İlhami KENGER ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma, bilgi ve zamanını benimle paylaşan Arş. Gör. Ferit Can YAZDIÇ'a ve Zootečni Bölümü BİGEM Laboratuvarı çalışanlarına çok teşekkür ederim. Ayrıca yardımlarını ve güler yüzünü eksiz etmeyen fakültemizin personeli Neşat AKÇADAĞ'a teşekkür ederim.

Bu çalışmanın finansal desteğini sağlayan Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Hayatımın her anında destek, ilgi, bilgi ve deneyimleriyle yanımda olan annem, babam, kardeşlerim ve eşim Aydın EKİZ'e sonsuz teşekkür ederim.

DİLEK ÖZGÜN EKİZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1.GİRİŞ	1
1.1. Rumen.....	1
1.2. Rumen Mikrobiyal Ekosistemi.....	2
1.2.1. Rumen arkeaları	2
1.2.2. Rumen protozoaları	3
1.2.3. Rumen fungusları	4
1.2.4. Rumen bakteriyofajları	4
1.2.5. Rumen bakterileri.....	5
1.2.5.1.Karbonhidrat metabolizması.....	8
1.2.5.2.Protein metabolizması	9
1.2.5.3.Rumen bakterilerin dışkı ve gastrointestinal sistemde bulunması.....	11
1.2.5.4.Rumen bakterilerinin ruminal mikroorganizmalarla etkileşimi.....	13
1.3. Bitki Hücre Duvarının Yapısı	15
1.3.1.Selüloz	16
1.3.2.Hemiselüloz	18
1.3.3.Lignin	18
1.3.4.Pektin	19
1.3.5.Protein.....	21
1.4. Likenan	21
1.5. Nişasta.....	22
1.6. Bitki Hücre Duvarının Parçalanması.....	22
1.7.Rumen Bakterilerinin Enzim Sistemleri	23
1.7.1. Selülozlar	24
1.7.2. Ksilanazlar	25
1.7.3. Likenazlar	26
1.7.4. Amilazlar	26
1.8. Rumen Bakterilerinin Enzim Genetiği	28
1.9. Metagenomik.....	30
1.10. Metagenomik DNA	33
1.11. Çalışmanın Kapsamı.....	35
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	37
2.1. Rumen Bakterilerinin Biyolojisi Üzerine Çalışmalar.....	37
2.2. Rumen Bakterilerinin Enzimatik Özellikleri Üzerine Çalışmalar.....	39

2.3. Rumen Bakterilerinin Genetiği Üzerine Çalışmalar.....	42
2.4. Ruminal Kökenli Metagenomik Çalışmalar	45
3. MATERYAL VE METOT.....	49
3.1. Rumen Bakterilerinin İzolasyonu.....	49
3.1.1. Anaerobik besiyerinin hazırlanması.....	49
3.1.2. Rumen sıvısının toplanması, hazırlanması ve saklanması.....	51
3.1.3. Dışkı örneğinin toplanması.....	51
3.1.4. Rumen içeriğinin toplanması	52
3.1.5. Bakteri izolasyonu.....	52
3.1.6. Bakterilerin saflaştırılması.....	53
3.1.7. Bakterilerin stoklarının oluşturulması	53
3.2. Kullanılan Bakteriler ve Büyüme Koşulları.....	54
3.2.1. Konak bakteri.....	54
3.2.2. Transformant bakteri	54
3.2.3. Antibiyotik	55
3.2.4. Kullanılan besiyerleri ve inkübasyon şartları	55
3.3. Moleküler Biyoloji Metotları	55
3.3.1. Genomik DNA izolasyonu.....	55
3.3.2. Oligonükleotid primerler	56
3.3.2.1. 16S rRNA gen bölgesi primerleri	56
3.3.2.2. Amilaz primerleri.....	57
3.3.2.3. Likenaz primerleri.....	58
3.3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	60
3.3.4. DNA jel elektroforezi	60
3.3.5. pGEM-T klonlama vektörüne ligasyon.....	61
3.3.6. <i>E. coli</i> hücrelerinin kalsiyum klorür metodu ile transformasyonu.....	62
3.3.7. Amilolitik ve likenolitik enzim geni içeren kolonilerin seçilmesi	62
3.3.8. Plazmit DNA izolasyonu	62
3.3.9. DNA dizi analizi.....	63
3.3.10. Filogenetik analiz	63
3.4. Enzim Çalışmaları	63
3.4.1. Enzim ekstraktlarının hazırlanması.....	63
3.4.2. Enzim aktivitelerinin belirlenmesi	64
3.4.3. Optimum pH değerinin saptanması.....	64
3.4.4. Optimum sıcaklık değerinin saptanması.....	65
3.4.5. Enzimlerin termal stabilitelerinin saptanması.....	65
3.4.6. Enzimlerin pH stabilitelerinin saptanması.....	65
3.4.7. Protein tayini	65
3.4.8. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi ve zimogram analizi.....	66
3.4.9. Hidroliz ürünlerinin ince tabaka kromatografisi ile saptanması	68
3.5. Metagenomik Çalışmalar	69
3.5.1. Dışkıdan metagenomik DNA izolasyonu	69
3.5.1.1. Lizis aşaması.....	69
3.5.1.2. Ekstraksiyon aşaması	70
3.5.1.3. Saflaştırma aşaması	71
3.5.2. Ticari kit ile DNA izolasyonu.....	72
3.5.3. Metagenomik DNA konsantrasyonu ve saflıklarının belirlenmesi.....	72
3.5.4. Enzim genlerinin taranması	72

4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	74
4.1. Rumen Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması.....	74
4.1.1. Rumen içeriği, rumen sıvısı, dışkı örnekleri ve bakteri izolasyonu.....	74
4.1.2. Rumen bakterilerinin moleküler olarak tanımlanması.....	76
4.1.2.1. Rumen bakterilerinden DNA izolasyonu.....	76
4.1.2.2. Rumen bakterilerinin 16S rRNA gen bölgesi primerleri ile tanımlanması.....	77
4.2. <i>Streptococcus bovis</i> Amilaz Geninin Klonlanması ve Karakterizasyonu.....	79
4.2.1. <i>Streptococcus bovis</i> amilaz geninin taranması.....	79
4.2.2. Amilaz geninin klonlanması.....	80
4.2.3. <i>amy1A</i> 'nın nükleotid ve amino asit dizisi.....	82
4.2.4. <i>amy1A</i> 'nın filogenetik analizi.....	89
4.2.5. <i>E. coli</i> A1'in amilaz üretimi ve aktivitesi.....	92
4.3. <i>Bacillus licheniformis</i> Likenaz Geninin Klonlanması ve Karakterizasyonu.....	99
4.3.1. <i>Bacillus licheniformis</i> likenaz geninin taranması.....	99
4.3.2. Likenaz geninin klonlanması.....	100
4.3.3. <i>lic1A</i> 'nın nükleotid ve amino asit dizisi.....	102
4.3.4. <i>lic1A</i> 'nın filogenetik analizi.....	105
4.3.5. <i>E. coli</i> L1'in likenaz üretimi ve aktivitesi.....	106
4.4.1. Ruminant dışkı örnekleri.....	112
4.4.2. Optimum metagenomik DNA izolasyonu.....	112
4.4.2.1. Lizis aşamasının belirlenmesi.....	112
4.4.2.2. Ekstraksiyon aşamasının belirlenmesi.....	114
4.4.2.3. Saflaştırma aşamasının belirlenmesi.....	115
4.4.3. Farklı dışkı örneklerinden manual ve ticari kit kullanılarak DNA izolasyonu.....	116
4.4.5. Metagenomik DNA'ların enzim genlerinin taranması.....	119
4.4.6. <i>xyl</i> , <i>6pfl</i> ve <i>gh3</i> 'ün nükleotid ve amino asit dizisi.....	119
4.4.7. Metagenomik DNA'ların filogenetik analizi.....	122
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	126
KAYNAKLAR.....	132
ÖZGEÇMİŞ.....	166

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1.	Bitki hücre duvarı ve içeriğinin yapısı.....	16
Şekil 1.2.	Fiber (selüloz, mikrofibil, hemiselüloz ve lignin) ve fonksiyonel domainlerin selülozik substrat ve birbirleriyle ilişkili şematik görüntüsü.....	17
Şekil 1.3.	Hücre duvarında bulunan pektin, selüloz, hemiselüloz fragmenti ve enzim bölgeleri.....	20
Şekil 1.4.	Rumende karbonhidrat sindiriminde kullanılan enzimlerin yerleri.....	24
Şekil 1.5.	Niştayı parçalayan enzimler.....	27
Şekil 3.1.	Anaerobik besiyerinin hazırlanma aşamasındaki sistemin görüntüsü...	50
Şekil 3.2.	Anaerobik kabin içerisindeki petri kutularına besiyerinin döküldükten sonraki görüntü.....	52
Şekil 3.3.	Hungate tüp içerisinde yer alan dilüsyon yapılmış örneğin enjektör yardımıyla alınması.....	53
Şekil 3.4.	Katı besiyerinde büyüyen tek koloninin alınması.....	54
Şekil 3.5.	pGEM®-T Easy vektör.....	61
Şekil 3.6.	Hücrelerin sıvı azotta dondurulması, hücre kırıcıda öğütülerek parçalanması ve hücre içi materyalin açığa çıkartılması gösterilmiştir.	64
Şekil 3.7.	Farklı BSA konsantrasyonlarındaki kalibrasyon denklemi.....	66
Şekil 3.8.	Zimogram analizinde kullanılan SDS-PAGE sistemi.....	68
Şekil 4.1.	Anaerobik kabin içerisinde karbon kaynağı olarak kazein içeren anaerobik besiyerinde büyüyen bakteriler.....	75
Şekil 4.2.	Rumen bakterilerinden izole edilen DNA'ların agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	76
Şekil 4.3.	27F-1492R primerleri ile yapılan PZR.....	77
Şekil 4.4.	<i>S. bovis</i> RB4 izolatında AmySb primerleri ile yapılan PZR.....	79
Şekil 4.5.	PZR amplifikasyonu ile elde edilen <i>amy1A</i> geni ve pGEM-T vektörüne <i>amy1A</i> 'nın klonlanarak pGEMTA1 plazmidinin oluşturulması.....	80

Şekil 4.6.	pGEMTA1 plazmidinin CaCl_2 metodu ile <i>E.coli</i> DH5 α 'a aktarılmasıyla elde edilen transformant koloni ve saflaştırılmış bakteri <i>E. coli</i> A1.....	81
Şekil 4.7.	<i>E. coli</i> A1'den izole edilen pGEMTA1 plazmidinin M13 primerleri ile gerçekleştirilen PZR görüntüsü.....	82
Şekil 4.8.	<i>amy1A</i> 'nın ileri primer ile elde edilen sekansına ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı.....	82
Şekil 4.9.	<i>S. bovis</i> RB4'ten klonlanan <i>amy1A</i> geni ORF1'in nükleotid ve amino asit dizisi.....	83
Şekil 4.10.	<i>S. bovis</i> RB4'ten klonlanan <i>amy1A</i> geni ORF2'nin nükleotid ve amino asit dizisi.....	84
Şekil 4.11.	Amy1A ORF1'in ve ORF2'nin kesim enzimlerinin bir kısmı ve AmyAc süper aileleri.....	85
Şekil 4.12.	Amy1A ORF1'in diğer amilaz amino asit sekanslarıyla homolojisi....	86
Şekil 4.13.	Amy1A ORF2'nin diğer amilaz amino asit sekanslarıyla homolojisi...	87
Şekil 4.14.	<i>S. bovis</i> RB4 izolatında AmySbF–AmySbR2 primerleri ile gerçekleştirilen PZR.....	87
Şekil 4.15.	<i>S. bovis</i> RB4 izolatında AmySbF2 – AmySbR primerleri ile gerçekleştirilen PZR.....	88
Şekil 4.16.	pGEMTA2 plazmidinin CaCl_2 metodu ile <i>E.coli</i> DH5 α 'a aktarılmasıyla elde koloni (A), pGEMTA3 plazmidinin CaCl_2 metodu ile <i>E.coli</i> DH5 α 'a aktarılmasıyla elde edilen koloni (B).....	88
Şekil 4.17.	<i>Streptococcus</i> türlerine ait amilaz genlerinin <i>amy1A</i> geni ORF1'i ile birlikte filogenetik ağacı.....	90
Şekil 4.18.	<i>Streptococcus</i> türlerine ait amilaz genlerinin <i>amy1A</i> ORF2 ile birlikte filogenetik ağacı.....	91
Şekil 4.19.	Farklı bakteri türlerine ait amilaz genlerinin <i>amy1A</i> geninin ORF1 ve ORF2'si ile birlikte filogenetik ağacı.....	92
Şekil 4.20.	<i>E. coli</i> A1'den elde edilen Amy1A enziminin farklı sıcaklıklardaki aktivitesi.....	93
Şekil 4.21.	<i>E. coli</i> A1'den elde edilen Amy1A enziminin farklı pH aralıklarındaki aktivitesi.....	94
Şekil 4.22.	<i>E. coli</i> A1'den elde edilen Amy1A enziminin termal stabilitesi.....	95
Şekil 4.23.	<i>E. coli</i> A1'den elde edilen Amy1A enziminin pH stabilitesi.....	96

Şekil 4.24.	<i>E. coli</i> A1'e ait enzim örneklerinin zimogram analizi.....	97
Şekil 4.25.	<i>E. coli</i> A1'e ait ince tabaka kromatografi bulguları.....	98
Şekil 4.26.	<i>B. licheniformis</i> RB16 izolatında LicB primerleri ile yapılan PZR.....	99
Şekil 4.27.	PZR amplifikasyonu sonucunda elde edilen <i>lic1A</i> geni ve pGEM-T vektörüne <i>lic1A</i> 'nın klonlanarak pGEMTL1 plazmidinin meydana getirilmesi.....	100
Şekil 4.28.	pGEMTL1 plazmidinin CaCl ₂ metodu ile <i>E.coli</i> DH5α'a aktarılmasıyla elde edilen transformant koloni.....	101
Şekil 4.29.	<i>E. coli</i> L1'den izole edilen pGEMTL1 plazmidinin M13 primerleri ile yapılan PZR görüntüsü.....	101
Şekil 4.30.	<i>lic1A</i> 'nın ileri primer ile elde edilen diziye ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı.....	102
Şekil 4.31.	<i>B. licheniformis</i> RB16'dan klonlanan <i>lic1A</i> geninin nükleotid ve amino asit dizisi.....	103
Şekil 4.32.	Lic1A'nın kesim enzimlerinin bir kısmı ve GH16 ailesi.....	104
Şekil 4.33.	Lic1A'nın diğer amino asit dizileriyle homolojisi.....	105
Şekil 4.34.	<i>Bacillus</i> türlerine ait β-glukanaz ve β-(1,3-1,4) glukanaz genlerinin <i>lic1A</i> ile birlikte filogenetik ağacı.....	106
Şekil 4.35.	<i>E. coli</i> L1'den elde edilen Lic1A enziminin farklı inkübasyon sıcaklıklarındaki aktivitesi.....	107
Şekil 4.36.	<i>E. coli</i> L1'den elde edilen Lic1A enziminin farklı pH aralıklarında gösterdiği aktivite.....	108
Şekil 4.37.	<i>E. coli</i> L1'den elde edilen Lic1A enziminin termal stabilitesi.....	109
Şekil 4.38.	<i>E. coli</i> L1'den elde edilen Lic1A enziminin pH stabilitesi.....	109
Şekil 4.39.	<i>E. coli</i> L1'e ait enzim örneğinin zimogram analizi.....	110
Şekil 4.40.	<i>E. coli</i> L1'e ait ince tabaka kromatografi bulguları.....	111
Şekil 4.41.	Farklı lizis tamponlar kullanılarak belirlenen metagenomik DNA bulguları.....	113
Şekil 4.42.	Farklı enzim ve konsantrasyonlarının uygulanmasıyla belirlenen metagenomik DNA bulguları.....	113
Şekil 4.43.	Farklı amonyum asetat konsantrasyonlarıyla belirlenen metagenomik DNA bulguları.....	114

Şekil 4.44.	Farklı ekstraksiyon çözücülerini kullanıldığında belirlenen metagenomik DNA konsantrasyonları.....	115
Şekil 4.45.	Farklı saflaştırma yöntemleri kullanılarak izole edilen metagenomik DNA konsantrasyonları	116
Şekil 4.46.	Farklı dışkı örneklerinden manuel ve ticari kit kullanılarak izole edilen metagenomik DNA konsantrasyonları	117
Şekil 4.47.	Farklı besinlerle beslenen ruminantların dışkı örnekleri kullanılarak izole edilen metagenomik DNA'ların % 1 agaroz jeldeki görüntüsü...	118
Şekil 4.48.	Farklı dışkı örnekleri kullanılarak izole edilen metagenomik DNA'ların 16S rRNA gen bölgesi primerleri ile gerçekleştirilen PZR.	118
Şekil 4.49.	<i>xyl</i> geninin nükleotid ve amino asit dizisi.....	119
Şekil 4.50.	<i>6pfk</i> geninin nükleotid ve amino asit dizisi.....	120
Şekil 4.51.	<i>gh3</i> geninin nükleotid ve amino asit dizisi.....	121
Şekil 4.52.	<i>xyl</i> 'nin seçilen ksilanaz genleri ile birlikte filogenetik ağacı.....	122
Şekil 4.53.	<i>6pfk</i> 'nin seçilen 6-fosfofruktokinaz genleri ile birlikte filogenetik ağacı.....	123
Şekil 4.54.	<i>gh3</i> 'ün NCBI'dan seçilen genlerle birlikte filogenetik ağacı.....	124

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1.	Kültüre alınabilmiş rumen bakterilerinin bir kısmının listesi.....	6
Çizelge 1.2.	Rumen mikrobiyal ekosisteminin substrata göre bakteri çeşitliliği ve fermentasyon sonucu oluşan son ürünleri.....	10
Çizelge 3.1.	Kullanılan bazal besiyeri içeriği.....	49
Çizelge 3.2.	Kullanılan mineral ortam içeriği.....	49
Çizelge 3.3.	Farklı besin kaynaklarıyla beslenen ruminant dışkı örnekleri.....	51
Çizelge 3.4.	Çalışmada kullanılan konak ve transformant bakterilerin bazı özellikleri.....	54
Çizelge 3.5.	LB Broth besiyerinin kimyasal ve miktar kompozisyonu.....	55
Çizelge 3.6.	Kullanılan 16S rRNA gen bölgesi primerleri.....	56
Çizelge 3.7.	<i>S. bovis</i> amilaz geninin tasarlanan primerlerinin dizilimi, baz uzunlukları (bç) ve erime sıcaklıkları.....	58
Çizelge 3.8.	<i>Bacillus</i> sp. likenaz geninin tasarlanan primerlerinin dizilimi, baz uzunlukları (bç) ve erime sıcaklıkları.....	60
Çizelge 3.9.	Kullanılan plazmidler ve özellikleri.....	63
Çizelge 3.10.	Ayrıştırma Jelin İçeriği (%12.5'lik).....	66
Çizelge 3.11.	Dengeleyici Jelin İçeriği (% 4'lük).....	67
Çizelge 3.12.	Çalışmada kullanılan lizis tamponların bileşenleri.....	70
Çizelge 3.13.	Kullanılan enzimlerin (lizozim ve proteinaz K) konsantrasyonları....	70
Çizelge 3.14.	Ekstraksiyon aşamasında kullanılan amonyum asetat konsantrasyonları.....	70
Çizelge 3.15.	DNA'yı diğer organik maddelerden ayıran farklı ekstraksiyon çözücülerini.....	71
Çizelge 3.16.	Saflaştırma yöntemleri.....	72
Çizelge 3.17.	Çalışmada kullanılan dejenere primerler.....	73

Çizelge 4.1.	27F-1492R primerleri ile gerçekleştirilen PZR optimizasyon çalışma şartları.....	77
Çizelge 4.2.	Farklı örnek ve karbon kaynakları kullanılarak izole edilen bakterilerin 16S Blast sonucuna göre tanımlanması.....	78
Çizelge 4.3.	<i>S. bovis</i> RB4 suşunun DNA'sından AmySbF-AmySbR primerleri ile yapılan PZR optimizasyon çalışma şartları.....	79
Çizelge 4.4.	<i>E. coli</i> A1'den M13F-M13R primerleri ile gerçekleştirilen PZR optimizasyon çalışma şartları.....	81
Çizelge 4.5.	<i>B. licheniformis</i> RB16 DNA'sından LicBF-LicBR primerleriyle gerçekleştirilen PZR optimizasyon çalışma şartları.....	99



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADS	: Anaerobik Dilüsyon Solüsyonu
Amp^r	: Ampisilin dirençlilik geni
ARISA	: Automated Ribosomal Intergenic Spacer
ATP	: Adenozin trifosfat
bç	: Baz çifti
BSA	: Bovin serum albumin
CAE	: Karbonhidrat aktif enzim
CTAB	: Hexadecyltrimethylammonium bromide
DGGE	: Denaturing Gradient Gel Elektroforez
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNS	: 3-5 dinitrosalisilik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotit trifosfat
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik asit
Et-Br	: Etidyum Bromür
FAO	: Food and Agriculture Organization
FISH	: Fluorescence In Situ Hybridization
gr	: Gram
ITS	: Internal Transkriptional Spacer
kb	: Kilobaz
kDa	: KiloDalton
KMS	: Karboksimetil selüloz
LB	: Luria-Bertani
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre

mM	: Milimolar
mV	: Milivolt
µl	: Mikrolitre
µmol	: Mikromol
NCBI	: National Center of Biotechnology Institute
NaI	: Sodyum iyodür
nm	: Nanometre
Na₂SO₃	: Sodyum sülfat
OD	: Optik Dansite
ORF	: Açık okuma çerçevesi
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPZR	: Quantitative Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rDNA	: Ribozomal DNA
rpm	: Rounds per minute
rRNA	: Ribozomal RNA
S	: Svedberg birimi
SAFP	: Solid Attached Firmly Population
SAP	: Solid Attached Population
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi
TBE	: Tris/Borik asit/EDTA
TEMED	: N, N, N', N',-Tetramethylethylenediamine
TP	: Toplam Populasyon
T-RFLP	: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
UPGMA	: Unweighed Pair Group Method of Arithmetic Averages
UV	: Ultra viyole
UYA	: Uçucu yağ asidi

1. GİRİŞ

1.1. Rumen

Ruminantlar tüm dünyada 3.5 milyardan fazla evcil hayvan türü içeren, herbivorlar içerisinde önemli bir yere sahiptir (McCann ve ark., 2014). Geniş bir diyet ile beslenen ruminantların mideleri rumen, retikulum, omasum ve abomasum olmak üzere dört bölmeden oluşmaktadır (Agarwal ve ark., 2015). Rumen, ruminant midesinin yaklaşık % 80'lik kısmını oluşturan, yüksek bir şekilde özelleşmiş sindirim kanalıdır. Rumen içerisindeki lignoselülotik materyaller 72 saate kadar kalmakta ve mikrobiyal parçalanma gerçekleşmektedir (Russell, 2002). Rumen milyarlarca mikroorganizmaya ev sahipliği yapmakta ve Dünya'nın en geniş ticari fermentasyon işleminin gerçekleştiği yer olarak adlandırılmaktadır (Wright ve ark., 2004; Russell ve ark., 2009). Ruminal fermentasyon sonucunda rumen mikroorganizmaları nişasta, şeker ve bitki hücre duvarının kompleks polisakkaritlerini (selüloz, hemiselüloz ve pektin) içeren karbonhidratları etkin bir şekilde sindirerek uçucu yağ asitleri (asetik, bütirik ve propiyonik asit) açığa çıkarmaktadır (Neumann ve Dehority, 2008). Bu asitler rumen mukozasının yakınına direk olarak absorbe olmakta ve ruminant enerji ihtiyacının yaklaşık % 80'ini karşılamaktadır. (Suyub, 2014). Rumen mikroorganizmaları ruminantların sağlığında ve hayvana enerji sağlanmasında anahtar bir rol oynadığı için gerekli ve önemli mikroorganizmalar arasında yer almaktadır (Henderson ve ark., 2013).

Rumen - 350 mV'luk düşük redoks potansiyeli ile anaerobik bir ortam oluşturmakta ve bu ortamda sadece mikroorganizmalar yaşayabilmektedir. Rumende fermentasyon sonucunda karbondioksit (CO_2), metan (CH_4) ve hidrojen (H_2) açığa çıkarak, anaerobik ortam bu gazlar ile sağlanmaktadır. Rumen içerisine kandan ve tüketilen besinlerden gelen sınırlı miktarda oksijen (O_2) yer alabilmektedir. Sınırlı miktardaki oksijeni fakültatif anaeob mikroorganizmalar tüketmekte ve anaerobluk devam ettirilmektedir. Rumen yüksek tampon kapasitesi ve ozmotik basıncı ile istilacı mikroorganizmaların büyümesini sınırlamaktadır. Rumenin tampon kapasitesinin yüksek olması pH'nı 6.0 - 6.9 arasında sabit tutulmasını sağlamaktadır. Rumen mikroorganizmaları optimum 39 °C sıcaklıkta büyüebilmektedir. Rumen mikroorganizmalarının bazıları antimikrobiyal bileşikler üretebilmekte ve bunlar ekosistemde yer alan diğer mikroorganizmaların büyümelerini azaltmaktadır (Kamra, 2005). Ayrıca rumen fonksiyonlarının optimize edilmesinde birçok

faktör bulunmaktadır. Bu faktörler içerisinde besin sindiriminin zenginleştirilmesi, mikrobiyal proteine azot dönüşümün geliştirilmesi, metan emisyonunun indirgenmesi, ruminal mikroorganizmaların kullanımı ile azot atılımının yapılması yer almaktadır (Kim ve ark., 2011).

1.2. Rumen Mikrobiyal Ekosistemi

Aerobik mikroorganizmalarla izolasyon çalışmaları toprak, klinik, mandıra gibi farklı çevrelerde sıklıkla yapılmaktadır. Rumen mikroorganizmalarının birçoğunun zorunlu anaerob olması ise bu mikroorganizmaların izolasyonunu zorlaştırmıştır (Krause ve ark., 2013). Yirminci yüzyılın ikinci yarısından sonra, Hungate sığır rumeninden selülozu sindiren bakterileri, anerobik teknikler geliştirerek ve indirgeyici ajanların kombinasyonu ile izole edebilmiştir (Hungate, 1944; Chung ve Bryan, 1997). Böylelikle rumen mikroorganizmaları ile ilgili taksonomik, fizyolojik ve ekolojik çalışmalar başlamıştır. Bununla beraber rumen mikroorganizmalarının ekosistemi kompleks ve dinamik olduğu için tam olarak açıklanamamıştır (Kobayashi, 2006).

Bakteri, arkea, protozoa, fungus ve bakteriyofajlardan oluşan rumen ekosistemi, konakçı hayvanın yaşına, canlının türüne, beslenmesine, tüketilen ek besinlere, mevsimlere ve coğrafik bölgelere göre değişebilmektedir (Kim ve ark., 2011). Bu mikroorganizmaların aynı gruplarının farklı cinsleri arasında bile yoğun bir şekilde sinerjizm ve antagonizm görülmesi, rumendeki mikroorganizmaların belirlenmesinin zor olduğunu göstermektedir (Kamra, 2005; Bekele ve ark., 2010). Ayrıca rumen mikroorganizmalarının bir kısmının diğer memelilerin sindirim kanallarında da yaşayabildiği bilinmektedir (Hungate, 1975).

1.2.1. Rumen arkeaları

Arkealar, bakterilere genomik seviyede, ökaryotlara ise moleküler seviyede benzeyerek yaşamın üçüncü domainini oluşturmaktadır (Forterre, 2013). Ruminal arkeaların içerisinde metanojenler büyük bir yer kaplamaktadır. Metanojenler ruminant hayvanlarda tüketilen diyet tipine bağlı olarak, rumen sıvısında 10^7 – 10^9 hücre/ml populasyon yoğunluğunda bulunmaktadır. Rumende metanojenler, *Methanobacterium formicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanosarcina barkeri* ve *Methanoculleus olentangyi* olmak üzere 7 farklı tür içerisinde yer almaktadır (Kamra, 2005).

Metanojenler, bakterilerin fermentasyonu sonucunda açığa çıkan CO₂ ve H₂'i kullanarak metan üretmektedir (Kim ve ark., 2011). Metan atmosferdeki organik iz gazlar içerisinde büyük bir yer kaplamaktadır. Antropojenik metan kaynakları, 2000 yılından itibaren toplam emisyonun yaklaşık % 50 - 55'ini oluşturabilmektedir (Hill ve ark., 2016). Ruminantlar antropojenik etkiler ile metan üretiminin ana kaynağını oluşturmaktadır (Aluwong ve ark., 2013).

1.2.2. Rumen protozoaları

Rumen protozoaları içerisinde silli protozoalar kamçılı protozoalardan daha fazla miktarda bulunmaktadır (Çömlekçioğlu, 2009). Anaerob olan silli protozoalar, rumen içerisinde 10⁴–10⁶ /ml populasyon yoğunluğunu oluşturmaktadır (Kamra, 2005). Silli protozoalar morfolojik karakteristiklerine göre entodiniomorphida ve holotrich protozoa olmak üzere iki ana grup altında sınıflandırılmaktadır (Belanche ve ark., 2014). Rumen içerisinden 15 farklı cins holotrich protozoa izole edilmiştir. Bunlar içerisinde *Isotricha*, *Dasytricha*, *Buetschlia* ve *Charonina* yaygın olarak bulunmaktadır (Kamra, 2005). Holotrich protozoanın enzimatik profilinde amilaz, pektin esteraz, invertaz ve poligalakturonaz enzimlerinin sıklıkla yer aldığı görülmektedir (Thurston ve Grain, 1971). Entodiniomorphida protozoada ise selüloz ve hemiselüloz parçalanmasının yüksek olduğu belirlenmiştir (Williams ve Coleman, 1985). Rumende sayı ve görülme olasılığı bakımından daha yüksek olan Entodiniomorphida protozoaları ise *Entodinium*, *Diplodinium*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Elytroplastron*, *Metadinium*, *Ostracodinium*, *Epidinium*, *Dasytricha* ve *Isotricha* cinslerinden oluşmaktadır (Shimizu ve ark., 1983). Protozoalar nişasta gibi polisakkaritleri depolayarak, gerek duyduklarında kullanabilmektedir. Rumen içerisinde protozoanın yer alması, hayvana daha hızlı ağırlık kazandırmaktadır (Williams, 1986). Besinlerin parçalanmasının artmasını sağlayan protozoalar, bakteri populasyonunu kontrol altında tutmaktadır (Dehority, 1998). Ayrıca silli protozoalar ruminantın beslenmesinde mikrobiyal azotun % 40'ını, toplam fermentasyon ürünlerinin ise % 60'ını oluşturmaktadır (Hungate, 1966). Protozoaların rumen ortamından uzaklaştırılması rumende pH'nın düşmesine, amonyak azotunun (NH₃-N) ve metanojenlerin azalmasına, laktik asit, propiyonik asit, bakteri ve fungusların önemli miktarda artmasına neden olmaktadır. Konakçı hayvanın kaba diyetle beslenmesi protozoaların rumen ortamından uzaklaştırılmasını artırmaktadır (Kamra, 2005). Bununla beraber protozoalar bakteri ve funguslarla bitki liflerini parçalayan enzimleri daha az üretmektedirler (Koike ve Kobayashi, 2009).

1.2.3. Rumen fungusları

Rumen fungusları 1910'larda kamçılı protozoa olarak tanımlanmış ve *Sphaeromonas communis* ve *Callimastix frontalis* olarak isimlendirilmiştir (Çömlekçioğlu, 2009). Bu protozoaların ilk defa fungus olduğu Orpin tarafından 1975 yılında keşfedilmiş ve *Neocallimastix frontalis* ismi verilmiştir (Orpin, 1975). Rumen funguslarının hücre duvarında kitinin varlığı ile bu mikroorganizmaların gerçek fungus olduğu doğrulanmıştır (Orpin, 1977a). İzole edilen mikroorganizmalar chytridiomycetes funguslarının yaşam döngüsüne ve morfolojisine benzemektedir. Ancak izole edilen rumen fungusları obligate anaerobtur ve bunlar için Neocallimastigales takımı oluşturulmuştur. Sonuçta rumen fungusları *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces*, *Caecomycetes* ve *Cyllamyces* olmak üzere altı cins altında toplanmıştır (Çömlekçioğlu, 2009). Rumen fungusları lignoselülotik materyalleri selüloz, hemiselüloz, proteaz ve esteraz gibi farklı enzimlerin varlığında iyi bir şekilde parçalamaktadır (Paul ve ark., 2003). Fiber içerikli diyet ile beslenen konakçı hayvanlarda, rumen funguslarının büyümesi stimüle edilirken, kesif yem ile beslenen konakçılarda rumen funguslarının büyümesi inhibe edilmektedir. Fungus popülasyonu yüksek konsantrasyonda çözünmüş şekerin rumen sıvısının pH'ını düşürmesiyle olumsuz olarak etkilenmektedir (Orpin, 1977b). Rumen funguslarının bitki hücre duvarını parçalayan enzimler üretebilmesine rağmen, mikrobiyal biyokütle içerisinde bakterilerden daha az (10^3 – 10^5 zoospor/ml) bulunması ile lif sindirimlerinin düşük olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Koike ve Kobayashi, 2009).

1.2.4. Rumen bakteriyofajları

Bakteriyofajlar rumende 10^8 – 10^9 /ml popülasyon yoğunluğunda bulunan bakteri virüsleri olarak bilinmektedir. Bunlar rumende yer alan farklı bakteriler için özelleşerek, bakterileri lize etmektedir. Dolayısıyla bakteriler için zorunlu patojenler olarak bilinmektedir. Rumendeki bakteriyofajlar *Streptococcus bovis* ve metanojenler gibi mikroorganizmaların sayısının kontrolünde büyük bir öneme sahiptir (Kamra, 2005). Ayrıca bakteriyofajların faz terapisi, lateral gen transferi ve yeni enzimlerin keşfedilmesi açısından da avantajları bulunmaktadır. Moleküler biyoloji tekniklerinin gelişmesiyle faj izolatlarının karakterizasyon çalışmaları tahmin edilmeye başlanmıştır (Gilbert ve Klieve, 2015). Konakçı hayvanlar için fajların patojen olmadığı ve bakterileri parçalaması ile hayvan için gerekli olan proteinin açığa çıktığı bilinmektedir. Her hayvan

için bakteriyofaj sayısı özel olmakla beraber, beslenmeden 8-10 saat sonra artmakta, sonrasında ise eski sayısına dönmektedir (Kamra, 2005).

1.2.5. Rumen bakterileri

Bakteriler rumendeki en büyük mikroorganizma populasyonunu oluşturmaktadır (10^{10} – 10^{11} hücre/ml) (Bekele ve ark., 2010). Bakteri populasyonunun 200’den fazla tre sahip olduğu bilinmektedir (McSweeney ve ark., 2005) Ruminantın beslenmesine göre bakterilerin sayılarında artış veya azalış görülmektedir (Bekele ve ark., 2010). Rumen bakterilerinin türlerindeki değişim ise ruminantın yüksek fiber ya da nişasta içeren gıdalar tüketmesi ile ortaya çıkmaktadır (Suyub, 2014). Yüksek aktiviteleri ve geniş biyoktelleri ile bitki fiberlerinin parçalanmasında önemli bir role sahip rumen bakterileri 50 yıldan daha fazladır çalışılmaktadır (Bekele ve ark., 2010). Farklı ruminant hayvanlardan toplanan örneklerle bakteri izolasyonu ve bakteri türlerinin çeşitliliğini karakterize etmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların dahilinde morfolojik şekillerine, boyutlarına ve farklı yapılarına göre rumen bakterileri genel olarak *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* ve *Spirochaetes* olmak üzere dört şube ile literatüre girmiştir (Kenters ve ark., 2011). Son olarak *Tenericutes* şubesi eklenmiştir. Çizelge 1.1’de kültüre alınan rumen bakterilerinin bir kısmının listesi gösterilmiştir (Creevey ve ark., 2014).

Rumen bakterilerinin birçoğu Gram-negatif olarak tanımlanmıştır. Gram-pozitif bakterilerin sayısı ise, rasyondaki yüksek enerjiye sahip besinlerle artmaktadır. Bu bakterilerinin birçoğu obligate anaerobtur. Obligat anaerob rumen bakteriler içerisinde, fibrolitik özellik gösteren *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrosolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium cellulosolvens* ve *Eubacterium ruminantium* sıklıkla izole edilmiştir (Koike ve Kobayashi, 2009). Rumen bakterilerin bazıları O₂’e maruz kalır kalmaz hayatlarını kaybetmektedir. Bazı rumen bakterileri ise – 350 mV’tan yüksek redoks potansiyelinde büyüyebilmektedir. Fakültatif anaerob olan bu bakteriler arasında *Streptococcus bovis*, *Bacillus licheniformis*, *Bifidobacterium pzedolongum* subsp. *globosum* gibi türler yer almaktadır (Mantovani ve ark., 2001; Seo ve ark., 2013). Rumen bakterilerinin optimum pH aralığı 6.0 – 9.0 arasında değişmektedir. Optimum reme sıcaklıkları ise 39 C olarak belirlenmiştir. Ayrıca rumen bakterileri yüksek seviyedeki organik asitleri metabolizmaları etkilenmeden tolere edebilmektedir (Kamra, 2005).

Çizelge 1.1. Kültüre alınabilmiş rumen bakterilerinin bir kısmının listesi (Creevey ve ark., 2014).

Filum	Familya	Aday Kültür
Actinobacteria	Actinomycetaceae	<i>Actinomyces ruminicola</i> B71
	Coriobacteriaceae	<i>Atopobium</i> sp.G44
	Coriobacteriaceae	<i>Denitrobacterium denitrifixans</i> NP0H1T
	Coriobacteriaceae	<i>Olsenella umbonata</i> A2
	Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas</i> sp. N-14
	Micromonosporaceae	<i>Microsomonospora ruminantium</i>
	Pseudonocardiaceae	<i>Prauserella rugosa</i> IMRU 3760T
Bacterioidetes	Unclassified Bacterioidetes	<i>Ruminobacillus xylanoliticum</i> G1
	Rikenellaceae	<i>Ruminofilibacter xylanoliticum</i> S1
	Sphingobacteriaceae	<i>Shingobacterium thalpophilum</i> Y4
	Prevotellaceae	<i>Prevotella ruminicola</i> TC2-24
	Prevotellaceae	<i>Prevotella ruminicola</i> BP1-34
	Prevotellaceae	<i>Prevotella ruminicola</i> BP5-11
	Prevotellaceae	<i>Prevotella ruminicola</i> TC2-28
	Prevotellaceae	<i>Prevotella ruminicola</i> TF2-5
	Prevotellaceae	<i>Prevotella ruminicola</i> BP1-162
	Prevotellaceae	<i>Prevotella</i> sp. BP1-145
	Prevotellaceae	<i>Prevotella</i> sp. BP1-148
	Prevotellaceae	<i>Prevotella</i> sp. BP1-56
	Prevotellaceae	<i>Prevotella</i> sp. BP1-57
	Prevotellaceae	<i>Prevotella</i> sp. R79
	Prevotellaceae	<i>Prevotella</i> sp. RM13
	Prevotellaceae	<i>Prevotella</i> sp. RM47
	Prevotellaceae	rumen bacterium NK4A111
	Prevotellaceae	rumen bacterium R-9
	Prevotellaceae	<i>Prevotella ruminicola</i> 223/M2/7
	Prevotellaceae	rumen bacterium NK4A62
	Unclassified Bacterioidetes	<i>Bacterioidales bacterium</i> RM68
	Unclassified Bacterioidetes	<i>Bacterioidales bacterium</i> RM69

<i>Firmicutes</i>	Unclassified Bacterioidetes	<i>Bacterioidales bacterium</i> RM8
	Unclassified Bacterioidetes	<i>Bacterioidales bacterium</i> RM61
	Acidaminococcaceae	<i>Acidaminococcus fermentas</i> H18
	Veillonellaceae	<i>Allisonella histaminiformans</i> MR2T
	Clostridiales 13. familya	<i>Anaerovorax</i> sp. G61
	Lachnospiraceae	<i>Cellulosilyticum ruminicola</i> H1T
	Lachnospiraceae	<i>Coprococcus</i> sp. PE15
	Unclassified Clostridiales	<i>Howardella ureilytica</i> GPC589T
	Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> L.JST
	Clostridiaceae	<i>Oxobacter pfennigii</i> V5-2T
	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus ruminicola</i> CA8
	Clostridiales 11. familya	<i>Peptoniphilus</i> sp. BG5
	Peptostreptococcaceae	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
	Clostridiaceae	<i>Proteiniclasticum ruminis</i> D3RC-2
	Veillonellaceae	<i>Quinella ovalis</i>
	Clostridiaceae	<i>Saccharofermentas</i> sp. G8
	Clostridiaceae	<i>Sarcina</i> sp. LD64
	Lachnospiraceae	<i>Syntrophococcus sucromutans</i> S195T
	Clostridiales 11. familya	<i>Tissierella</i> sp. S2
	Veillonellaceae	<i>Veillonella</i> sp. FMH104
Proteobacteria	Lachnospiraceae	<i>Clostridium aminophilum</i> 152R-1b
	Lachnospiraceae	<i>Eubacterium cellulosolvens</i> Ce2
	Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> RM66
	Ruminococcaceae	rumen bacterium NK3A31
	Ruminococcaceae	rumen bacterium NK4A214
	Unclassified Clostridiales	rumen bacterium R-7
	Enterobacteriaceae	<i>Proteus vulgaris</i> BR_22
	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i> sp. IVS-W
	Neisseriaceae	<i>Alysiella filiformis</i> A1T
	Xanthobacteraceae	<i>Ancylobacter</i> sp. ECPB09
	Campylobacteraceae	<i>Campylobacter</i> sp. FF05
	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i> sp. FMH113

	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i> sp. KG1
	Pasteurellaceae	<i>Mannheimia ruminalis</i> HPA92T
	Oxalobacteraceae	<i>Oxalobacter formigenes</i> OxB
	Alcanigenaceae	<i>Pigmentiphaga</i> sp. ECPB08
	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas putida</i> BR_1
	Enterobacteriaceae	<i>Shigella flexneri</i> G3
	Moraxellaceae	bacterium XJ141-10-NGI
Tenericutes	Anaeroplasmataceae	<i>Anaeroplasma abactoclasticum</i>
	Anaeroplasmataceae	<i>Asteroleplasma anaerobium</i>

1.2.5.1. Karbonhidrat metabolizması

Rumen mikrobiyal ekosisteminin bakteri çeşitliliği substrata göre değişiklik göstermektedir (Kamra, 2005). Çizelge 1.2’de rumen mikrobiyal ekosisteminin substrata göre bakteri çeşitliliği ve fermentasyon sonucu oluşan son ürünleri gösterilmiştir. Rumen bakterileri selüloz, hemiselüloz, nişasta ve pektin gibi substratları parçalamakta ve bu bileşiklerin degrade ürünlerini kullanmaktadır (Bryant ve ark., 1958). Selülozu sindiren *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* ve *Ruminococcus albus* sıklıkla izole edilen rumen bakterileri içerisinde yer almaktadır (Forsberg ve ark., 1997). Bunlar selülozun hidrolitik ürünleri olan glikoz ve sellobiyozu kullanarak büyüme göstermektedir. Bir diğer selüloolitik bakteri olan *Butyrivibrio fibrosolvens* ise selüloz, nişasta, ksilan ve pektini de içeren çeşitli substratları hidrolize edebilmekte ve hidrolize ürünleri kullanarak büyümektedir. (Hungate, 1966).

Rumende fermentasyon sonucunda format, asetat, bütirat, etanol, laktat, süksinat, propiyonat ve H₂ gibi birçok son ürün açığa çıkmamaktadır (Chiba, 2009). Bununla beraber önemli son ürünlerden süksinat, gram negatif bir bakteri olan *Selenomonas ruminantium* tarafından propiyonata dönüştürülmektedir. Rumen içerisinde propiyonat üreten *Selenomonas ruminantium* ve *Megasphaera elsdenii* sayısı, ketozis ve dönüşüm periyodu sonunda *Streptococcus bovis*’in artması ile azalmaktadır (Wang ve ark., 2012). *S. bovis* karbonhidrat fermentasyonunda önemli bir ruminal bakteri olarak bilinmektedir (Al Emery ve ark., 2013). *S. bovis* normal rumen florasında 10⁷’den fazla miktarda bulunurken, bu değer 10¹⁰’a ulaştığında laktik asit üretimi artmakta ve rumen pH’ı düşmektedir (Guo ve ark., 2010). Dolayısıyla bakteri sayısı, çeşitliliği ve ruminal

fermentasyon dengesiz hale gelmektedir (Ghali ve ark., 2004; Calsamiglia ve ark., 2012). *S. bovis* kaba yem ile beslenen hayvanlarda az miktarda bulunurken, kaba yeme nişasta gibi besinlerin eklenmesiyle sayılarında önemli miktarda artış olmaktadır (Al Emery ve ark., 2013). Bu bakteri asidik çevreye tolerans kabiliyetinin olması, hızlı büyüebilmesi ve özellikle nişasta içeren ortamda yüksek amilaz aktivitesi göstermesi ile birçok fizyolojik ve biyokimyasal karakterizasyona önemli bir katkı sağlayabilmektedir (Ghali ve ark., 2004).

1.2.5.2. Protein metabolizması

Proteinlerin sindirimi peptitlerin üretimi ile başlamaktadır. Peptitler amino asitlere hidroliz olmakta ve bunların bazıları deaminasyon ile amonyak (NH_3) üretmektedir (Hoover ve Stokes, 1991). Bakteriler tarafından azot kaynağı olarak NH_3 kullanımı, mikrobiyal protein sentezinde ATP'nin teminini sağlamaktadır (Cotta ve Russell, 1997). Selülitik rumen bakterilerinin uzun bir süre sadece NH_3 'ü azot kaynağı olarak kullandığı düşünülmüştür (Bryant, 1973). Ancak sonraki çalışmalarda selülitik rumen bakterilerinde azot kaynağı olarak amino asitlerin de kullanıldığı ortaya çıkarılmıştır (Atasoglu ve ark., 2001).

Ruminal bakterilerin büyümesi için gerekli azot bileşiklerinin bilinmesi, ruminal fermentasyonu etkileyen faktörler ve ruminantların protein besininin anlaşılmasında önemli bir yer oluşturmaktadır (Atasoglu ve ark., 2001). Toplam ruminal protein aktivitesinin yaklaşık % 75'inin beslenmeye bağlı olduğu bulunmuştur (Suyub, 2014). Kültüre alınabilen bakterilerin büyük bir kısmının ruminal protein degradasyonu karakterize edilmiştir (Suyub, 2014). Bunlar arasında proteolitik özellik gösteren, *Clostridium bifermentans*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminobacter amylophilus* ve *Prevotella ruminicola*'a sıklıkla rastlanmaktadır (Saminathan ve ark., 2015). Protein degradasyonu ve amino asit deaminasyonu sonucunda, rumen mikroorganizmalarının kullanabileceğinden fazla NH_3 'ün ortamda bulunması besinsel açıdan zarar veren bir proses olarak ifade edilebilmektedir (Firkins ve ark., 2007). Bu yüzden aşırı miktarda üretilen NH_3 üre olarak dışarı atılmaktadır. Ruminant azot atılımı çevresel kirliliğin ana kaynaklarından birini oluşturmaktadır (FAO, 2006).

Çizelge 1.2. Rumen mikrobiyal ekosisteminin substrata göre bakteri çeşitliliği ve fermentasyon sonucu oluşan son ürünleri (Kamra, 2005; Chiba, 2009).

Substrat	Bakteri	Son Ürünler
Karbanhidrat kullanan bakteriler		
Selüloz	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Format, asetat, süksinat
	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Format, asetat, süksinat, H ₂
	<i>Ruminococcus albus</i>	Format, asetat, etanol, H ₂ , CO ₂
	<i>Clostridium lonhheadii</i>	Format, asetat, bütirat, laktat, etanol, H ₂ , CO ₂
Hemiselüloz	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Format, asetat, laktat, bütirat, etanol, H ₂ , CO ₂
	<i>Prevotella ruminicola</i>	Format, asetat, propiyonat, süksinat
	<i>Eubacterium xylanophilum</i>	Format, asetat, bütirat, CO ₂
	<i>Eubacterium uniformis</i>	Format, asetat, bütirat, CO ₂
Nişasta	<i>Streptococcus bovis</i>	Laktat, asetat, format
	<i>Ruminococcus amylophilus</i>	Format, asetat, süksinat
	<i>Prevotella ruminicola</i>	Format, asetat, propiyonat, süksinat
Şeker	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	Format, asetat, laktat, süksinat
	<i>Succinivibrio amylolytica</i>	Asetat, süksinat
	<i>Selenomonas ruminantium</i>	Asetat, laktat, propiyonat, H ₂ , CO ₂
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Laktat
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Laktat
Pektin	<i>Treponema saccharophilum</i>	Format, asetat, etanol
	<i>Lachnospira multiparus</i>	Asetat, propiyonat, bütirat, laktat
Azot kullanan bakteriler		
Protein degrade eden	<i>Prevotella ruminicola</i>	Format, asetat, propiyonat, süksinat
	<i>Ruminobacter amylophilus</i>	Format, asetat, süksinat
Üre hidroliz eden	<i>Megasphaera elsdenii</i>	Asetat, propiyonat, bütirat, valerat, kaproat, H ₂ , CO ₂
Diğer bakteriler		
	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	Asetat, propiyonat, süksinat
	<i>Streptococcus caprinus</i>	Bütirat, laktat

Ruminant hayvanların türleri ve fizyolojik durumlarına göre, tüketilen besin azotunun yaklaşık % 60-90'ı üre olarak ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Çünkü NH_3 nitrifiye bakteriler tarafından oksitlenmekte ve çiftlik hayvanları işletmelerinde nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) birikimi olmaktadır. Düşük azot kullanım verimi ruminant çiftliğinin maliyetini artırmaktadır. Bu sebeple ruminant besin araştırmalarında, ammoniagenesis ve ruminal protein degradasyonun azaltılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Patra ve Yu, 2014).

1.2.5.3. Rumen bakterilerin dışkı ve gastrointestinal sistemde bulunması

Ruminant gastrointestinal sistemi (GİS) endojen ve ekzojen birçok uyarıcıya sahip, immünolojik olarak aktif organlardan oluşmaktadır (Henderson ve ark., 2015). GİS'te yer alan ön mide (rumen, retikulum ve omasum), abomasum (mide), ince barsak ve arka mide (çekum ve kolon)'nin normal mikrobiyal komünite çeşitliliği ve oluşumunda önemli bir fark gösterdiği bilinmektedir. Bakteri çeşitliliği ve miktarı abomasumda düşük olmasına rağmen, ön ve arka midenin spesifik karakterizasyonu sebebiyle yüksektir. Tahıl ile beslenen ruminantların rumeninde sindirilen metabolitlerin sayısı (glikoz, maltoz, ksantin, etanol, gliserol, putresin ve uçucu yağ asitleri gibi) artmaktadır. Bu metabolitlerin birçoğu faydalı mikroorganizmaların için substrat oluştururken, bazıları ise toksik etki meydana getirmekte ve inflamasyona neden olabilmektedir. Dolayısıyla rumen ve arka midenin sindiriminde bakteriyel endotoksin olan lipolisakkaritlerin içeriği artmaktadır (Plaizier ve ark., 2014).

Sığırlarda ön mide, arka mide ve dışkı örneklerinde *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* şubeleri sıklıkla yer almaktadır. Tahıl tüketimi % 76 - % 96.1 oranında *Firmicutes* artarken, *Bacteroidetes* miktarı azalmıştır (Mao ve ark., 2013). *Bacteroidetes* şubesinde yer alan bakterilerin glikozid hidrolaz ve polisakkarit liyaz genleri, *Firmicutes* ya da diğer GİS'deki bakteri şubelerinden daha yüksektir. Bu sebeple *Bacteroidetes* şubesinin bitki hücre duvarındaki kompleks polisakkaritlerin ilk degradasyonunu gerçekleştirdiği düşünülmektedir (El Kaouteri ve ark., 2013). Rumen içerisinde *Bacteroidetes* şubesinden *Prevotella* ve *Firmicutes* şubesinden ise *Ruminococcus* cinsi en yaygın bulunan bakterilerdendir (Petri ve ark., 2012). Yüksek tahıl içeren ortamlardaki arka midede *Prevotella*, *Sharpea*, *Ruminococcus*, *Shuttleworthia*, *Bifidobacterium*, *Atopobium*, *Pseudobutyrvibrio*, *Selenomonas* ve *Megasphaera* artarken, *Treponoma*, *Anaeroplasma*, *Papilibacter*, *Acinetobacter* ve *Lentisphaera* azalmaktadır (Khafipour ve ark., 2016).

Aşırı tahıl üretimi bazı mikroorganizmalar için daha fazla substrat oluştururken, bazıları için zararlı olabilmektedir. Birçok çalışmada yüksek tahıl içeren besinlerin tüketiminin mikroorganizmalarının çeşitliliği ve zenginliğini etkilediği gösterilmiştir (Khafipour ve ark., 2009; Li ve ark., 2016). Mikroorganizmaların çeşitliliği ve zenginliğin azalması ise metabolik bir hastalık olan subakut ve akut ruminal asidozis ile ilişkilendirilebilmektedir (Khafipour ve ark., 2016). Rumen içerisinde önemli bir fonksiyona sahip olan *S. bovis*'in miktarının artması rumenin asiditesini artırarak, diğer mikroorganizmaların büyümelerini kısıtlamakta ve ruminal asidozise neden olabilmektedir (Calsamiglia ve ark., 2012). Ayrıca *S. bovis* insan ve hayvan gastrointestinal sisteminde de doğal olarak bulunmaktadır. *S. bovis* insan barsağında normalden fazla yer aldığı kronik inflamasyona veya kolon kanserine sebep olmaktadır (Abdulmir ve ark., 2011). Bu bakterinin birkaç alt türü endokarditis, menenjit, üriner sistem enfeksiyonları, osteoartiküler enfeksiyon, peritonitis ve kolon kanserini oluşturmaktadır (Grant ve ark., 2000; Corredoira ve ark., 2014). *S. bovis* insan barsağında % 2.5 - 15 arasında bulunmaktadır. Bu değer % 56'lara ulaştığında kolorektal kansere sebep olmaktadır (Abdulmir ve ark., 2011).

Ruminantlarda sıklıkla bulunan *Firmicutes* şubesinin *Lachnospiraceae* ve *Ruminococcaceae* familyaları insan barsağında da bulunmaktadır. Sağlıklı yetişkin insanların dışkı örneklerinde 16S rRNA analizi sonucunda, yaklaşık % 50 – 70 oranında bu bakteriler yer almaktadır. *Lachnospiraceae* ve *Ruminococcaceae* familyaları barsak komünitesinin metabolik dönüşümlerin bazılarında anahtar rol oynamaktadır (Flint ve ark., 2012). *Lachnospiraceae* familyası içerisinde yer alan *Butyrivibrio fibrosolvens* bütirat üreten bir rumen bakterisi olmakla beraber, ruminant ve diğer memelilerin gastrointestinal sisteminde de yer almaktadır. Bu bakterinin probiyotik olması kolorektal kansere karşı koruma sağlamaktadır (Ohkawara ve ark., 2005).

Ruminant GİS'de var olan birçok bakteri türünün sayısı ruminantın beslenmesine, beslenme stratejisine ve coğrafik bölgeye göre değişiklik göstermektedir (Henderson ve ark., 2015). Ruminant GİS'in sağlıklı olması, zenginliği, çeşitliliği, tarafsızlığı, stabiliteyi ve mikroorganizma aktivitesini artırmaktadır. Sağlıklı sindirim varlığı asitlik, amonyak, ozmolarite, redoks potansiyeli, antimikrobiyal peptitleri dengeleyebilmekte ve *Escherichia coli* ve *Clostridium perfringens* gibi fırsatçı ve patojen popülasyonunun ve toksinlerin oluşumunu engelleyebilmektedir (Khafipour ve ark., 2016).

1.2.5.4. Rumen bakterilerinin ruminal mikroorganizmalarla etkileşimi

Rumen mikroorganizmalarının kompleks genetik ağında, farklı mikrobiyal domainlerin birbirleriyle ilişkisini keşfetmek, rumen fonksiyonunun ve konakçı hayvanın sağlığı ve üretimi açısından büyük bir önem oluşturmaktadır (Kumar ve ark., 2015).

Mikroorganizmaların oranı ve kompozisyonu diyet, beslenme sıklığı, yaş, coğrafik bölge ve ruminant-konakçı ilişkisi tarafından etkilenmektedir (Denman ve McSweeney, 2006). Bu ilişkilerin karışıklığını daha iyi anlamak için, yağ asidi metabolizması, fiber degradasyonu, metanojenezis ve bakteriyal predasyon ile ilgili çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (Mackie, 1997). Birçok araştırmada *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* ve *Ruminococcus flavefaciens*'in yüksek selülitik aktivitesi araştırılmıştır. Ayrıca rumende fiber degrade eden önemli mikroorganizmalar arasında rumen fungusları yer almaktadır (Orpin ve Joblin, 1997).

Rumen fungusları fiberlerin üzerine ilk kolonizasyonu sağlayarak, bakteri ya da diğer domainlerin hızlı bir şekilde fibrolitik aktivitesini kolaylaştırabilmektedir (Sehgal ve ark., 2008). Bu yüzden rumen fungusları ile fiber degradasyonunda diğer mikrobiyal komünitelerinin oluşumu belirlenebilmektedir. Domainler arası bağımlılık ko-kültür çalışmalarında gösterilmiştir. Selülitik bakteriler, anaerobik rumen fungusları ve *Methanobrevibacter smithii* arasında yeşil bitkilerin yanı sıra arpa samanındaki degradasyon da sinerjizm göstermiştir (Kittelmann ve ark., 2012).

Rumen ekosistemindeki komüniteler eş zamanlı olarak bakteri ve arkealar 16S rRNA, silli protozoalar 18S rRNA, funguslar ise internal transkriptional spacer (ITS) genleriyle karakterize edilmiştir. Yaşamın üç domaininin mikrobiyal taksonomi analizi sonucunda, rumendeki mikroorganizmaların farklı grupları arasında farklı domain ilişkisinin güçlü olduğu belirlenmiştir. Bu yaklaşım bakteriyal, arkeal ve mikrobiyal ökaryotik komponentlerin eş zamanlı olarak karakterize edilmesi için, çeşitli habitatlardaki diğer komünitelerle uygulanabilirliğini göstermektedir (Kittelmann ve ark., 2013). Eş zamanlı olarak bakteri, protozoa, fungus, bakteri + protozoa, bakteri + fungus, protozoa + fungus mikrobiyal grupları ile mısır sapı ve yapraklarının öğütülerek yapıldığı bir çalışmada, bakteri + protozoa grubunun hücre duvarını daha iyi parçaladığı sonucuna ulaşılmıştır (Zhang ve ark., 2007).

Son yıllarda süt sığırlarındaki rumen mikroorganizmaların fonksiyonu ile ilgili çalışmalar artmıştır (Pitta ve ark., 2014). Süt sığırları yüksek enerjili diyetlerle beslendiklerinde, süt üretimi artmaktadır. Bununla beraber bu diyet sindirim sistemini olumsuz etkilemektedir. Rumen mikroorganizmaların fonksiyonuna ve oluşumuna etki ederek, patojenlerin kolonizasyonuna yol açmaktadır (Khafipour ve ark., 2016). Rumendeki mikrobiyal komünite değişiminin esas olarak diyet olduğunu belirlemek için (Kumar ve ark., 2013), stearik, laurik ve miristik asit gibi orta zincirli yağ asitleri sığır diyetine eklenmiştir. Laurik asit eklenen diyetle protozoaların azaldığı, bakterilerin ve arkeaların çeşitliliği ve sayısının ise arttığına ulaşılmıştır (Hristov ve ark., 2012).

Rumen mikroorganizmaları filogenetik olarak farklı olmalarına rağmen, birbirlerine bağlı ve simbiyotik ilişkileri bulunmaktadır. Bakteri, fungus ve protozoalar kolonize olmakta, lignoselülitik materyalleri parçalamakta ve bu süreçte H_2 serbest bırakılmaktadır (Akin ve ark., 1988). Arkealar ise açığa çıkan H_2 'i kullanarak CO_2 ile birlikte CH_4 'e dönüştürmektedir (Kittelmann ve ark., 2012). CH_4 'ün indirgenmesi ile arkeaların büyümesi inhibe olabilmektedir. Kemogenomik, immünizasyon ve genetik seleksiyonla da arkeaların büyümesi engellenebilmektedir (Wallace ve ark., 2014). Ayrıca ruminantlarda enterik metanın üretimini inhibe etmek için nitrat, saponin ve propiyonik asit kullanımı yapılmıştır (Patra ve Yu, 2013).

Fitokimyasallar içerisinde yer alan saponinler, uçucu yağ asidi (UYA) konsantrasyonu artırması, substratların degradasyonu hızlandırması, metan üretimi indirgenmesi, asetat/propiyonat oranı ve NH_3 konsantrasyonu azaltmasıyla rumen fermantasyonunu değiştirebilmektedir (Kang ve ark., 2016). Saponinler bazı selülitik bakterilerin büyümesini artırırken, protozoa büyümesini inhibe edebilmektedir (Patra ve ark., 2012). Propiyonik asit metanojenlere direk olarak toksik etki oluştururken (Zhou ve ark., 2011), nitrat nitrit formunda metanojenleri inhibe etmektedir (Zhou ve ark., 2012). Ayrıca saponin, propiyonik asit ve nitratın kullanımı bakteri ve arkea çeşitliliğinin keşfini sağlamaya yardım edebilmektedir (Patra ve Yu, 2013).

Rumen içerisinde protozoaların bulunması rumen bakteri popülasyonunda değişikliğe neden olmaktadır. Ruminal protozoalarının toplam eliminasyonu bakteri popülasyonunu artırırken, metanojenleri azaltmaktadır. Amilolitik ve selülitik bakterilerin sayısı protozoaların yer almadığı sığırın rumenine protozoaların inokülasyonundan sonra azalmaktadır. (Ozutsumi ve ark., 2005).

Yüksek korunmuş bölgelerin ya da 16S rRNA universal genlerin sekansının belirlenmesi, mikroorganizmaların fonksiyon ve oluşumunu kapsamlı bir şekilde açıklayabilmekte (İrbis ve Ushida, 2004) ve kültüre alınmamış geniş bir mikrobiyal komponent açığa çıkabilmektedir (Tajima ve ark., 2001). 16S rRNA gen kütüphanesi kullanılarak rumenden bakteri ve arkea komünitelerinin karakterizasyonu yapılmıştır. Bakteri ve arkea popülasyonundaki değişimde diyet ek olarak lokal yüksek tuz içeren su özelliğinin de önemli olduğu görülmüştür (Cunha ve ark., 2011).

Rumen sıvısının geniş kompleks ve dinamik komünitesinin anlaşılması için temel oluşturabilecek mikroorganizmaların oluşumu ve fonksiyonu, tüketilen diyet içeriği, besin seviyesi, çevre, probiyotik ve antibiyotik alımı tarafından etkilenebilmektedir. Ayrıca GİS mikroorganizmaları, besin, intestinal hastalıkların patojenitesi ve immün cevaptaki etkileri vasıtasıyla konakçının sağlığı ve büyümesinde önemli bir göreve sahiptir. Bu veriler hayvan besini, sağlığı ve refahının anlaşılması için kritik bir içerik sağlamaktadır (Singh ve ark., 2012).

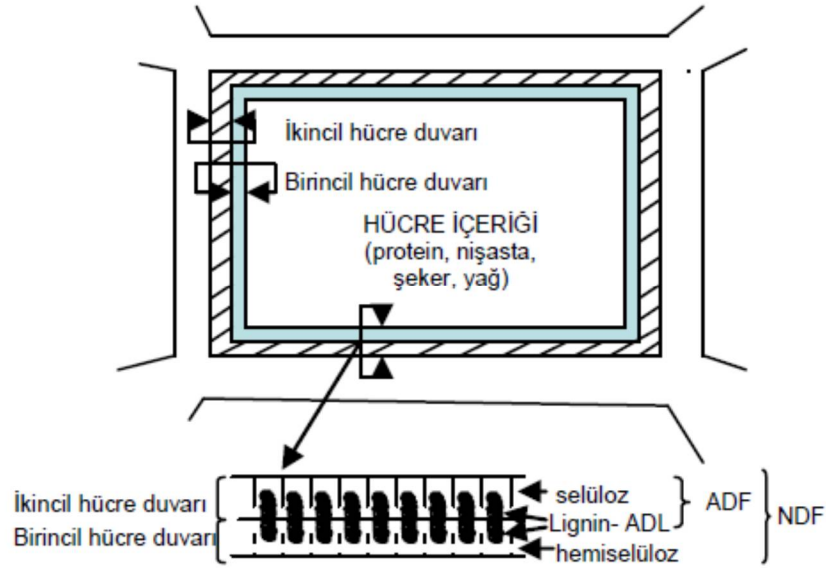
Hayvan beslenmesinde kaba yemin büyük bir öneme sahip olduğu bilinmektedir. Kaba yemler yapısal olan ve olmayan iki farklı karbonhidratlardan oluşmaktadır. Bu yapısal karbonhidratlar ise bitki hücre duvarının yapısında bulunmaktadır (Tekce ve Gül, 2014).

1.3. Bitki Hücre Duvarının Yapısı

Rumen, bitki hücre duvarının fermentasyonu için uygun bir ortamdır (Badhan ve ark., 2015). Birçok ruminantın temel besin kaynağını oluşturan otlakların kuru ağırlığının % 40 - 70'ini bitki hücre duvarı meydana getirmektedir (Akin, 1993).

Bitki hücre duvarları birbirine kenetli polisakkaritlerin çeşitli konfigürasyonlarından oluşmuş kompleks yapıdır (Gilbert ve ark., 2013). Hücre duvarı bitki hücresinin büyüklüğünü ve şeklini tanımlayan bitkinin temel yapısını oluşturmaktadır. Bitki hücre duvarları mekanik özellikleri ve kimyasal yapısına göre primer ya da sekonder olarak sınıflandırılmaktadır. Primer hücre duvarı mekanik olarak dinamik, sekonder hücre duvarı ise statik yapıda olan olgun hücrenin büyüklüğünü ve şeklini belirleyen yapıdır (York ve ark., 1986).

Bitki hücre duvarlarının yapısı türe, çeşitliliğe, iklime göre değişen özellik göstermektedir (Dimarogona ve ark., 2012). Bitki hücre duvarının temel maddelerini lignoselüloz olarak isimlendirilen selüloz (% 40 - 60), hemiselüloz (% 20 - 40) ve lignin (% 10 - 25) oluşturmaktadır. Şekil 1.1’de bitki hücre duvarında ve içeriğinde yer alan komponentler gösterilmiştir (Adıgüzel, 2013).



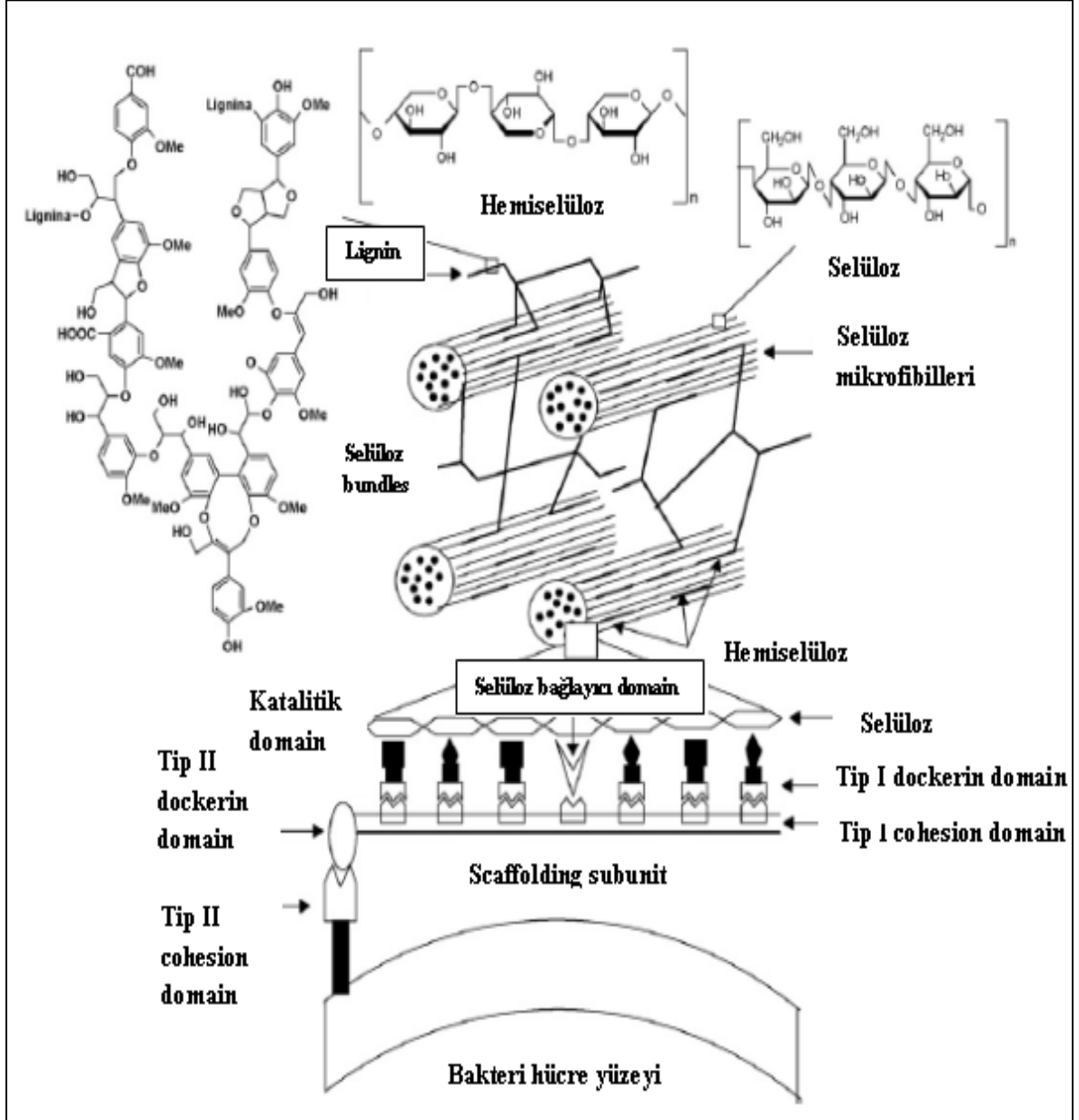
Şekil 1.1. Bitki hücre duvarı ve içeriğinin yapısı. Asit deterjan fiber (ADF): selüloz ve hemiselüloz, Nötral deterjan fiber (NDF): selüloz, hemiselüloz ve lignin (Yavuz, 2005).

1.3.1. Selüloz

Yeryüzünde organik karbon rezervleri içerisinde en geniş yeri kaplayan selüloz (Festucci-Buselli ve ark., 2007), yenilenebilir enerji kaynağı sağlamaktadır (Zhang ve ark., 2012). Selüloz, her yıl yaklaşık 180 milyar üretilmekte ve bitki hücre duvarının ana bileşenini oluşturan polisakkarit olarak tanımlanmaktadır (Cucurachi ve ark., 2013). Bu polisakkarit, β -1,4-glikozidik bağlı on binden fazla glikozdan oluşan lineer ve sert yapıda bir homopolimerdir. Selüloz zincirleri vanderwaals ve hidrojen bağlarıyla mikrofibriller içerisine toplanmıştır (Şekil 1.2). Kristal selülozdaki zincirlerle beraber ardışık şekerlerin bulunması, sellobiyozlar tarafından tekrar edildiğini göstermektedir (Horn ve ark., 2012).

Selülozun parçalanması için endo- β -1,4-glukanaz (EC 3.2.1.4), ekzo- β -1,4-glukanaz (EC 3.2.1.91) ve β -glukozidaz (EC 3.2.1.21) olmak üzere üç farklı selüloolitik enzimin sinerjistik kullanımı gerekmektedir (Cucurachi ve ark., 2013). İlk olarak endo- β -1,4-glukanaz selüloz molekülünün β -1,4-glikozil bağlarını kırarak daha küçük moleküllerin

oluşumunu sağlamaktadır. Sonrasında ekzo- β -1,4-glukanaz sellobiyohidrolazların da içerisinde yer aldığı poliglukan halkanın uçlarına saldırarak selüloz zincirinden sellobiyoz ünitelerini koparmaktadır. En son olarak β -glukozidaz ise açığa çıkan sellobiyozu hidrolize ederek glikozu ortaya çıkarmaktadır (Beguin, 1990; Zhang et al., 2012).



Şekil 1.2. Fiber (selüloz, mikrofibil, hemiselüloz ve lignin) ve fonksiyonel domainlerin selülozik substrat ve birbirleriyle ilişkili şematik görüntüsü (Graminha ve ark., 2008).

1.3.2. Hemiselüloz

Hemiselüloz selülozdan sonra doğada en fazla bulunan yenilenebilir materyal olarak bilinmektedir (Agbor ve ark., 2011). Bitki hücre duvarının yapısal bileşenleri içerisinde yer alan hemiselülozun ana bileşeni ksilandır. Ksilan β -1,4-D-ksilapiranoz homopolimerik omurgaya sahip yüksek dallanmış heteropolisakkarittir. Omurga glukuronopiranosil, 4-O-metil-D-glukuronopiranosil, α -L-arabinofuranosil, asetil, ferulolil ve/veya p-kumarolil yan zincir gruplarından oluşmaktadır (Collins ve ark., 2005).

Ksilan bitkinin ikincil hücre duvarında yer almaktadır (Collins ve ark., 2005). Kompleks ve heterojen yapıya sahip olan ksilanın hidrolize edilmesinde aktif enzimler işbirliği içinde çalışmaktadır. Endo-1,4- β -D-ksilanaz (EC 3.2.1.8) ksilan omurgasını rastgele ayırmaktadır. β -D-ksilosidaz (EC 3.2.1.37) ksilo olisakkarit ve ksilobiyozun indirgenmemiş son ürünlerinden ksiloz monomerlerine ayrımını gerçekleştirmektedir (Polizeli ve ark., 2005). Yan grupların yıkımı ise α -L-arabinofuranosidaz (EC 3.2.1.55), α -D-glukuronidaz (EC 3.2.1.139), asetil ksilan esteraz (EC 3.1.1.72), ferulik asit esteraz (EC 3.1.1.73) ve p-kumarik asit esteraz (EC 3.1.1.-)'ın bileşimi ile yapılmaktadır (Collins ve ark., 2005).

1.3.3. Lignin

Lignin fenolik bileşiklerin yüksek moleküler ağırlıklı kompleks bileşiği olarak tanımlanmaktadır (Baurhoo ve ark., 2008). Bitki hücre duvarına mekanik destek, oksidatif ve mikrobiyal saldırılara karşı da direnç sağlayan, hidrofobik amorf heteropolimerdir (Pérez ve ark., 2002). Lignin bitki hücre duvarına sertlik ve güç sağlaması sebebiyle pestisitlere ve hastalıklara karşı fiziksel bir bariyer oluşturmaktadır (Vance ve ark., 1980).

Lignin *p*-koumari, koniferi ve sinapsi alkollerden oluşan üç monomerik aromatik alkolün dehidrogenatif polimerizasyonunu başlatan enzimler tarafından sentezlenmektedir (Boudet ve Grima-Pettenati, 1996). Bu alkollerin oranındaki farklılık bitki türlerindeki arasındaki lignin konsantrasyonunun değişimini göstermektedir (Baurhoo ve ark., 2008). Lignin monogastrik hayvanlar tarafından sindirilemezken, rumen bakteriyel florası lignin polimerlerinin benzil eter bağlarının degradasyonuna olanak sağlamaktadır (Kajikawa ve ark., 2000). Bununla birlikte ligninin bakteriler tarafından degradasyonu hala tam olarak açık değildir (Brown ve Chang, 2014).

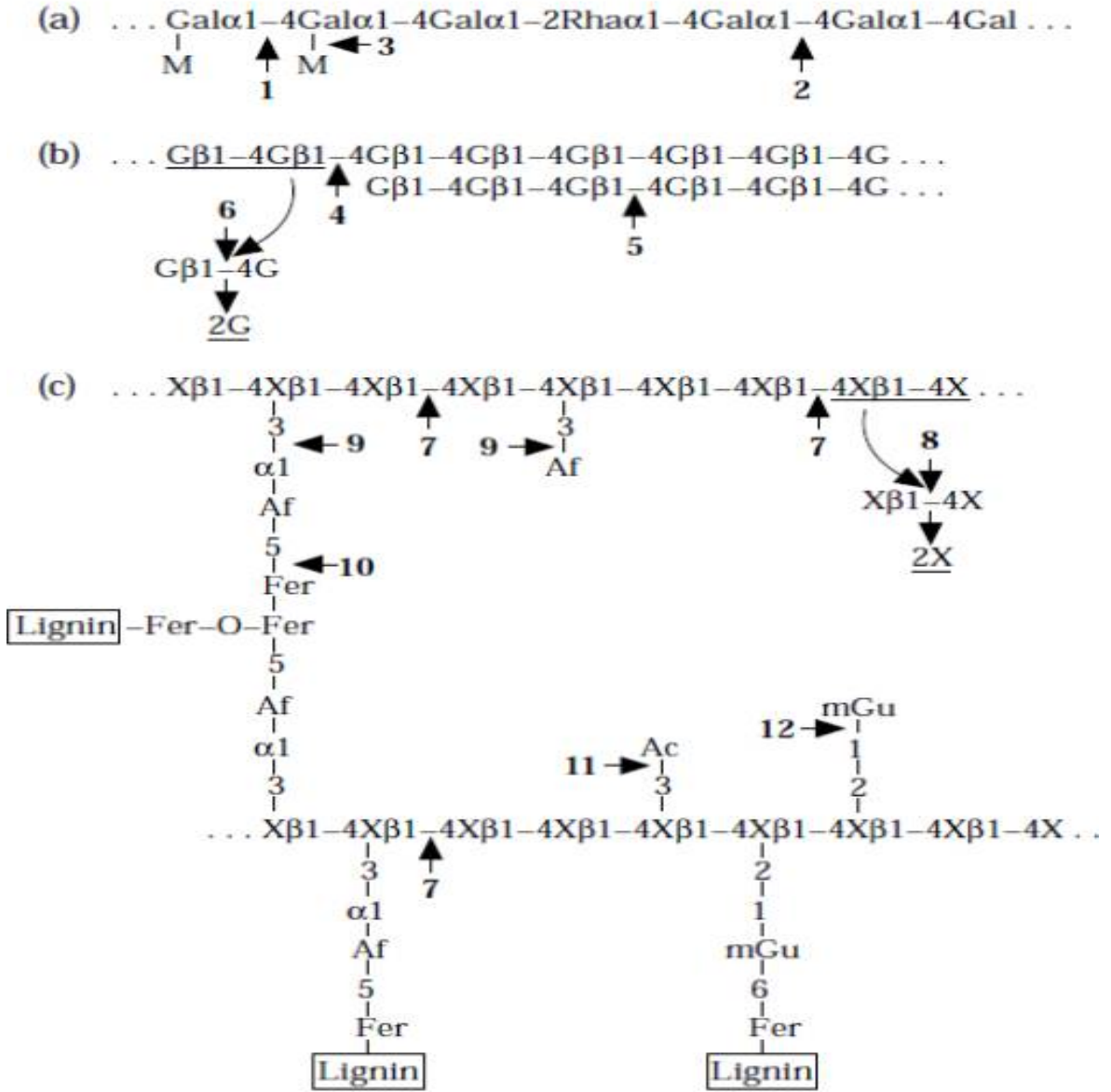
Ligninin degradasyonu sırasında oksijen kullanılmakta ve ortamın anaerobik olması degradasyonunu yavaşlatmaktadır (Çömlekcioglu, 2009). Lignin biyodegradasyonunda fenol oksidazlar ana enzimler olarak kullanılmaktadır (Sánchez, 2009). Bunlar lakkaz (EC 1.10.3.2) lignin peroksidaz (EC 1.11.1.14), manganez peroksidaz (EC 1.11.1.13) olarak isimlendirilmektedir (Hatakka, 1994; Sánchez, 2009). Lignin ve manganez peroksidaz kation radikal oluşumunun aracılığıyla bir elektron oksidasyon aşamasında ardı ardına kullanılarak substratı oksitlemektedir. Lignin peroksidaz yaklaşık % 90 fenolik olmayan bileşikler degrade etmektedir. Mn^{+3} ’ten oluşan manganez peroksidaz lipid peroksidasyon reaksiyonunda fenolik ya da fenolik olmayan lignin birimlerinde yayılabilen oksitleyici olarak davranmaktadır. Lakkaz ise fenoliklerin ya da elektronca zengin diğer substratların bir elektron oksidasyonunu katalizleyen bakır oksitleyici olarak görev yapmaktadır (Sánchez, 2009).

1.3.4. Pektin

Pektin bitki hücre duvarının orta lamelinde ve primer hücre duvarında bulunan yapısal polisakkarittir (Yener ve Yücebilgiç, 2010). Pektin yapısal olarak iyi karakterize edilmiş üç polisakkarit motifi içermektedir. Bunlar homogalakturnan, ramnogalakturnan I ve ramnogalakturnan II olarak isimlendirilmektedir (Mohnen, 2008). Homogalakturnan O-6 pozisyonunda metilenmiş D-galakturnik asidin α -1,4 bağlı kalıntılarını içeren pektin molekülünün omurgasını oluşturmaktadır. Ramnogalakturnan I, L-ramnopiranozun α -1,2 bağlı kalıntılarının yan zincirlerini içeren yüksek dallanmış alana yerleşmiştir. Daha kompleks olan Ramnogalakturnan II yapısı ise bazı bitki hücre duvarlarında tanımlanmıştır. Ramnogalakturnan II’nin bitki hücre duvarının gelişimde yapısal polimer olarak önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (Yadav ve ark., 2009).

Enzimlerin homogalakturnan degradasyonunda esterleşme gerçekleştirmeyen enzimler olarak pektin metil esteraz (EC 3.1.1.11), pektin asetil esteraz (E.C. 3.1.1.6) yer almaktadır. Bunlar poligalakturnonik asit üreten pektinin kalıntıları olan asetil ve metiloksilinin uzaklaşmasını sağlamaktadır. Homogalakturnan alt sınıfının diğer enzimleri depolimeraz olarak isimlendirilmektedir. α -1,4 bağlarını kıran endo-poligalakturnonaz (EC 3.2.1.15) ve transeliminasyon mekanizmasında yer alan pektat liyaz (E.C.4.2.2.2) ve pektin liyaz (E.C. 4.2.2.10)’dır. Pektinazlar temel olarak orta lamel ve primer hücre duvarındaki yapısal polisakkarit olarak meydana gelen pektini degrade

etmektedir (Yadav ve ark., 2009). Şekil 1.3'te hücre duvarında bulunan pektin, selüloz ve hemiselüloz fragmenti ve enzim bölgeleri gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Hücre duvarında bulunan a: pektin, b: selüloz, c: hemiselüloz fragmenti ve enzim bölgeleri (1: pektin liyaz, 2: poligalakturonaz, 3: pektin metilesteraz, 4: sellobiyohidrolaz, 5: endoglukonaz, 6: sellobiyaz, 7: endoksilanaz, 8: ksilosidaz, 9: arabinofuranosidaz, 10: feruloyl esteraz, 11: asetilksilan esteraz, 12: α -glukononidaz) (Selinger ve ark., 1996).

1.3.5. Protein

Bitki hücre duvarı proteinleri beş sınıf altında toplanmaktadır. Bunlar ekstensin, glisince zengin proteinler, prolince zengin proteinler, solanaceous lektinler ve arabinogalaktan proteinlerdir (Showalter, 1993). Glisince zengin proteinlerin dışındaki diğer proteinler hidroksiprolin içermektedir (Cassab, 1998). Ayrıca sisteince zengin thioninler, 28 - 70 kDa büyüklüğünde su düzenleyici proteinler, histidin-triptofanca zengin protein ve birçok hücre duvarı enzimleri (peroksidazlar, fosfatazlar, invertazlar, α -mannosidazlar, β -mannosidazlar, β -1,3-glukanazlar, β -1,4-glukanazlar, poligalakturonazlar, pektin metilesterazlar, malat dehidrogenazlar, arabinosidazlar, α -galaktosidazlar, β -galaktosidazlar, β -glukunosidazlar, β -ksilosidazlar, proteazlar ve askorbik asit oksidazlar yer almaktadır (Varner ve Lin, 1989).

1.4. Likenan

β -1,3-1,4-D-Glukanlar olarak bilinen likenan tahıl endospermlerinin hücre duvarındaki polisakkaritidir. Gramineae ailesine ait arpa, çavdar, sorgum, pirinç ve buğday gibi ticari değeri yüksek tahılların endosperm hücre duvarlarında çok fazla bulunmaktadır (Planas, 2000). Arpa endospermilerindeki karbonhidratların % 75'ini, mısır, buğday, arpa gibi tahılların kuru ağırlıklarının % 5.5'ini meydana getirmektedir (Furtado ve ark., 2011). Likenan yapısal olarak β -1,3 ve β -1,4 glikozidik bağlar ile 1200 β -D-glikozil kalıntısının lineer olarak bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Likenan içerisinde bulunan β -1,3 glikozidik bağı % 25-30, β -1,4 glikozidik bağı ise % 65-70 oranında bulunmaktadır (Maktouf ve ark., 2013). *Cetraria islandica* likeninde β -1,3 ve β -1,4 glikozidik bağlar 1:1 oranında belirlenmiştir (Wood ve ark., 1994). β -1,3-1,4-D-Glukanların enzimatik depolimerizasyonu en az üç farklı endojen glikozil hidrolaz tarafından katalizlenmektedir. Bunlar 1,4- β -D-glukan 4-glukanohidrolaz (EC 3.2.1.4), 1,3- β -D-glukan 3-glukanohidrolaz (EC 3.2.1.39), 1,3-1,4- β -D 4-glukanohidrolaz'dan oluşmakta ve likenaz ismi verilmektedir. Bilinen likenazların birçoğu bakteri orjinlidir ve glikozid hidrolaz (GH)'ın 16. ailesine aittir (Maktouf ve ark., 2013). Endo glikozidazlar arasında en aktif olanını 1,3-1,4- β -D 4-glukanohidrolaz oluşturmakta ve β -1,4 glikozidik bağların kırılması için spesifik bir substrat gerekmektedir (Gaiser ve ark., 2006). β -Glukandan son hidroliz ürünlerini trisakkarit (sellobiosiltrioz) ve tetrasakkarit (sellotrisiltetraoz) oluşturmaktadır (Planas, 2000).

1.5. Nişasta

Nişasta her yerde bulunabilen, enerji kaynağı olan, α -1,4 ya da α -1,6 glikozidik bağlar ile bağlanan α -glikozdan oluşmaktadır (Liu ve ark., 2006). Nişasta amiloz ve amilopektin olmak üzere iki tip glikoz polimerine sahiptir. Amiloz nişasta molekülünün % 20-25'ini, amilopektin % 75 - 80'ini oluşturmaktadır (Sundarram ve Murthy, 2014). Amiloz α -1,4 glikozidik bağları ile bağlanan yaklaşık 6000 glikoz içeren tek zincirli dallanmamış polimerdir. Amilopektin ise α -1,4 glikozidik bağları ile 10-60 glikozun lineer zinciri ve α -1,6 glikozidik bağlarıyla 15-45 glikozun yan zincirlerinde dallanmış polimerler olarak tanımlanmaktadır (Souza ve Magalhães, 2010).

Nişastanın kompleks yapısı sebebiyle, degradasyonunda endo ve ekzo tip enzimler kullanılmaktadır. Endo tip enzimler nişasta, glikojen ve çeşitli oligosakkaritlerin α -D-(1,4)-glikozid bağlarının kırılmasını katalizlemektedir (Cruz ve ark., 2015). Endo tip enzimlerin önemli bir sınıfını klasik α -amilaz (α -1,4-glukan-4-glukanohidrolaz; EC 3.2.1.1) oluşturmaktadır. Glikoamilaz (EC 3.2.1.3), β -amilaz (EC 3.2.1.2), α -glikosidaz (EC 3.2.1.20) enzimlerini içeren ekzo tip enzimler, α -D-(1,4)-glikozid bağların hidrolizi ile substrata dayanan indirgenmemiş son ürünleri oluşturan glikoz ya da maltoza parçalayabilmektedir (Liu ve ark., 2006).

1.6. Bitki Hücre Duvarının Parçalanması

Bitki hücre duvarında yer alan epitelium mum ve pektin tabakaları bitkinin ilk savunmasını oluşturmaktadır. Ot, saman ve tahılların mum tabakası mikroorganizmaların penetrasyonu için potansiyel bir bariyer meydana getirmektedir. Mum tabakası rumende sindirim enzimlerine ve mikroorganizmalara dirençli olmasına rağmen, saman ve tahılların çiğnenmesi bu tabakayı minimize etmektedir (Selinger ve ark., 1996).

Bitki hücre duvarında geniş bir yere sahip olan selülozun parçalanması özelleşmiş multienzim kompleksi ile başarılmaktadır. Bu multienzim kompleksi selülozom olarak ifade edilmekte ve selülozom konseptinin ilk tanımlaması anaerobik, termofilik ve selülitik bakteri olan *Clostridium thermocellum*'a dayanmaktadır (Koeck ve ark., 2015). Selülozom glikozid hidrolaz, polisakkarit liyaz ve karbonhidrat esteraz gibi karbonhidrat degrade eden enzimleri toplayan moleküler ortam olarak bilinmekte (Schwarz ve ark., 2004) ve selülitik rumen bakterilerinde de bulunmaktadır. Selülozomun ana bileşeni enzim entegre protein olan scaffolding (iskelet protein) birimidir. Scaffolding farklı enzimleri ve diğer selülozomal parçaları içine alan birçok

kopyada cohesin modüller (çoklu tutunma bölgeleri) içermektedir. Bu enzimler modülün tamamlayıcı bir tipi olan ve scaffolding alt biriminin cohesin modüllerine sıkıca bağlanan dockerin domain ihtiva etmektedir. Scaffolding cohesin-dockerin ilişkisiyle pek çok enzimin selülozom kompleksinde yer almakta ve farklı bitki hücre duvarlarını parçalayabilmektedir. Ayrıca bilinen selülozom üreten bakteriler arasında selülozom yapısının çeşitliliği, genomda birçok scaffolding ya da enzim bağlantılı kümede onların genlerinin düzenlenmesini ortaya koymaktadır (Bayer ve ark., 2004).

Rumende bitki hücre duvarının parçalanmasını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler arasında substratın yapısı önemli bir yer teşkil etmekte ve bitki hücre duvarı fermentasyonunu etkilemektedir. Ayrıca rumen mikroorganizmalarının özellikleri, popülasyonu ve birbirleriyle ilişkisi de fermentasyonda değişikliğe neden olmaktadır (Flint ve Forsberg, 1995).

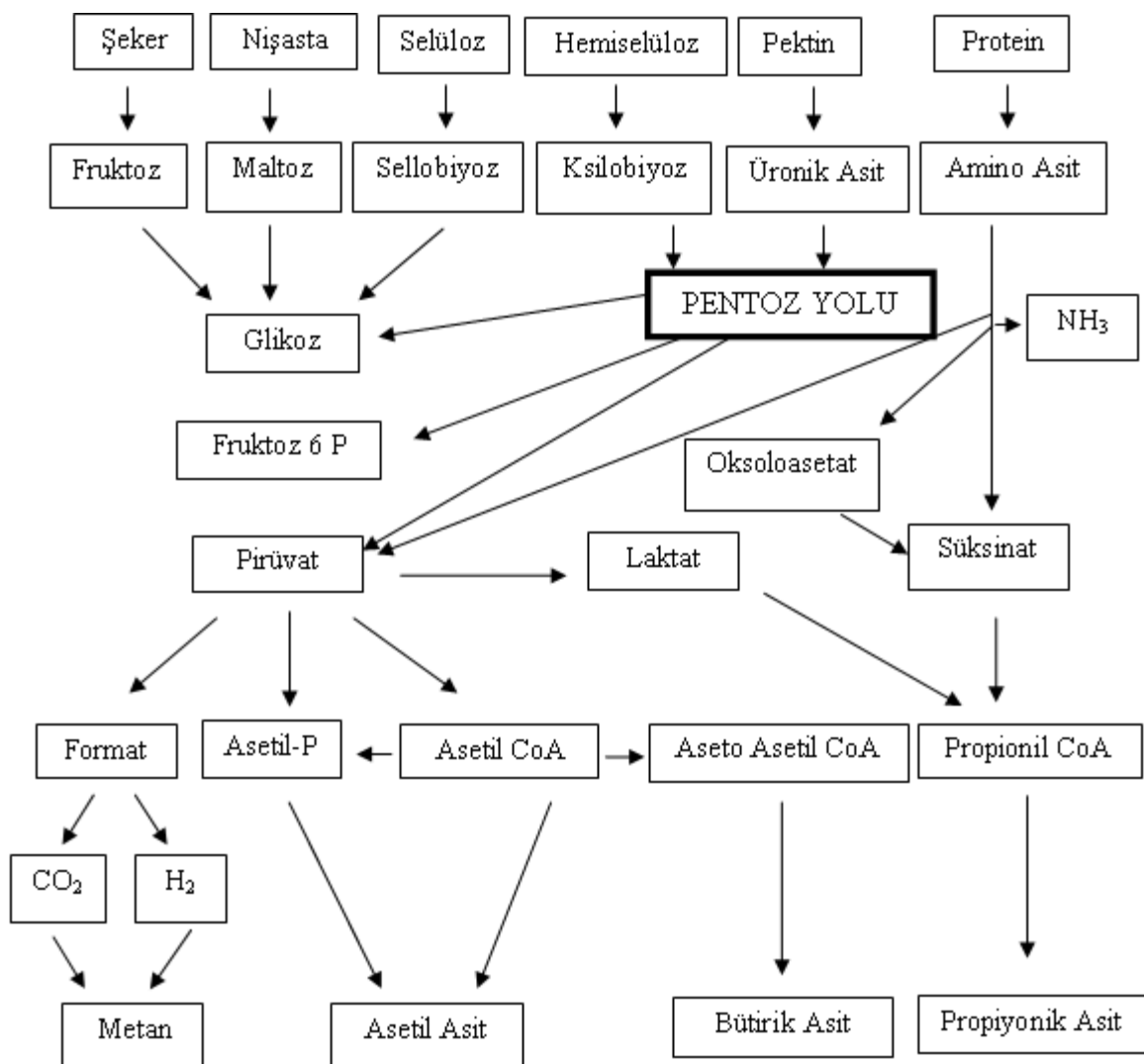
1.7. Rumen Bakterilerinin Enzim Sistemleri

Etkin bir ortam olan rumende biyokütlenin parçalanması için birçok farklı enzim bulunmaktadır (Cheng ve ark., 2012). Rumen bakterilerinin enzimleri, hem hayvan endüstrisi ve beslenmesi hem de biyoenerji açısından büyük bir öneme sahiptir. Rumen bakterilerindeki enzim grupları içerisinde β -glukozidaz gibi glikozid hidrolazların yoğun olduğu belirlenmiştir (Zhao ve ark., 2010). Şekil 1.4'te rumende, karbonhidrat sindiriminde kullanılan enzimlerin yerleri gösterilmiştir (Tekce ve Gül, 2014).

Rumen mikrobiyal popülasyonundaki zenginlik, yeni enzimlere kaynak sağlamaktadır. Rumen selülaz (Ransom-Jones ve ark., 2012), ksilanaz (Li ve ark., 2013), pektinaz, amilaz (Xia ve ark., 2015), proteaz, fitaz ve spesifik bitkilerin toksinlerini de degrade eden tannaz (Chávez-González ve ark., 2012) gibi enzimleri içermektedir. Rumen ekeosistemindeki polisakkarit parçalayan enzimlerin aktivitelerinin, Dünya'da bilinen diğer fermentasyon sistemlerinden 10 kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir (Lee ve ark., 1999). Rumende yer alan enzimlerin çeşitliliği, mikrobiyal komünitenin farklılığı ve bireysel mikroorganizmaların ürettiği fibrolitik enzimlerin çok olmasından kaynaklanmaktadır. Rumendeki kompleks substratların etkin sindirimi için birçok enzimin koordineli çalışması gerekmektedir. Enzimlerin birçoğu çoklu enzim kompleksleri içinde toplanmaktadır. Enzim mekanizmalarının bilinmesi substrat karakterizasyonunu, oluşum yapısını ve degradatif aktivitelerinin bilinmesini etkilemektedir (Selinger ve ark., 1996).

1.7.1. Selülazlar

Selüla β z, selüloz polimerinin hidrolize olmasında kullanılan enzimdir (Forsberg ve ark., 1981). Selülotik bakteriler salgıladıkları endo-1,4- β -glukanaz, ekzo-1,4- β -glukanaz (sellobiyohidrolaz) ve β -glukozidaz enzimleri ile selülozun yapısını bozmakta, sellobiyoz ve glikoza kadar parçalamaktadır (Alataş ve Umucalılar, 2011). Selülotik enzimler tekstil, deterjan, hayvan yemi, gıda ve kağıt endüstrisi gibi çeşitli alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Ikeda ve ark., 2006).



Şekil 1.4. Rumende karbonhidrat sindiriminde kullanılan enzimlerin substrat-ürün ilişkisi (Tekce ve Gül, 2014).

Birçok selüloolitik enzim fiber sindirimini artırmada ve ruminant üretimini geliştirmede kullanılmaktadır (Beauchemin ve ark., 1995). Rumende yer alan *R. flavefaciens*, *R. albus* ve *F. succinogenes* en önemli selüloz degrade eden bakteriler

olarak bilinmektedir. Bunlar endoglukanaz, ekzoglukanaz ve β -glukozidaz üretmektedir (Cai ve ark., 2010). *R. albus* SY3 yüksek moleküler kütleli enzim kümeleri ile ilişkili ve hücre yüzeyinde kabarık bir yapıya sahiptir. Dolayısıyla *C. thermocellum*'un selülozomu ile benzerlik göstermektedir (Ohara ve ark., 2000) *R. flavefaciens*'in birçok suşu ekstraselüler multiprotein kompleks denilen selülozom üretmektedir (Warner ve ark., 2012). *F. succinogenes* ise selülozom kullanarak selülozu degrade edememektedir. Bu bakterinin mekanizması, selüloz degrade eden diğer mikroorganizmaların zıddına tam olarak açıklığa kavuşamamıştır (Lin ve Stahl, 1995). *F. succinogenes*'in genomunun belirlenmesi ile selüloz degrade özelliklerinin anlaşılması, ruminantlarda ve diğer hayvanlarda yer alan farklı *Fibrobacter* türlerinin ilişkisini gösterebilecektir (Matsui ve ark., 2010). Ayrıca *F. succinogenes*'in polisakkarit hidrolizinin anlaşılması biyoyakıt üretimi için selülitik materyalin dönüşümüne yardım edebilecektir (Suen ve ark., 2011).

1.7.2. Ksilanazlar

Ksilanazlar hemiselülozun temel bileşeni olan ksilanın hidrolizini katalizlemektedir (Kulkarni ve ark., 1999). Bunlar ilk olarak glikozid hidrolaz (GH) ailesinden GH10 ve GH11'e kategorize olmuşlardır. Ksilanazların küçük bir miktarı GH5, GH7, GH8, GH16, GH26, GH43, GH52 ve GH62'de bulunmuştur (Collins ve ark., 2005). Son olarak GH30 ksilanazlar keşfedilmiştir (Luo ve ark., 2010a).

Ksilanolitik enzimlerin büyük bir kısmı periplazmada yer almaktadır. Periplazmik boşluk çevresel zararlı faktörlere karşı hidrolitik enzimleri korumaktadır (Miyazaki ve ark., 1997). *Prevotella*, *Butyrivibrio* ve *Pseudobutyrvibrio* rumende yer alan ksilanolitik dominant cinsler arasındadır (Stevenson ve Weimer, 2007). *Prevotella* cinsinin rumenden izole edilen ksilanolitik türleri arasında *P. ruminicola* ve *P. bryantii* önemli bir yere sahiptir. *P. bryantii*'deki ksilanaz üretimi ilk olarak yüksek miktarda ksilooligosakkaritlerin besi ortamına dahil edilmesiyle bulunmuştur (Miyazaki ve ark., 2005). Bu oligosakkaritler *P. bryantii*'nin ekstraselüler ksilanazlarının faaliyeti ya da rumende diğer mikroorganizmaların hidrolitik aktiviteleri ile oluşmaktadır (Zorec ve ark., 2014).

B. fibrisolvens ksilan degradasyonu sonucunda ksilooligosakkaritler üretmektedir. *S. ruminantium* ise ksilanolitik olmamasına rağmen ksilooligosakkaritlerin varlığında büyüebilmektedir. İki bakterinin ko-kültür çalışması sonucunda *S. ruminantium*'un

yüksek miktarda büyüdüğü görülmüştür. Bu sebeple birçok *B. fibrisolvens* daha az ksilanolitik enzim üretmiştir (Cotta ve Zeltwanger, 1995).

1.7.3. Likenazlar

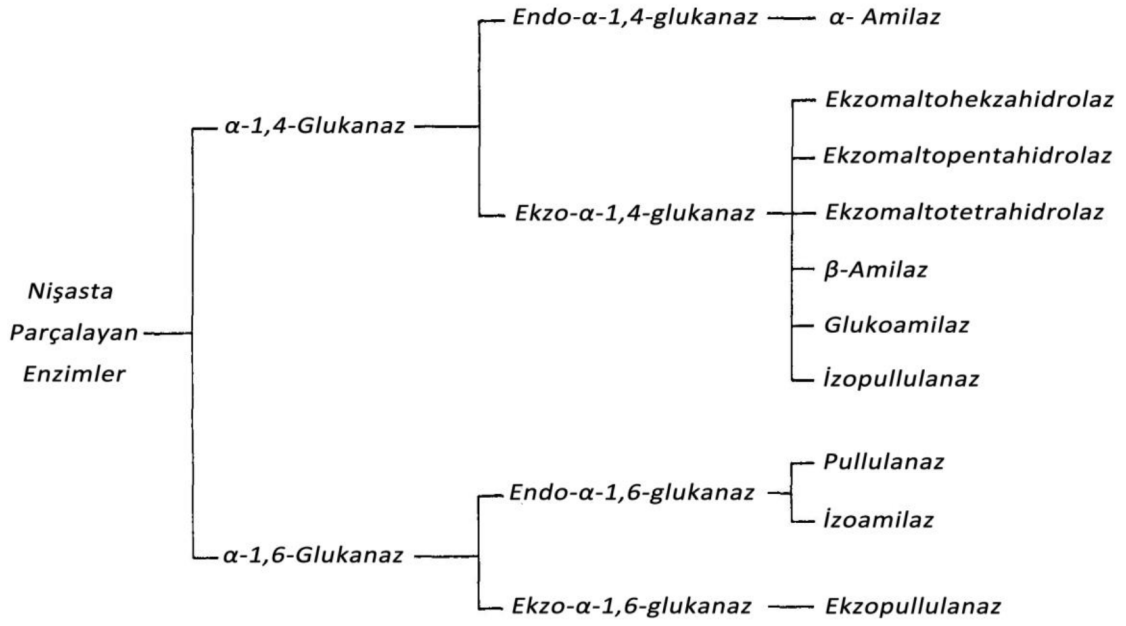
β -1,3-1,4-Glukanazlar olarak da bilinen likenazların birçoğu GH16 ile kategorize olmuştur. Likenazlar enzimatik uygulamalarda ve endüstriyel alanda büyük bir öneme sahiptir (Luo ve ark., 2010b). Bakteriyal likenazlar mayalama ve hayvan yem endüstrisinde biyoteknolojik öneme sahiptir. Likenaz aktivitesine sahip *Bacillus* türleri içerisinde *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus macerans*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus brevis* ve alkalofilik *Bacillus* sp.'ler yer almaktadır. *Bacillus* harici türlerin katalitik domainleri *Bacillus* enzimlerine yüksek derecede benzer sekans göstermektedir. Bununla beraber bu bakterilerin likenaz aktivitesine ek olarak farklı fonksiyonları bulunabilmektedir. *R. flavefaciens*'nin *xynD* geni ksilanaz ve likenaz gösteren bifonksiyonel özelliğe sahiptir (Planas, 2000).

Likenazların *F. succinogenes*'den izole edilerek karakterizasyonları yapılmıştır (Hua ve ark., 2010). *F. succinogenes* glikoz, sellobiyoz ya da selüloz içeren ortamlarda büyüdüğüde likenaz, ksilanaz ve selülaz genleri belirlenmiştir (Béra-Maillet ve ark., 2000). *F. succinogenes*'ten izole edilen likenaz geni *Pichia pastoris* mayasında ifade edilmiştir. Likenaz üretiminin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu enzim toplam salgılanan proteinin yaklaşık % 90'lık bir kısmını oluşturmuştur (Huang ve ark., 2008).

1.7.4. Amilazlar

Amilolitik bakteriler için nişasta önemli bir besin kaynağıdır (Castillo-González ve ark., 2014). Şekil 1.5'te nişastayı parçalayan enzimler şematik olarak gösterilmiştir. Bu enzimler içerisinde α -amilazlar (EC 3.2.1.1) nişastada bulunan α -glukanlardaki α -1,4-glikozidik bağların hidrolizinin katalizlenmesinde sıklıkla bulunmaktadır (Cruz ve ark., 2015). α -amilazlar spesifik ürün oluşturmakta ve geniş substrat kullanmaktadır (Janeček ve ark., 2014).

α -amilazlar gıda, tekstil, kağıt ve farmasötik endüstrisi gibi birçok endüstri alanında geniş uygulama alanında sahiptir (Souza ve Magalhães, 2010). Endüstriyel α -amilazların birçoğu GH13 familyasına ait olarak karakterize edilmiştir (Stam ve ark., 2006). Sadece birkaç α -amilaz GH14, GH57, GH119 ve GH126 ailesine aittir (Janeček ve ark., 2014).



Şekil 1.5. Nişastayı parçalayan enzimler (Nigam ve Singh, 1995).

Amilolitik bakteriler içerisinde önemli bir yere sahip olan *S. bovis* nişasta içeren yüksek konsantre diyetle son ürün olarak laktik asit üreterek, pH'ı düşürebilmektedir (Guo ve ark., 2010). Bu durumu engellemek için ruminant diyetindeki fermantatif karbonhidrat diyetinin ayarlanması gerekmektedir. Ayarlanan diyet ile *S. bovis* hızlı bir şekilde laktik asit üretememektedir. Dolayısıyla nişastayı degrade edebilen *R. amylophilus*, *S. ruminantium*, *S. amylolytica* gibi bakteriler format, asetat, propiyanat ve süksinat gibi diğer uçucu yağ asitlerini üretmektedir. Böylece ruminant çevresindeki biyokimyasal homeostazi sağlanmış olmaktadır (Cotta, 1992).

Amilazlar hücre içi ve dışı aktivite gösterebilmektedir. Ancak birçok amilolitik bakterinin hücre dışı aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Cotta, 1988). Ruminant diyetlerine tahıl eklenmesiyle, ruminal bakterilerin hücre dışı amilaz aktivitesi iki kat artış göstermiştir (Mendoza ve ark., 1998). *B. licheniformis*'ten elde edilen hücre dışı amilaz yüksek tahıl diyetiyle beslenen ruminantlarda nişasta sindirimini artırmaktadır (Rojo ve ark., 2005).

Hücre dışı enzimlerin bazıları ise rumende parçalanmaya dirençli etki göstermektedir. Bu sebeple besin sindirimi potansiyeli artmaktadır (Beauchemin ve ark., 2003). Rumende genel olarak nişasta sindirimi sınırlı olmamasına

rağmen, bazı in vivo ve in vitro deneyler amilaz enziminin hayvan performansını geliştirme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (Klingerman ve ark., 2009).

1.8. Rumen Bakterilerinin Enzim Genetiği

Rumen bakterileri salgıladıkları hücre içi ve hücre dışı enzimler vasıtasıyla bitki hücre duvarında yer alan polisakkaritler ve nişasta gibi karbonhidratları parçalayabilmekte ve sindirebilmektedir (Özel ve Sarıççek, 2009). Enzimlerin özelliklerinin tamamen karakterize edilmesi için enzim sistemlerinin anlaşılması gerekmektedir. Enzim sistemlerinin kompleks ve anlaşılmasının zor olması, gen klonlama ile başarılmıştır. Polisakkarit aktivitesi için kodlanan birçok gen, hızlı karakterize edilmesi ve dizilerinin belirlenmiş olması sebebiyle *E. coli* gibi mikroorganizmalara klonlama gerçekleştirilebilmektedir (Kobayashi ve Onodera, 1999).

S. bovis'in α -amilaz genleri pBR322 vektörü kullanılarak *E. coli* MC1061'de ifade edilmiştir. Rekombinant plazmidler restriksiyon haritalarının temelinde iki grup içinde sınıflandırılmıştır. *S. bovis*'in kromozomal DNA'sında iki α -amilaz geni bulunmuş ve bu genler birbirleriyle homoloji göstermemiştir. *E. coli*'ye klonlanan ve saflaştırılan enzimin N-terminal aminoasit sekansı ve enzimatik özelliklerinin birbirlerinden farklı olduğu belirlenmiştir (Satoh ve ark., 1993). *B. fibrisolvens* amilaz geni klonlanmış ve *E. coli*'de ifade edilmiştir. Bu amilaz geni 2931 bp ve 976 amino asite sahip tek açık okuma bölgesi-open reading frame (ORF) içermektedir. Amilaz aktivitesinin % 86'dan fazlası periplazmada yerleşmiştir. Elde edilen amilaz prokaryot ve ökaryotlardaki amilazlarla karşılaştırıldığında yüksek homoloji göstermiştir (Rumbak ve ark.,1991). α -amilaz geni Firmicutes şubesinde Ruminococcaceae familyasında da görülmüştür (Xia ve ark., 2015).

Ruminococcus albus'un kısmi genom sekansının biyoinformatik analizi likenan içeren glukanları hidrolize edebilen birkaç saf enzim ortaya çıkarmıştır. Her gen *E. coli*'de ifade edilmiş ve rekombinant protein yakın homojenite göstermiştir. Bu enzimlerden Ra0453 ve Ra2830 GH5 ailesinden, Ra0505 GH16 ailesinden, Ra1595 GH3 ailesinden kodlanmıştır. Geniş substrat aralığında Ra0453, Ra2830 ve Ra0505 farklı hidrolitik özellik göstermiştir. Ra1595 proteini β -glukozidaz olarak β -1,3 glikozidik bağların ayrılmasını sağlamıştır. Bu dört enzim likenanı glikoz, sellobiyoz ve sellotrioza hidrolize etmede sinerjik olarak kullanılmıştır (Iakiviak ve ark., 2011).

R. albus 7'den izole edilen *xynA* geni, *S. bovis* JB1'in likenaz geninin sinyal peptid bölgesi ve promotoru içerisine bağlanmıştır. Bu füzyon gen pSBE11 vektör içine insert edilmiş ve rekombinant pXA plazmidi *S. bovis* 12-U-1 hücresine aktarılmıştır. pXA'nın girişi ve ksilanazın üretimi hücrenin büyümesini etkilememiş ve ksilanaz oat-spelt ve birchwood ksilanı parçalamıştır (Nakamura ve ark., 2003).

pVA838 vektörü ile selülitik rumen bakterisi olan *R. flavefaciens* 17'de yer alan *xynD* geni *S. bovis* JB1 içerisine aktarılmıştır. *xynD* geninin ksilanaz ve β -(1,3-1,4)-glukanaz aktivitesini hücre dışında ifade edilmiştir (Ekinci ve ark., 2001). *xynD* geninin her iki aktivitesi 2406 bp uzunluğunda ve 309 amino asit içeren tek ORF içermektedir. Amino ucundaki domain ksilanaz G ailesi içerisinde belirlenmiş, karboksil ucundaki domain ise birkaç farklı bakterinin β -1,3-1,4-glukanazları ile benzerlik göstermiştir (Flint ve ark., 1993).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda yeni ksilanaz genleri bulunmuştur (Zhao ve ark., 2010). *xylN-SH1* ksilanaz geninin GH10 ailesine ait olduğu tanımlanmıştır. *xylN-SH1* geni *C. thermocellum* ATCC 27405'te bulunan GH'a maksimum % 44 oranında benzerlik göstermiştir (Cheng ve ark., 2012). Yeni tanımlanan *xyn10N18* ksilanaz geni ise dört ORF içermiştir. Bu dört ORF endo- β -1,4-ksilanaz GH10 katalitik domaini ile kodlanmıştır (Gong ve ark., 2013). İki fonksiyonel özelliğe sahip *rulCela* geni hem ksilanaz hem de endoglukanaz aktivitesi göstermiştir (Chang ve ark., 2011).

Bifonksiyonel endo-/eksoselülaz kodlayan *celEdx16* geni *E. coli*'ye klonlanmıştır. *celEdx16* geni 1104 bp uzunluğunda ve 367 amino asit kodlamaktadır. Amino asit sekansı *C. thermocellum*'daki endoglukanaza % 53 oranında benzerlik göstermiştir (Ko ve ark., 2011). Ruminal kökenli *umcel5B29* selülaz geni 1611 bp uzunluğunda ve bir ORF'e sahiptir. *umcel5B29* ruminal kültüre alınamayan mikroorganizmaların selülaz genleriyle % 98 benzerlik göstermektedir (Cheema ve ark., 2012). *c67-1* selülaz geni de *E. coli*'ye klonlanmış ve pürifiye rekombinant enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. Bu enzimin pH stabilite aralığının 3.5 – 10.5 arasında olması, selülozun parçalanmasında önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir (Duan ve ark., 2009).

Nükleotid sekansını takiben, iki selülaz enzimi kodlayan *cel5A* ve *cel5B* GH5 ailesine ait olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan her iki enzim de selüloz ve hemiselülozun β -1,4 bağlarını degrade eden bifonksiyonel selülaz ve ksilanaz aktivitesine sahiptir. Bununla beraber enzimlerin fiziksel özellikleri ve substrat profilleri farklılık göstermiştir

(Rashamuse ve ark., 2013). *rubg3A* ve *rubg3B* olarak isimlendirilen β -glukozidaz/ksilozidaz genleri *E. coli*'ye klonlanmıştır. Pürifiye edilen rekombinant RuBG3A ve RuBG3B bifonksiyonel β -glukozidaz/ksilozidaz aktivitesi göstermiştir. Moleküler modelleme ve substrat dockerin sonucunda her enzimde bifonksiyonel aktivite için tek aktivite merkezi olduğu bulunmuştur. Aktif bölge β -glukozidik ve β -ksilozidik substratlarının varlığına göre, substrat spesifitesinin yapı-fonksiyon ilişkisini açığa kavuşturmuştur (Bao ve ark., 2012).

Rumenden izole edilen *B. licheniformis*'ten selülitik ve hemiselülitik aktivite gösteren enzim üretilmiştir. Bu enzimin endoglukanaz aktivitesinin 20 - 50 °C sıcaklıklarda β -glukozidaz ve ksilanaz aktivitelerinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Endoglukanazın optimum sıcaklığına 70 °C'de, β -glukozidaz ve ksilanazın optimum sıcaklığına ise 50 °C'de ulaşılmıştır. Her üç enzim için optimum pH'nın 5 olduğu görülmüştür. Bütün enzimlerin pH 3 – 6 arasında aktiviteleri stabil kalmaktadır (Seo ve ark., 2013).

1.9. Metagenomik

Yeryüzündeki mikroorganizmaların yaklaşık % 1'i in vitro şartlarda konvansiyonel yöntemler ile kültüre alınabilmiştir (Su ve ark., 2012). Dolayısıyla mikrobiyal çeşitlilik ve ekolojinin belirlenmesinde kültüre bağımlı yöntemler yeterli olamamaktadır (Yeates ve ark., 1998). Bu sebeple metagenomik, konvansiyonel mikrobiyal yöntemlere alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Rajendhran ve Gunesekearan, 2008).

Metagenomik, belirli bir çevrede yer alan mikroorganizmanın in vitro şartlarda izole edilmeden ve kültüre alınmadan genomunun çalışılması olarak tanımlanmaktadır. İlk olarak Handelsman ve ark. (1998), tarafından kullanılan bu terim, ekogenomik, mikrobiyal komünite genomu ya da çevresel genomik olarak da adlandırılabilir. Bütün mikrobiyal komünite genomunun izolasyonunu oluşturan metagenomik araştırmalar, mikroorganizma ve çevre ilişkisinin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. Bu sebeple metagenomik teknolojilerdeki ilerlemeler doğada yer alan prokaryotiklerin bir çoğunun değerlendirilmesinde bitmek bilmeyen bir olanak meydana getirmektedir (Singh ve ark., 2008b). Ayrıca, mikroorganizmaların genomlarının direk izolasyonu ve klonlanması vasıtasıyla toplam genetik bilginin değerlendirilmesi mümkün olabilecektir (Uchiyama ve Miyazaki, 2009).

Metagenomik ile biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik parametrelere dayanarak kültüre alınabilen bakterilerin, taksonomi çalışmaları değişmekte ve yeniden belirlenebilmektedir (Rajendhran ve Gunesekaran, 2008). Dolayısıyla metagenomik çalışmalarda daha kesin bir yaklaşım sağlanabilmektedir (Su ve ark., 2012). Metagenomik uygulamaların bu önemli yaklaşımı, mikrobiyal komünitenin fonksiyonel ve sekans açıdan değerlendirilmesine, metagenomik kütüphanenin oluşturulmasına ve bunların sürekli olarak genişlemesine neden olmaktadır (Simon ve Daniel, 2011).

Fonksiyonel dayalı metagenomik direk DNA izolasyonu, klonlama ve metagenomun ifade edilmesini içermektedir (Loaces ve ark., 2016). Fonksiyonel metagenomik özellikle biyoteknolojik alanda enzimlerin tanımlanması ve iyileştirilmesinde kullanılmaktadır (Ferrer ve ark., 2005). Rumende fiber sindiriminde kültüre alınamayan bakteri gruplarının fonksiyonel ve ekolojik katkısı araştırılmıştır. Fiber ilişkili U2 ve U3 grupları bulunmuştur. U2 grubunun rumende yer alan bitki fiberlerine yapıştığı fluorescence in situ hybridization (FISH) kullanılarak floresan sinyaller ile belirlenmiştir. U2 grubundan B76 ve R-25 suşları izole edilmiştir. B76 suşu ksilanolitik *Butyrivibrio fibrisolvens*'ten daha fazla ksilanaz aktivitesi göstermiştir. R-25 suşunda ise α -L-arabinofuranosidaz aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla B76 ve R-25 suşları rumende hemiselüloz parçalanmasına katkı sağlamıştır (Koike ve ark., 2010).

α -glukuronidazın hemiselülözün hidrolizinde önemli bir görevi bulunmaktadır. Metagenomik DNA kullanılarak rumenden izole edilen ilk α -glukuronidaz geni *rum630-AG* olarak isimlendirilmiştir. Bu gen *E. coli*'de ifade edilmiştir. RUM630-AG enzimi endoksilanaz enzimi ile sinerjik olarak çalışmaktadır. Ayrıca RUM630-AG enzimi mevcut α -glukuronidazlarla çok az benzerlik göstermektedir (Lee ve ark., 2012). Metagenomik yöntemler ile rumen sıvısından GH3 ailesine sahip GlyA1 enzimi tanımlanmıştır. Bu enzim β -glukozidaz, β -ksilozidaz, β -galaktozidaz, β -fukozidaz, α -arabinofuranosidaz, α -arabinopiranosidaz aktivitelerini göstermektedir. GlyA1, GH3 ailesinde görülmeyen C-terminal domain içermektedir. Ayrıca GlyA1 moleküler esnekliği ve bütün şeklinin belirlenmesiyle GH3 ailesinin yeni bir alt türü olarak tanımlanmıştır (Ramírez-Escudero ve ark., 2016).

Sığır rumeni kullanılarak elde edilen metagenomic DNA'dan *xyl3A* ve *cel5A* genleri izole edilmiştir. Bu genler klonlanmış ve *E. coli*'de ifade edilmiştir. Xyl3A β -ksilozidaz enzimi GH3 ailesinde, Cel5A selülaz enzimi ise GH5 ailesinde yer almaktadır

(Shedova ve ark., 2009a). β -ksilozidaz ve selüloz genleri, tanımlanmamış bir bakterinin 12071 bp uzunluğundaki fragmentinden karakterize edilmiştir. Bu genlerin ORF bölgesinin amino asit sekansına göre, *Bacteroides* sp. ve memelilerin barsaklarında yaşayan bakterilerin proteinleri ile homolog olduğu görülmüştür (Shedova ve ark., 2009b). *xyn-lxy* ksilanaz geni metagenomik kütüphaneden klonlanmış ve *E. coli*'de karakterize edilmiştir. Bu genin ORF bölgesi 1923 bp nükleotid dizisi ve 640 amino asitten oluşmaktadır. *xyn-lxy* GH10 ailesinin katalitik domainini içermektedir. *xyn-lxy* CBM-9 kültürüne alınmamış Gen Contig1552 bakterisi ile % 97 benzerlik gösterirken, rumende bilinen ksilanazlar ile düşük benzerlik göstermiştir (Wang ve ark., 2015).

Rumen metagenomdan elde edilen EndoG multifonksiyonel endo ve ekzo glukana ve ksilanaz aktivitesi göstermektedir. Çoğunlukla *Prevotella* cinsinden elde edilen EndoG enzimi sığır rumeninden metagenomik yöntemler kullanılarak izole edilmiştir. EndoG geniş sıcak aralığında ve birçok substratta büyüme göstermiştir. Ayrıca bu enzimin tuz ve birçok inhibitöre karşı toleranslı olması endüstriyel uygulamalarda kullanımı için potansiyel oluşturmaktadır (Loaces ve ark., 2016).

Sekans dayalı metagenomik, metagenomik kütüphanenin belirlenmesinde PZR primerlerini ya da prob hibridizasyonunu dizayn etmek için korunmuş DNA sekansına dayanmaktadır. 16S rRNA geni gibi filogenetik tespiti taşıyan klonların sekansı, kültüre alınamayan mikroorganizmalar hakkında fonksiyonel bilgi oluşturmaktadır (Singh ve ark., 2008a). Koyun rumen mikrobiyomunu değerlendirmede fibrolitik enzimlerin tanımlanabilmesi için filogenetik profil analizi (16S rRNA gen) kullanılmıştır. Bakteriyal komünitenin Bacteroidetes ve Firmicutes tarafından dominant olarak görülmüştür. Diğer ruminantlarda olduğu gibi *Prevotella* cinsinin de > % 30 oran ile dominant olduğu belirlenmiştir. Metagenomik okumaların ortalama % 2'sinin karbonhidrat aktif enzim (CAE)'ler olduğu varsayılmaktadır. GH12 ailesinde yer alan CAE'lerin 28 lignoselüloz, 22 amilaz ve 9 diğer CAE olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla koyun rumeninde yeni fibrolitik enzimler belirlenmiştir (Lopes ve ark., 2015).

Sekans dayalı metagenomikte birçok hedef gen dejenere primerler ya da kısmi gen ampikonları kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile amplifiye edilmektedir (Ferrer ve ark., 2008). Keçi rumen içerinden izole edilen metagenomik DNA, ksilanaza ait iki farklı dejenere primer çifti kullanılarak amplifiye edilmiştir. GH10 ve GH11 ailesine ait ksilanazların genetik çeşitliliği, gen fragmentleri bilinen sekanslarla karşılaştırıldığında

< % 95 benzerlik göstermiştir. Filogenetik analizlere göre bütün GH10 ksilanaz sekansları yedi cluster içinde yer almış ve % 88.5 Bacteroidetes ksilanazlarla ilgili bulunmuştur. GH11 ksilanaz sekansları ise beş cluster içinde tanımlanmış ve Firmicutes şubesinden ksilanazlarla % 85.7 benzer bulunmuştur. Sekans analizleri keçi rumeninde tanımlanmamış ve yeni ihtimali yüksek ksilanazları açığa çıkarmıştır (Wang ve ark., 2011a).

Metagenomik yaklaşımlar ile mikrobiyal populasyon ve mikrobiyal komünitenin metabolik potansiyel çalışmaları yapılmıştır. Dört farklı diyet ile beslenen bufalo rumeninden DNA izolasyonu yapılmıştır. Sekans sonucunda bütün rumen örneklerinde Bacteroidetes/Chlorobi, Firmicutes ve Proteobacteria açısından dominant olduğu belirlenmiştir (Singh ve ark., 2012). Sıvı ve katı içerikli bufalo rumen örneklerinin bakteriyal kompozisyonu 16S rRNA geninin pirosekansı kullanılarak araştırılmıştır. Sekanslar taksonomiye bağlı teknikler ile analiz edilmiştir. Bacteroidetes, Firmicutes, Fibrobacteres ve Proteobacteria'nın dominant olduğu görülmüştür. Bununla beraber bakteriyal grup diyet içeriğinin değişmesiyle farklılık göstermektedir (Singh ve ark., 2015).

Rumene adapte olan *P. ruminicola*'nın metabolik önemi yeni genetik elementlerin eldesine dayanılarak çalışılmıştır. Rumendeki tür analizinde metagenomik yöntemler kullanılmıştır. Sekans sonucunda 39 farklı GH ailesine sahip enzim belirlenmiştir. Bunların içinde GH3, GH92, GH18, GH2, GH13, GH31, GH39, GH43 ve GH97 aileleri en çok bulunanlardır. *P. ruminicola*'a ait enzimlerin keşfedilmesi ile kültüre alınamayan rumen mikroorganizmalarının in vitro büyümelerinin gelişmesindeki eksiklerin ortadan kaldırılabileceği düşünülmektedir (Nathani ve ark., 2015).

1.10. Metagenomik DNA

Metagenomiğin en temel ve gerekli süreci, mikrobiyal komünitenin belirlenmesi ve DNA kütüphanesinin yapımı için gerekli olan DNA'nın izole edilmesidir. Ancak, DNA izolasyonunun deneysel prosedüründe sorunlar ile karşılaşılabilir. Mikrobiyal florada var olan her bakterinin DNA örneğinin iyileştirilmesi temel bir engel oluşturmaktadır. Farklı prokaryotik türleri içeren florada kimyasal ve litik enzimler, farklı hassasiyetler gösterebilmektedir (Morita ve ark., 2007). Birçok metagenomik DNA izolasyonunda, sodyum dodesil sülfat (SDS) dayalı ekstraksiyon metotları sıvı azot ya da sıcaklık varlığında freezing-thawing yapılarak enzim kullanılmadan gerçekleştirilmiştir (Zhou ve ark., 1996). SDS hücre membranının hidrofobik yapısını dağıtmaktadır. Aynı

zamanda SDS şelatör ajanlar olarak isimlendirilen EDTA, sodyum fosfat buffer, Tris buffer, Chelex 100 ile kullanılabilir. Ekstraksiyon etkisinin artırılması için EDTA konsantrasyonunun artırılması ile yapılan çalışmalarda yüksek konsantrasyonlarda DNA elde edilirken, izole edilen nükleik asitlerin saflığının düşük olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Dolayısıyla elde edilecek lizis tampon ile hem yüksek konsantrasyonda ürün elde edilmeli hem de izole edilen nükleik asidin saflığının yüksek olması gerekmektedir (Robe ve ark., 2003).

Sığır ve koyun rumenlerinden DNA'yı izole etmek için 15 farklı metot kullanılmıştır. DNA kalitesine göre, DNA izolasyon metotlarının 9 tanesi seçilmiş ve qPZR ile mikrobiyal marker lokusunun sayısı değerlendirilmiştir. Tam bir mikrobiyal sayım DNA izolasyon metoduna bağlı olarak, aynı rumen örneklerinde bile 100 kattan daha fazla farklılık göstermiştir (Henderson ve ark., 2013). Keçi rumen içeriğinden klonlanabilen, yüksek moleküler ağırlıkta (> 23 kb) metagenomik DNA izole edilmiştir. İzole edilen metagenomik DNA'nın 16S rDNA PZR amplifikasyonu gerçekleştirilmiş ve metagenomik kütüphane oluşturulmuştur. Metagenomik kütüphaneden 1600 klon görüntülenmiş ve bunlardan seçilen bir klon endoglukanaz aktivitesi göstermiştir (Bashir ve ark., 2015).

Son zamanlarda prokaryotik komünitenin metagenomiği insan ve hayvan GİS'e doğru ilerleme kaydetmiştir. Mikroorganizmaların birçok grubu, yüksek populasyon yoğunluğu, geniş çeşitlilik ve kompleks bir ortam olması sebebiyle GİS'de yer alan mikrobiyal komünite içinde yer almaktadır. GİS mikroorganizmaları yüz binlerce bakteri içermekte ve bu bakteriler besin girişi, gıda sindirimi, immün sistemin şekillendirilmesi ve patojenlerin nötralize edilmesine katkı sağlamaktadır (Salonen ve ark., 2010).

Dışkı örnekleri gastrointestinal sistem (GİS) mikroorganizmalarının analizi için uygun materyal olarak bilinmektedir. Dışkı örneklerinin bol, kolaylıkla ve sıklıkla bulunabilmesi DNA kaynağı olarak önem oluşturmaktadır. Dışkı örneklerinin heterojen mikroorganizma karışımı içermesi ve düzensiz fizikokimyasal yapıya sahip olması, bakterilerin lize olmasında sorunlar ile karşılaşılmasına neden olmaktadır. Bu sebeple bakterilerin lizi olmasında farklı yaklaşımlar ortaya çıkmıştır. Mekanik, enzimatik ve kimyasal yöntemler olarak belirlenen bu yaklaşımlar, ayrı ayrı veya kombine olarak bakterilerin lize olması için kullanılmaktadır (Salonen ve ark., 2010). Mekanik metot ile DNA izolasyonu yüksek basınç ya da ultrasonik dalgalar ile gerçekleştirilmektedir. Bu metotda vejetatif formlar, sporlar, küçük hücreler kolay bir şekilde dağıtılabilmektedir

(Robe ve ark., 2003). Mekanik metodun en yaygın olarak kullanılanı beat-beading metodudur. Beat-beading metodu ile dışkı örnekleri homojen hale getirilmektedir. Dolayısıyla lizis buffer bütün dışkı örneğine penetre olmaktadır. Ancak, bu metotta DNA izolasyonu sırasında, DNA parçalanabilmektedir. Kimyasal ve enzimatik metotlar ile DNA izolasyonunda, mekanik parçalamaya kıyasla daha az parçalanma olacaktır. Bu metotlarda ise farklı hücre tipleri bütün organizmaların değerlendirilmesinde sınırlı etki oluşturabilmektedir (Salonen ve ark., 2010). Dolayısıyla manual DNA izolasyon protokollerinde DNA ürünüde sorunlar ile karşılaşılabilir (Yu ve Morrison, 2004). Bu sebeple ticari kitlere olan ilgi artmıştır. Dışkıdan DNA'nın izole edilmesinde ticari kitler arasında yer alan QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, ABD) sıklıkla kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 2006; Fliegerova ve ark., 2014).

Dışkı örneklerinden metagenomik DNA izolasyonunda fenol-kloroform, Chelex 100 ve sulu iki-fazlı sistem gibi birkaç farklı metot kullanılabilmektedir (Zhang ve ark., 2006). Bununla beraber metagenomik DNA izolasyonu, çevreden alınan örneklerden direk yapıldığı için inhibitör maddeler fazla olabilmektedir. Özellikle herbivorların dışkı örneklerinde tükettikleri besinler sebebiyle sekonder metabolitler yaygın bir şekilde yer almaktadır. Sekonder metabolitler, PZR inhibitörlerine neden olabilmektedir (Espinosa ve ark., 2015). Bu sebeple literatürde metagenomik DNA izolasyonu ile yapılan çalışmalarda, dışkıdan DNA izolasyon kitlerinin kullanımı yoğunluktadır. Taze ve dondurulmuş dışkı örnekleri ile üç farklı manual DNA izolasyonu ve QIAamp DNA Stool Mini Kit kullanılarak metagenomik DNA izole edilmiştir. Ticari kitin hızlı, kolay ve etkili olması sebebiyle iyi bir metot olduğu belirlenmiştir (Faridi ve ark., 2014). Ancak kullanılan ticari kitler ekonomik olarak yüksek giderlere neden olabilmektedir (Zhang ve ark., 2006). Dolayısıyla ruminant dışkı örnekleri kullanılarak maliyeti düşük, kolay, uygulanabilir, kısa sürede gerçekleştirilecek metagenomik DNA izolasyon metodun belirlenmesi ile ilgili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

1.11. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Rumen mikrobiyal ekosistemi içerisinde büyük bir yer kaplayan rumen bakterileri, biyoteknolojik ve endüstriyel açıdan önem arz etmektedir. Bu bakteriler, ruminantın tükettiği besine bağlı olarak hayvancılık sektöründe ekonomik değere sahip mikroorganizmalardır. Rumen bakterilerinin enzimleri ise endüstriyel olarak ilgi odağı haline gelmiştir. Ayrıca, son yıllarda rumen bakterileri ve enzim genleri ile ilgili

metagenomik çalışmalar hız kazanmıştır. Bu kapsamda çalışma beş ana başlıktan meydana gelmektedir.

İlk olarak, Kahramanmaraş'ta farklı yerlerde yaşayan ruminantların dışkı örnekleri ve mezbahaneden kesilen rumen içerikleri toplanarak, rumen bakteri izolasyonu yapılmış ve bu bakteriler saflaştırılarak, stok kültür haline getirilmiştir. Rumen bakterilerin DNA'ları 16S rRNA gen bölgesi primerleri ile oğaltılmış ve dizi analizi sonucunda tanımlama yapılmıştır.

İkinci olarak, rumen içeriğinden izole edilen bakterilerde yer alan ve ekonomik açıdan öneme sahip olan amilaz ve likenaz enzimleri ile moleküler çalışmalar yapılmıştır. Bu enzimler tasarlanan primerler kullanılarak PZR ile izole edilmiş ve *E. coli*'ye transforme edildikten sonra moleküler/biyokimyasal karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

Sonrasında, rumen içeriğinden izole edilen rekombinant enzimlerin özellikleri klonlandıkları bakterilerde llmştir. Böylelikle bakteri enzim genlerinin optimum değerlerine ulaşılmıştır.

Metagenomik kültüre bağımlı yöntemlerden daha kesin bir yaklaşım sağlayabilmektedir. Ancak metagenomikte direk çevresel örneklerin kullanılması ile inhibisyon maddeler artabilmektedir. Ayrıca ruminant dışkı örneklerinin heterojen ve kompleks yapıda olması, optimum DNA izolasyon protokolünün belirlenememesine sebep olmuştur. Dolayısıyla, bu çalışmanın diğer aşamasını ruminant dışkı örneklerinden saf, kaliteli ve yüksek konsantrasyonda metagenomik DNA elde etmek için optimum metagenomik DNA izolasyon protokolünün belirlenmesi oluşturmaktadır.

Ayrıca, son yıllarda metagenomikte enzim genlerinin keşfedilmesi ve taranması ile ilgili çalışmalar ilgi odağı haline gelmiştir. Bu sebeple çalışmanın son aşamasında optimum metagenomik DNA izolasyon protok kullanılarak izole edilen DNA'ların enzim genleri, dejenere primerler kullanılarak PZR ile oğaltılmış ve dizi analizi ile tanımlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ruminal kökenli bakteriler üzerine yapılan bu çalışmada “Giriş” ve “Bulgular ve Tartışma” bölümlerinde değinilmeyen çalışmaların bir kısmı özetlenerek, farklı bir bakış açısı oluşturulmak istenmiştir. Bu kapsamda rumen bakterilerinin biyolojisi, enzimatik özellikleri, genetiği ve ruminal kökenli metagenomik çalışmalardan bahsedilmiştir.

2.1. Rumen Bakterilerinin Biyolojisi Üzerine Çalışmalar

Callaway ve Martin (1997), rumen bakterileri tarafından selüloz sindirimi ve laktat kullanımında maya (*Saccharomyces cerevisiae*) kültürünün etkisini belirlemiştir. Maya, triptikaz ve laktat içeren besi ortamında *S. ruminantium* (5 g/L kuru ağırlığında) büyümesi uyarılmıştır. Maya kültürü ile toplam UYA, asetat ve propiyonat üretimi artmış, *M. elsdenii* ya da *F. succinogenes* ve *R. flavefaciens* gibi selülitik bakterilerin son ürünü değişmemiştir. Ayrıca maya kültürü organik asit, B vitamini, amino asit gibi çözünmüş büyüme faktörleri ile rumen bakterilerinin büyümesini stimüle etmiştir.

Odenyo ve Osuji (1998), keçi, koyun ve antilop rumeninden tanine toleranslı üç suş izole etmiştir. Bu üç suş 50 - 70 g/L tannik asit ve 50 g/L tannin ekstraktı içeren ortamda büyüyerek *Selenomonas* türleri olarak karakterize edilmiştir. Ayrıca bütün izolatlar 8 g/L kondanse taninde büyüebilmiştir. Bu çalışma ile *Selenomonas* izolatların ruminal detoksifikasyona büyük bir şekilde katkı sağladığı görülmüştür.

Lee ve ark. (2002), sığır rumeninden süksinik asit üreten yeni bir bakteri izole etmiş ve *Mannheimia succiniciproducens* olarak tanımlanmıştır. Bu bakteri % 100 CO₂ içeren ortamda, pH 6.0 – 7.5 arasında büyümekte ve süksinik asit: asetik asit: formik asit (2: 1: 1) üretmektedir. *M. succiniciproducens* 20 g/L glikoz içeren anaerobik besi ortamında kültüre alınmış ve 13.5 g/L süksinik asit üretmiştir.

Bas ve ark. (2003), rumen bakterilerinin yağ asit oluşumu ve lipit içeriğini belirlemek için keçileri mısır ya da yonca yemleri ile beslemiştir. Bu yemler % 40, 70, 100 doğranmış olarak iki öğün verilmiştir. Mikrobiyal hücre maddesi duodenum içeriğinin farklı santrifüjlerinden izole edilmiştir. Bu maddenin yağ asidi % 5’ten % 11’e değişiklik göstermiştir. Yağ eklenmeyen diyetle doymuş ve dallanmış zincirli yağ asitlerin artması ile karışık rumen bakterilerinin enerji rezervi birikmiştir.

Sun ve ark. (2010), rumende kimyasal ve bakteriyel değişim arasındaki ilişkiyi I'den IV'e kadar isim verilen ve periyodik (% 0, 30, 50, 70) olarak artırılan yüksek konsantre diyet ile araştırmıştır. Ruminal diyet I'den II'e değişince pH 6.7'den 5.5'e düşmüştür. Diyet III'te de pH yaklaşık 5.5'te devam etmiştir. Diyet IV'ün ikinci gününde ruminal pH 5.3, üçüncü gününde ise 4.7'e düşmüştür. Toplam UYA konsantrasyonu azalmış ve laktik asit artmıştır. *S. bovis* ve *Prevotella* gibi türler dominant hale gelirken birçok fibrolitik bakteri ortamdan kaybolmuştur. Bununla beraber *S. dextrinosolvens* gibi türler pH'a karşı tolerans göstererek deney boyunca hayatta kalmıştır.

Shanks ve ark. (2011), farklı coğrafik bölgelerdeki et sığırlarını altı farklı diyet ile beslemiş ve bakteriyel komünite değişimini belirlemiştir. Bakteriyal komünite oluşumunun fekal nişasta konsantrasyonu ile önemli bir ilişkisi bulunmuştur. *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* ve *Firmicutes* populasyonlarında büyük bir değişim görölmüştür. Böylece beslenmenin sığır mikroorganizmalarının belirlenmesinde coğrafik bölgeden daha fazla öneme sahip olduğu görölmüştür.

Cersosimo ve ark. (2015), antilop rumeninden aldıkları örneklerde, rumen bakteri populasyonunun çeşitliliğini ve yoğunluğunu araştırmıştır. *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* ve *Firmicutes* şubelerinde bakterilerin yoğun olduğu bulunmuştur. *Prevotella* ve *Cupriavidus* cinslerinin tanımlanmış cinsler içerisinde büyük bir yer kapladığı görölmüştür. *Cupriavidus*'un antilop rumeninde fazla bulunması, diğer ruminantlardan farkını göstermektedir. Bununla beraber tanımlanan diğer cinslerin ortak olduğu görölmüştür. Bakterilerdeki bu değişimin antilopların cinsinden ve mevsime göre tükettikleri diyetten olduğu düşünölmüştür.

Samal ve ark. (2015), buğday samanı ve konsantre karışım içeren bazal diyetle bitki sekonder metabolitlerini eklemiş ve mikrobiyal ekoloji ve rumen fonksiyonu üzerine etkisini araştırmıştır. Kontrol grubu (sekonder metabolit içermeyen), ve üç farklı grup seçilmiştir. Birinci grupta gerekli yağ karışimleri, ikinci grupta gerekli yağlar ve saponince zengin tohumlar ve üçüncü grupta gerekli yağlar, saponince zengin tohumlar ve tanince zengin meyve posaları yer almaktadır. Bazal diyetle pH değişimi görölmemiş ve laktik asit üretimi etkilenmemiştir. Ek karışimler *R. flavefaciens* populasyonunu etkilenmemiş, *F. succinogenes*, fungus, metanojen ve protozoa populasyonu azalmıştır.

Rira ve ark. (2016), ılıman ya da tropikal bölgelerdeki besin sindirilebilirliği ve mikrobiyal gruplar arasındaki farkları belirlemiştir. Toplam UYA konsantrasyonu bölgeye

göre değişiklik göstermezken, tropikal bölgelerin asetat: propiyanat oranı yüksek bulunmuştur. Ilıman bölgelerde *F. succinegenes* daha fazla, *R. flavefaciens* ve *R. albus*'ta fark görülmemiştir. Tropikal bölgelerde protozoa sayısı değişiklik göstermemiş, bölge ve yemin etkileşiminde ise protozoa ve *R. albus* artmıştır.

Sudarman ve ark. (2016), yapısında nişasta bulunan manyok yaprak silajları (MYS) ile beslenen koyunların rumen fermantasyonu, ürün performansı ve besin alımını araştırmıştır. Koyunlar T0 (% 100 kaba yem), T1 (% 100 doğranmış kaba yem), T2 (% 80 doğranmış kaba yem + % 20 konsantre yem) ve T3 (% 80 doğranmış kaba yem + % 20 MYS) olmak üzere dört farklı diyet ile beslenmiştir. Konsantre ya da MYS'nin % 20'lik oranının yer aldığı yemler, koyunların ağırlıklarını ve besin etkinliğini artırmıştır. Toplam rumen bakterilerinde fark görülmezken, konsantre yemler toplam protozoayı artırmıştır. Toplam UYA'da T3 diyeti ile beslenenlerin T2'den daha yüksek olduğu görülmüştür. MYS diyetinin konsantre diyetteki gibi koyun performansını önemli bir şekilde geliştirdiğine ulaşılmıştır.

2.2. Rumen Bakterilerinin Enzimatik Özellikleri Üzerine Çalışmalar

Michalet-Doreau ve ark. (2001), yonca ile beslenen dört koyunun rumeninden, beslenmeden üç saat sonra örnekleri toplamıştır. Toplam mikroorganizma popülasyonunu (TP), katı partiküllere yapışan popülasyonu - solid attached population (SAP) ve katı partiküllere sıkıca yapışan popülasyonu - solid attached firmly population (SAFP) belirlemek için fibrolitik tür aktiviteleri gösteren ksilanazlar, karboksimetil selüloz (KMSazlar) ve β -glukozidazlar belirlenmiştir. Polisakkarit enzimlerin spesifik aktivitelerine en yüksek SAFP, en düşük ise TP'de ulaşılmıştır. Bütün örneklerde *F. succinogenes*'in rölatif popülasyon büyüklüğüne daha fazla ulaşılmıştır.

Eschenlauer ve ark. (2002), in vitro rumen sıvısında farklı substratlardan NH_3 üretimin oranını kıyaslamış ve NH_3 üretimindeki bakterilerin görevlerini değerlendirmiştir. Rumen sıvısı saman ve konsantre diyet karışımı ile beslenen dört koyundan alınmıştır. Triptikazda NH_3 üretim oranı 1.8 – 19.7 nmol.mg/protein.dk arasında değişiklik göstermiştir. Monensin ise proteinlerden, peptitlerden ve amino asitlerden üretilen NH_3 'ü inhibe etmiştir. Toplam bakteri popülasyonunun % 1.4'ü triptikazda büyüebilmiş, bunların % 93'ü ise 5 μM monensin tarafından elimine edilmiştir. Bütün izolatlarda ekzopeptidaz aktivitesi görülmüştür.

Sahu ve ark. (2004), selülitik bakteriyel suşları vahşi ve evcil ruminantların dışkı örneklerinden izole etmiştir. En iyi selüloz degrade eden beş bakteri izolatu (*Ruminococcus* sp.) mikrobiyal ek besin olarak kullanılmıştır. İn vitro şartlarda enzim üretimi ve besin sindirilebilirliğinin etkisi araştırılmıştır. Ceylandan elde edilen izolat, buğday samanı: buğday kepeği (80:20) substrat olarak kullanılıp 24 saat inkübasyona bırakıldığında en yüksek kuru madde sindirilebilirliğini göstermiştir. Aynı izolat KMSaz, ksilanaz, β -glukozidaz ve asetil esteraz gibi fiber degrade eden enzimlerin en yüksek aktivitesini sergilemiştir. Yabani ruminantlardan elde edilen bu bakteri izolatu, evcil ruminantların diyetinde lignoselülitik besinlere ek olarak verilebilecektir.

Qi ve ark. (2008), *F. succinogenes*'ten yeni selülazların belirlenmesi için selülozda büyüyen bakterilerin hücre ekstraktlarını iyon değişim kromatografi ile ayırmış, selülazları zimogram analiziyle tespit etmiş ve peptit kütle parmak izi ile tanımlamıştır. Cel9D selülaz enzimi GH9 selülazların % 20'sinden daha az benzerlik göstermiştir. Bu enzimin fonksiyonlarında GH9 selülazlardan yer alan kalsiyum iyonlarına gerek duyulmamıştır. Ancak tipik GH9 selülazlarda bulunmayan çok önemli yapısal görevi bulunmuştur. Dolayısıyla bu enzimin selo-oligosakkaritlerden glukozun serbest bırakılmasıyla, kristal selülozu parçalamada önemli bir role sahip olduğu belirlenmiştir.

Chai ve ark. (2010), rumenden *Cellulosilyticum ruminicola* bakterisini izole etmiştir. Bu bakteride endoglukanaz, sellobiyohidrolaz, ksilanaz, mannaz, pektinaz, feluloyl esteraz ve asetil esteraz enzimleri belirlenmiştir. *C. ruminicola* hem çözünmüş hem de kristal selülozda polimer hidrolazlar ortaya çıkarmış ve bitki polisakkaritlerini degrade etmiştir. *C. ruminicola*'dan selülozom ve selülozom benzeri protein kompleksleri izole edilememiştir. Bu sebeple fibrolitik enzim ürünleri diğer ruminal mikroorganizmaların selülaz organizasyonundan farklı bir strateji gösterebilmektedir.

Ko ve ark. (2013), multifonksiyonel selülaz CelEx-BR12'i *E. coli* dış membran proteini C (OmpC) kullanarak geliştirmiştir. Ekzozelüler aktivitenin fonksiyonel kanıtı, bütün hücrelerin enzimatik denemeleri ve *E. coli* MC4100 dış membran protein kısımları tarafından sağlanmıştır. *E. coli* MC4100'in selülaz aktivitesinin stabilitesi rekombinant hücrelerin yeniden kullanılabilirliğini gösteren tekrarlanan reaksiyon döngülerinin uygulanması ile test edilmiştir.

Benvenuti ve Pichard (2014), diyetin fibroz bileşenlerinin kullanımını geliştirmek için rumene fibrolitik enzimler eklemiştir. Ticari olarak temin edilen enzimler bireysel ve

farklı karışımlarda kullanılmış ve aktivitelerine bakılmıştır. Selüla, ksilanaz ve pektinaz karışımının en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ticari enzimlerin polisakkaridaz aktivitesi mikroorganizma içermeyen ortamda pH tarafından etkilenmezken, in vitro rumen sıvısında asiditenin artması ile olumsuz olarak etkilenmiştir. Bununla beraber ticari enzimler rumen sıvısına eklendiğinde hidroliz gelişmiştir. Ekzojen ve mikrobiyal enzimler aynı ortam için yarışmıştır.

Nozière ve ark. (2014), süt sığırlarında yüksek ve düşük nişasta sindiriminde ekzojen amilaz etkisini değerlendirmiştir. İlk laktasyon sığırlarında rumen ve duodenumdan aldıkları örnekler ile besin sindirilebilirliğini ölçülmüştür. Ekzojen amilazın ilavesi nişastanın sindirilebilirliğini % 75'ten % 81'e yükseltmiştir. Toplam GIS'teki sindirilebilirlik ise değişiklik göstermemiştir. Aynı zamanda amilaz ilavesi ile asetat ve bütiratın oranı azalmış, propiyonat ise özellikle nişasta diyetinde artmıştır. Rumendeki toplam UYA konsantrasyonu ise artış göstermiştir. Bununla beraber mikrobiyal komüniteden seçilen fibrolitik ve amilolitik bakterilerde bir değişiklik olmamıştır.

Xia ve ark. (2015), Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) ve quantitative FISH kullanarak arpa dayalı diyet ile beslenen düvelerin rumeninde α -amilaz aktivitesini, hücre yüzeyi ile ilişkili nişasta hidrolize eden bakterilerin nitelendirilmesini, tanımlanmasını ve miktarını belirlemiştir. Bu bakteriler toplam bakteri hücresinin % 19 – 23'ünü meydana getirmiştir. Quantitative FISH ile nişasta hidrolize bakterilerin yaklaşık % 70 – 80'inin Ruminococcaceae üyesinde olduğu belirlenmiştir. Ancak in vitro ortamlarda amilolitik aktivite gösteren *S. bovis*, *R. amylophilus*, *S. amylolytica*, *Bifidobacterium* spp. ya da *B. fibrisolvens* görülmemiştir.

Chen ve ark. (2016), süt sığırından izole ettikleri *S. bovis*'in pH 6.5'te glikoz ya da nişasta ekleyerek organik asit üretimini belirlemiştir. Glikoz ya da nişasta miktarının artmasıyla laktat dominant asit olmuştur. Nişastanın artması laktat dehidrogenazı ve α -amilazı artırmıştır. α -amilaz aktivitesi glikoz dozunun değişmesiyle değişiklik göstermemiştir. Pürivat, format liyaz, katabolit kontrol A ve α -amilaz kodlayan genlerin rölatif ekspresyonu glikoz ve nişastanın artmasıyla yükselmiştir. Ayrıca *S. bovis* fermente glikozda nişastadan daha hızlı izole edilmiştir. Glikoz ve çözünmüş nişasta miktarının laktat üretiminde büyük bir etkiye sahip olduğu görülmüştür.

2.3. Rumen Bakterilerinin Genetiği Üzerine Çalışmalar

Hattori ve Matsuki (2007), sığır rumeninde fumarat indirgeyen bakterilerin çeşitliliğini kültüre bağlı ve kültürden bağımsız yöntemlerle analiz etmiştir. On dokuz suş üç farklı besi ortamı kullanılarak izole edilmiş ve bu suşların *Proteobacteria*, *Fusobacteria* ve *Firmicutes* şubelerine ait olduklarına ulaşılmıştır. *Proteobacteria*'dan amplifiye edilen fumarat reduktaz gen (*frdA*) geliştirilmiş ve iki *frdA* klon kütüphanesi oluşturulmuştur. Bu klon amino asit sekansları bilinen diğer fumarat reduktaz genlerle karşılaştırıldığında % 58 - 85 aralığında benzerlik göstermiştir. Bu çalışma ile ilk olarak rumende fumarat indirgeyen bakterilerin çeşitliliği belirlenmiştir.

Paillard ve ark. (2007), *Butyrivibrio* gruplarının farklı filotipler arasındaki ayrımını fenotipik karakteristikler ile araştırmıştır. Filogenetik pozisyon 16S rDNA sekanslardan, farklı ülke ve türden 45 izolatın fermentasyon ürünleri, bütirat oluşum mekanizması, yağ metabolizması ve linoleik asit tarafından büyüme hassasiyeti kıyaslanmıştır. Filogenetik ve metabolik olarak üç alt grup oluşmuştur. Grup VA1 *Butyrivibrio* ve *Pseudobutyrvibrio* izolatları, grup VA2 *Butyrivibrio hungatei*, grup SA ise *Clostridium proteoclasticum* olarak tanımlanmıştır. Bütün izolatlar bütirat üretmiş fakat VA1'in bütirat kinaz aktivitesinin diğer iki izolatın aktivitesinden çok düşük olduğu görülmüştür. Bütirat kinaz geni VA2 ve SA bakterilerinde test edilmiştir. VA1 bakterilerinde ise bütiril-CoA: asetat CoA-transferaz geni belirlenmiştir. Lipaz aktivitesi VA2 ve SA bakterilerinde yüksek, VA1'de düşük bulunmuştur. Sadece SA grubunda linoleik asitten stearik asit oluşmuştur. VA1 bakterileri 200 µg/mL linoleik asit varlığında büyüyebilirken, VA2 ve SA bakterileri 5 µg/mL gibi düşük konsantrasyonda inhibe olmuştur. Bu bilgi clostridial kümenin XIVa grubundaki gram pozitif bakterilerin fenotip ve filogenetik özellikleri arasında güçlü bir bağ sağlamaktadır.

Dodd ve ark. (2010), *P. bryantii* genomunun GH3 ailesinin kodladığı düşünülen dört gen barındırdığını bildirmiştir. Her gen klonlanmış ve *E. coli*'de ifade edilmiştir. Bir gen sellodekstrinaz, üç gen ise β-ksilozidaz kodlamıştır. Rekombinant proteinlerin biyokimyasal analizi, farklı substrat spesifitesi gösteren enzimler ortaya çıkarmıştır. GH3 ailesindeki bu dört enzim lignopolisakkarit hidrolizde spesifik bir görev uygulamak için değişime uğramış ve GH3 enzimleri için substrat spesifitesine bakış açısı sağlamıştır.

Fernando ve ark. (2010), yüksek tahıl içeren diyet adaptasyonda bakteriyel popülasyon dinamiğini Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

analizi, 16S rRNA gen kütüphanesi ve real time PZR kullanarak değerlendirmiştir. T-RFLP analiziyle, yüksek konsantrasyonda tahıl diyeti uygulandığında rumen mikrobiyal popülasyonundaki değişim belirlenmiştir. 16S rRNA gen kütüphanesi ile kaba yemle beslenen hayvanlarda *Fibrobacter*, yüksek tahıl diyeti ile beslenen hayvanlarda ise *Bacteroidetes* şubesine ait bakterilerin arttığı görülmüştür. Real-Time PZR analiziyle ise tahıl miktarının artmasıyla *S. ruminantium*, *S. bovis* ve *P. bryantii* miktarı artmış, *B. fibrisolvens* ve *F. succinoges* miktarı azalmıştır.

Palmonari ve ark. (2010), ruminal bakteriyel komünite oluşumunda pH'nin etkisini belirlemek için, sekiz sığırın rumenine 10'ar dk ara ile pH'ı kaydedebilen elektrotlar yerleştirmiştir. Sığırlar silaj dayalı diyetle beslenmiştir. Ruminal örnekler beslenmeden önce ve beslendikten sonra 3. ve 6. saatlerde alınmıştır. Örneklerden izole edilen DNA'lar PZR ile çoğaltılmış ve Automated Ribosomal Intergenic Spacer (ARISA) analizi yapılmıştır. pH 6.11 - 6.51 arasında ARISA profillerinin analizi, altı sığırdaki komünitenin benzer olduğunu ortaya çıkarmıştır. Diğer iki sığır ise pH 6.30- 6.33 arasında farklı komünite oluşumu göstermiştir.

Pitta ve ark. (2010), bir yıllık danalarda bermuda saman diyetinden buğday diyetine geçişte, ruminal mikrobiyal ekosistemin çeşitliliğini 16S rRNA gen dayalı pirosekans tekniği ile belirlemiştir. Bermuda saman diyetinde *Prevotella* (% 33) ve *Rikenella* (% 28) cinsleri, buğday diyetinde ise *Prevotella* (% 56) cinsi dominant olarak bulunmuştur. Her iki yem tipinin fiber ve sıvı kısımları ile ilişkili mikroorganizmaların ayrı olması ruminal mikrobiyal ekosisteminin çeşitliliğini göstermiştir.

Welkie ve ark. (2010), hayvanların beslenme döngüsü boyunca çevresel şartlardaki değişimi incelemiştir. Karışık yem ile beslenen iki süt sığırının 12 saatlik beslenme ile dört beslenme döngüsü boyunca UYA konsantrasyonu ve ruminal pH'deki değişimi gösterilmiştir. Katı ve sıvı ilişkili örneklerde bakteriyel popülasyon ARISA metodu ile analiz edilmiştir. Beslenmeden 2, 4, 6, 9 ve 12 saat sonunda yüksek derecede bakteriyel çeşitlilik meydana gelmiştir. Sıvı ve katı ilişkili örneklerde ve sığırlar arasında da bakteriyel çeşitlilik görülmüştür. Bununla beraber katı ilişkili örneklerde komünitenin daha stabil olduğu belirlenmiştir.

Yang ve ark. (2010), Tibet sığırının rumendeki bakteriyel çeşitliliğini 16S rRNA geninin filogenetik analizi ile tanımlamıştır. Toplam 130 klon içerisinden 16 klon *B. fibrisolvens*, *P. ruminis*, *R. flavefaciens*, *Succinoclasticum ruminis*, *S. ruminantium* ve

P. ruminicola'ya ≥ 97 benzerlik göstermiştir. Filogenetik analiz kullanılarak klon tanımlanmasının çoğunluğu (% 35.4) ise Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides şubelerinde bulunmuştur. Dolayısıyla Tibet sığırlarında evcil ve yabani ruminantlardan farklı olarak, geniş çeşitlilikte bakteri yer aldığı görülmüştür.

Kenters ve ark. (2011), otlak ile beslenen koyunların rumeninden fermentatif bakterileri izole etmek için, rumen sıvısının tuz içeriğini taklit ederek yeni bir besi ortamı kullanmıştır. Bin tane kültür tüpünün 139'unda büyüme görülmüş ve 54'ü (% 58) saf kültüre alınmıştır. Bunların 14 tanesinin potansiyel olarak yeni cinse ait olduğu belirlenmiştir. Bu kültürlerin GİS çevresinde belirlenen 16S rRNA gen sekansları, isimleri ve kültürdeki farklarına rağmen, kültüre alınamayan bakterilerin genleriyle $> \% 97$ oranında benzerlik göstermiştir. Dolayısıyla kültüre alınan birçok yeni rumen bakterisi, kültürden bağımsız metotların kullanımıyla kültürlerin eksikliklerinin giderilmesine izin vermektedir.

Leng ve ark. (2011), üç farklı sığır türünde dominant rumen bakterilerini Denaturing Gradient Gel Elektroforez (DGGE) metodunu kullanarak belirlemiştir. DGGE profili 16S rDNA filogenetik analizi ile dominant bakteriyel komüniteyi ortaya çıkarmak için kullanılmıştır. Sığır türleri kıyaslanmış ve Gayals ırklarında diğer iki ırka oranla daha fazla dominant bakteri türü belirlenmiştir. Gayals sığırlarında *Lachnospiraceae bacterium*, *R. flavefaciens* ve *Clostridium celerecrescens*, Yarks sığırlarında *R. flavefaciens*, *B. fibrisolvens*, *Pseudobutyrvibrio ruminis*, *Schwartzia succinivorans*, *Clostridiales bacterium* ve Yunnan Sarı Sığırlarında *Prevotella* sp., *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus xylosus* ve *Corynebacterium casei* dominant bakteriler olarak bulunmuştur. *S. lentus* ve *S. xylosus*'un sığır rumeninden ilk izole edilen bakteriler olduğu belirlenmiştir.

Moon ve ark. (2011), *R. albus*'un kısmi genom sekansını ortaya çıkarmıştır. Bu genomik verilerde bitki hücre duvarını degrade enzimlerin birçok formunun yer aldığını görülmüştür. Rumendeki hemiselülozun kimyasal karmaşıklığı sebebiyle, bu bakteri birçok endoksilanazı kullanmaktadır. Ksilan degradasyonunda ek enzim olarak β -ksilozidaz, α -L-arabinofuranosidaz ve α -glukoronidaz meydana gelmiştir. *R. albus*'un farklı endoksilanazlarla ek enzimlerin kombinasyonunda daha fazla ürün açığa çıkmıştır. Bu enzim topluluğu kompleks substratları da parçalayarak basit şekerlere dönüştürmüştür.

Mansour ve ark. (2014), mısır sapı ve pirinç samanı ile beslenen sığırların rumeninden bakteri izolasyonu yapmıştır. *F. succinogenes* ve *R. albus* morfolojik,

biyokimyasal ve 16S rRNA genleri ile tanımlanmıştır. *F. succinogenes* için en yüksek benzerlik % 57 oranında *Streptomyces* sp., *R. albus* için en yüksek benzerlik ise % 77 ile *Enterobacter* sp. olarak belirlenmiştir. Bu izolatlarla mısır sapının degradasyonunun pirinç samanından yüksek olduğu bulunmuştur.

Wu ve ark. (2012), süt buzağıları, inekler ve et danalarının rumen bakteriyel oluşumunu 16S rRNA geninin pirosekansını kullanarak araştırmıştır. Sekanslar taksonomiye bağlı ve bağımsız olarak analiz edilmiştir. Bu seçilen gruplara göre, rumen bakteriyel komünitesi belirgin bir fark göstermiştir. Et danalarının rumeninde Fibrobacteraceae ve Ruminococcaceae'nin bolluğu, muhtemel olarak et sığırlarının fiber sindirici kapasitesinin zenginliğini yansıtmıştır. Ayrıca bu çalışma, rumen mikrobiyal ekosistemindeki yapısal ve fonksiyonel ilişkinin anlaşılması için olanak sağlamıştır.

Rey ve ark. (2014), süt buzağılarının ruminal bakteri komünitelerini 16S rRNA dayalı pirosekans kullanarak analiz etmiştir. İlk iki günde bakteriyel komünite Pasteurellaceae ailesinde dominant olarak belirlenmiştir. Bakteriyel komünite iki ve üç gün arasında birden bire değişmiş ve 12 güne kadar dominant cinslerin *Bacteroidetes*, *Prevotella*, *Fusobacterium* ve *Streptococcus* olduğu görülmüştür. Onbeşinci günden 83. güne kadar katı içerikli besin tüketimi arttığından *Prevotella* dominant cins olmuş ve birçok cins sayısı azalmış ya da tamamen ortamdaki kaybolmuştur. Dolayısıyla diyetin bakteriyel komünite üzerine güçlü bir etkisinin olduğu belirlenmiştir.

2.4. Ruminal Kökenli Metagenomik Çalışmalar

Ferrer ve ark. (2005), süt sığırının rumeninden izole ettikleri metagenomik DNA'yı kullanarak, farklı hidrolitik aktiviteye sahip 22 klon elde etmiştir. Bu klonlar 12 esteraz, dokuz endoglukanaz ve bir siklodekstrinaz olarak tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Elde edilen enzimlerin sekiz tanesinin sekansı ve filogenetik ilişkisi yapılmıştır. Yeni enzimlerin bilinen ester ve GH'lere benzemediği belirlenmiştir.

Liu ve ark. (2009), sığırların rumen mikroorganizmalarının metagenomik kütüphanesinden *RlipE1* ve *RlipE2* isimli iki yeni lipaz geni izole etmiştir. *RlipE1* lipazlar ile % 50, *RlipE2* ise *Thermosinus carboxydivorans* Nor1'in karboksilesterazı ile % 90 benzerlik göstermiştir. Rekombinant lipazlar yüksek termal stabil özellik gösterememekte ve pH 6.5 - 8.5 aralığından daha yükseklerde aktivitelerinin % 40'ını kaybetmektedir. Substrat spesifitesi deneyleri, her iki enzimin de yüksek hidrolitik aktiviteye sahip

olduğunu göstermiştir. Uzun zincirli yağ asitleri için her iki enzimin yüksek spesifitesi ve yeni filogenetik ilişkisi, rumen lipid metabolizmasının çalışmasında ilginç görevleri olduğunu düşündürmektedir.

Kong ve ark. (2010), yonca ya da saman ile beslenen sığırların rumenindeki tür oluşumunu, dağılımını ve bakteri çeşitliliğini 16S rRNA gen bölgesi ile araştırmıştır. Bakteri domaininden 9 şube, 19 aile, 32 cinse ait 613 operational taxonomic unit- işlevsel taksonomik birim (OTU) tanımlanmıştır. Altı yüz on üç OTU'nun 451'i yeni tür olarak tanımlanmıştır. Yonca ve saman diyeti ile beslenen topluluk arasında ve aynı diyet ile beslenen sığırların rumeninde önemli bir fark belirlenmiştir. Tür zenginliği yonca ile beslenen komünitelerde 1027, saman ile beslenenlerde ise 662 olarak tahmin edilmiştir. Metagenomik uygulamalarda diyetin rumen bakteriyel komünite oluşumundaki önemi vurgulanmıştır.

Wang ve ark. (2011b), *xynGR40* ksilanaz kodlayan geni direk olarak rumenden klonlamış ve *E. coli* BL21'de ifade etmiştir. *xynGR40* 1446 bp uzunluğunda ve 481 amino asit kodlayan, GH10 ailesine ait bir katalitik domain içermektedir. Filogenetik analiz sonuçlarına göre, *xynGR40* GIS kaynaklı mikrobiyal ksilanazlar ile yakın ilişki göstermiştir. Pürifiye rekombinant XynGR40 enzimi düşük sıcaklıkta yüksek aktivite açığa çıkarmıştır. Bu enzim mezofilik ve termofilik benzerleri ile karşılaştırıldığında daha fazla hidrojen bağı ve tuz köprüsü içermektedir. XynGR40 mezofilik sıcaklıklarda diğer bilinen GH10 ailesindeki aktif ksilanazlardan daha stabil ve yüksek katalitik etki göstermiştir. Bu özellikler ile XynGR40 enziminin soğukta aktif yeni bir ksilanaz olduğu önerilmiştir.

Del Pozo ve ark. (2012), sığır rumen metagenomunda mikrobiyal, fiber ilişkili yüksek aktivite gösteren dört β -glikozidaz tanımlamış, klonlamış, ifade ve karakterize etmiştir. Enzimler 45 – 55 °C yüksek sıcaklıklarda, 4.0 – 7.0 arası pH'de ve sellobiyoz, sellopentoz gibi doğal sello oligosakkaritlerin yanı sıra sentetik sunbstratlarda da yüksek aktivite göstermiştir. En aktif β -glikozidaz LAB25g2 olarak isimlendirilmiş ve ticari *Trichoderma reesei* selülaz kokteyli ile kombine edildiğinde, son hidrolitik ürünleri artırdığı görülmüştür. Henüz kültüre alınmamış β -glikozidazlar düşük dozda ticari selülazlarla kombine olarak kullanılarak etkili biyoetanol üretimi ile ilgili biyoteknolojik süreçler için potansiyel oluşturabilmektedir.

Sandri ve ark. (2014), rumen içeriğinin sıvı kısmında bakteriyel oluşumu araştırmak için 16S rRNA metagenomik yaklaşımı kullanmıştır. Biyoçeşitlilik için dört laktasyon süt

sığırı üç farklı ek besin ile beslenerek üç gruba ayrılmıştır. Ek besin olarak patates proteini, liyofilize *Saccharomyces cerevisiae* ya da kuru *S. cerevisiae* kullanılmıştır. Rumen örnekleri bu ek besinler ile 15 gün beslendikten sonra alınmış ve bütün sığırlarda *Firmicutes* şubesinin (% 79.76) fazla olduğu görülmüştür. Diyetler arasında sınırlı farklar ortaya çıkmış fakat maya uygulaması ile mikrobiyom veriler sabitlik kazanmıştır.

Kang ve ark. (2015), rumen metagenomundan selüloz ve ksilanaz genlerini klonlamış ve bifonksiyonel füzyon gen olarak yapılandırmıştır. Metagenomik DNA'dan β -glukanaz klonlanmış ve *E. coli* DH5 α 'da ifade edilmiştir. *cel9E* selüloz geni ve *xyn10A* ksilanaz geni art arda dizilmiştir. *cel9E* 2268 bç ve 756 amino asitten, *xyn10A* ise 1578 bç ve 526 amino asitten oluşmuştur. Cel9E enzimi GH9 ailesinde, Xyn10A enzimi ise GH10 ailesinde yer almaktadır. *cel9E* ve *xyn10A* füzyon geni 3909 uzunluğunda ve 1303 amino asit kodlamıştır. Cel9E- Xyn10A bifonksiyonel enziminin optimum sıcaklığı 50 °C olarak bulunmuştur.

Privé ve ark. (2015), fonksiyonel metagenomik kullanarak rumen bakteriyel lipaz/esterazı izole ve karakterize etmiştir. Metagenomik kütüphane süzölmüş rumen sıvısı, katılara yapışan ve sıvıda yer alan rumen içeriğinden izole edilen DNA'lardan oluşturulmuş ve *E. coli*'de ifade edilmiştir. Transformantların lipaz/esteraz aktivitesi tribütirin içeren agarla kaplanmasıyla belirlenmiştir. Katılara yapışan beş, sıvı içinde dört bakteri lipolitik aktivite göstermiştir. Süzölmüş rumen sıvısında ise pozitif klon bulunamamıştır. Elde edilen klonlar, çeşitli lipaz/esteraz aileler ile karşılaştırılmış ve % 40 - 78 homoloji göstermiştir. Bu yeni enzimlerin fonksiyonlarının ruminal metabolizmada iyileştirici etkisi olduğu ve potansiyel endüstride kullanılması düşünülmüştür.

Pitta ve ark. (2016), metagenomik yaklaşımlar kullanarak süt sığırlarındaki rumen mikrobiyomunu karakterize etmiştir. Rumen mikrobiyomu Bacteroidetes (% 70), Firmicutes (% 15-20) ve Proteobacteria (% 7) olarak belirlenmiştir. Süt sığırlarının diyetlerindeki nişastanın % 20-30 artması ile karbonhidrat aktif enzim (CAZyme)'lerin olisakkaritlerin yaklaşık % 70'ini degrade ettiğine ulaşılmıştır. Bu enzimlerin ilk laktasyon döneminde nişasta sindirilebilirliğinde α -amilazdan daha yüksek katkı sağladığı belirlenmiştir.

Prajapati ve ark. (2016), metagenomik yöntemlerle katı ve sıvı içerikli rumen örneklerini kullanarak mikrobiyal komünite ilişkisini değerlendirmiştir. Mikrobiyal

komünitenin yapısını anlamak için kaba diyet oranları % 50, 75, 100 olan üç farklı beslenme rejimi ile yeşil ve kuru diyetle beslenen bufalolar seçilmiştir. Kaba diyetin oranının kaba tip diyetten daha fazla etkili olduğu görülmüştür. Sıvı içerikli rumen örneklerinde daha fazla gen kodlanmıştır. Bütün deney gruplarında dominant şubenin *Bacteroidetes* olduğu belirlenmiştir.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Rumen Bakterilerinin İzolasyonu

Çalışmada kullanılan rumen bakterileri, Kahramanmaraş İli'nde yayılarak beslenen ruminantların dışkılarından ve mezbahanede yeni kesilen hayvanların rumen içeriklerinden izole edilmiştir. Rumen bakterilerinin anaerob ve/veya fakültatif anaerob olması sebebiyle, izolasyon aşamaları anaerobik şartlarda gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Anaerobik besiyerinin hazırlanması

Çalışmada kullanılan bazal anaerobik besiyeri literatür temel alınarak hazırlanmıştır (Orpin, 1976). Kullanılan bazal besiyerinin içeriği Çizelge 3.1'de, mineral ortamın içeriği ise Çizelge 3.2'de verilmiştir. Katı besiyeri hazırlamak için sıvı besiyerine % 1.7 konsantrasyonda agar eklenmiştir.

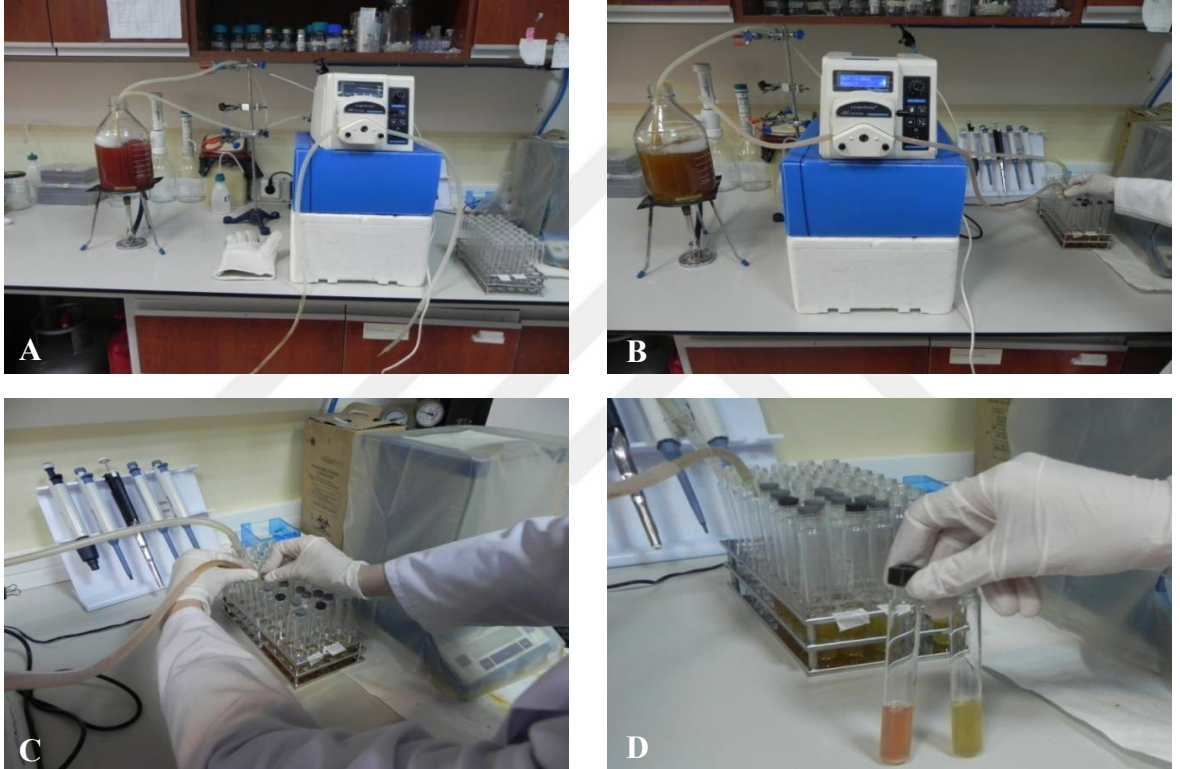
Çizelge 3.1. Kullanılan bazal besiyeri içeriği

Bileşenler	Birim	Besiyeri (100 ml)
Pepton	gr	1.0
NaHCO ₃	gr	0.6
Maya Özütü	gr	0.25
Rumen Sıvısı	ml	10.0
Resazurin (% 0.1)	ml	1.0
L-sistein HCl	gr	0.1
Enerji Kaynağı	gr	0.5
Mineral Solüsyon 1	ml	15.0
Mineral Solüsyon 2	ml	15.0
Saf su	ml	60.0

Çizelge 3.2. Kullanılan mineral ortam içeriği

Mineral Solüsyonlar	Bileşenler	Birim	Mineral Ortamı
Mineral Solüsyon 1	K ₂ HPO ₄	gr	3.0
	Saf su	ml	1000
	KH ₂ PO ₄	gr	3.0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	gr	6.0
Mineral Solüsyon 2	NaCl	gr	6.0
	MgSO ₄ .7H ₂ O	gr	0.6
	CaCl ₂	gr	0.6
	Saf su	ml	1000

Besiyerinde yer alan bileşenlerin hepsi vida kapaklı şişe içerisine eklenerek, saf su ile tamamlanmış, manyetik karıştırıcı (IKA C-MAG HS 7) üzerinde çözülmüş ve bunzen alevinde kaynatılmıştır. Kaynamakta olan besiyerlerine CO₂ gazı verilerek ve L-sistein HCl (Merck / Almanya) eklenerek çözülmüş oksijenin uzaklaşması sağlanmıştır. Ortamın anaerobikliği oksijen indikatörü resazürin ile pembe-mavi-mor renge dönen besiyerinin mat sarıya dönmesi ile anlaşılmıştır. Besiyeri mat sarı renge döndüğünde, önceden CO₂ verilmiş Hungate tüplerine (16 x 125 mm, Bellco Glass Inc., Vineland, NJ. U.S.A.) ve / veya serum şişelere peristaltik pompa (Longer Pump YZ1515x) yardımıyla dağıtılmış ve bunların kapakları hemen kapatılmıştır.



Şekil 3.1. Anaerobik besiyerinin hazırlanma aşamasındaki sistemin görüntüsü (A), CO₂ ve L-sistein HCl eklenmesiyle O₂'nin uzaklaştırılması (B), peristaltik pompa yardımıyla besiyerinin Hungate tüp içerisine dağıtılması (C), Hungate tüp içerisindeki besiyerinin pembe-mavi-mor renkten mat sarı renge dönmesi (D) gösterilmiştir.

Besiyerinde oluşacak herhangi bir kontaminasyonu engellemek için, besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir (Nüve; OT 90). Besiyerinde karbon kaynağı olarak glikoz, nişasta, karboksi metil selüloz (KMS), sellobiyoz, ksilan, tanin, kazein ve skim milk kullanılmıştır.

3.1.2. Rumen sıvısının toplanması, hazırlanması ve saklanması

Rumen sıvısı mezbahanede yeni kesilmiş sığırların rumenlerinden elde edilmiştir. Rumen içeriği iki katlı tülbentten süzülerek büyük partiküllerden ayrıştırılmış ve süzülen rumen sıvısı termos içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen rumen sıvısı 5000 rpm’de 10 dk iki kez santrifüj (Hermle; Z 206A) edilmiştir. Rumen sıvısı 50 ml hacimde - 20 °C’de depolanmıştır. Bu sıvı kullanılmadan önce oda sıcaklığında bekletilerek eritilmiştir.

3.1.3. Dışkı örneğinin toplanması

Dışkı örneği Kahramanmaraş bölgesinde farklı besin kaynakları ile beslenen ruminantlardan alınmıştır (Çizelge 3.3). Dışkı örnekleri toplanırken, dışkının toprağa düşmeden alınmasına dikkat edilmiştir. Bu örnekler hemen laboratuvara getirilmiş, kayıtları tutulmuş ve - 20 °C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.3. Farklı besin kaynaklarıyla beslenen ruminant dışkı örnekleri.

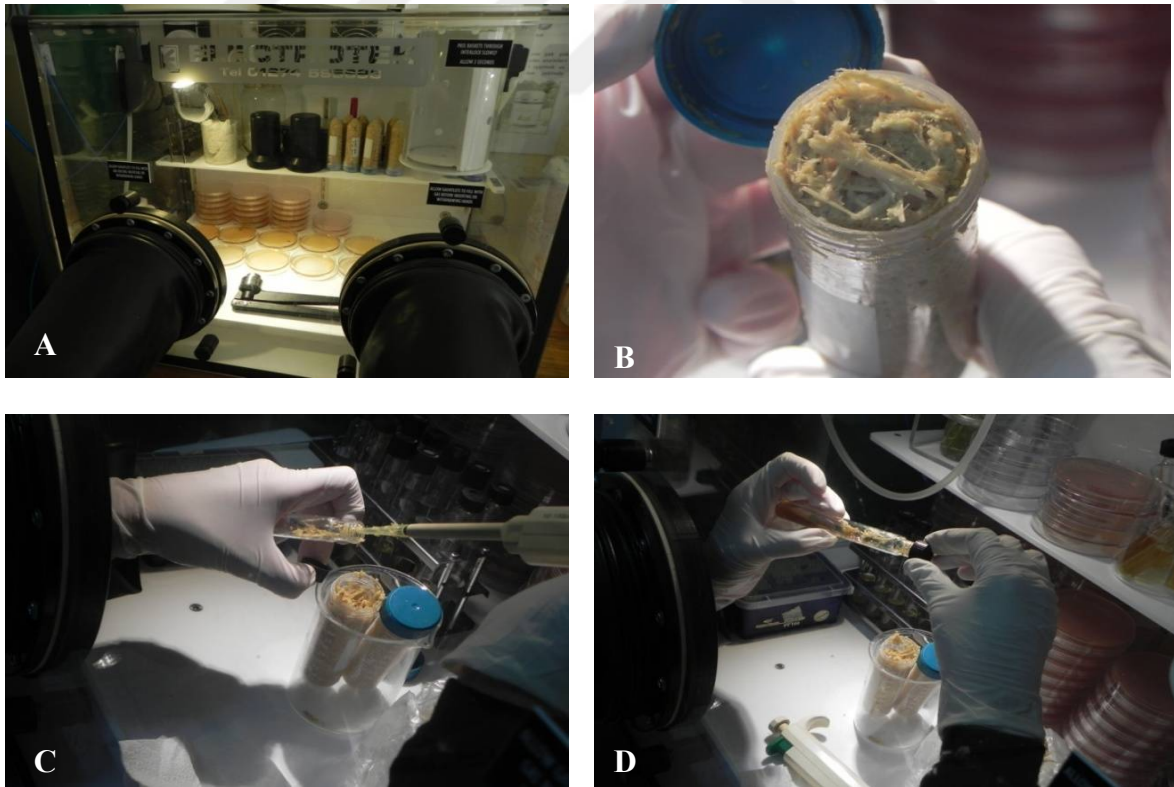
Örnek Adı	Ruminant	Besin kaynakları
D1	Koyun	Yayılım
D2	Dişi, sığır - 2 yaş	Saman, kepek, arpa, küspe
D3	Dişi, sığır - 2 aylık	Saman, kepek, arpa, küspe
D4	Dişi, sığır - 6 yaş	Yayılım, süt yemi, saman, kepek
D5	Keçi	Yayılım
D6	Dişi, sığır - 17 aylık	Yayılım, kepek, arpa
D7	Dişi, sığır - 5 yaş	Yayılım, saman, kepek
D8	Dişi, sığır - 1 aylık	Yayılım, saman
D9	Dişi, sığır - 2 yaş	Yayılım
D10	Dişi, sığır - 3 yaş	Yayılım, süt yemi, kepek, bulgur unu
D11	Erkek, sığır -20 ay	Arpa, kepek, besi başlangıç yemi
D12	Erkek, sığır - 20 ay	Arpa, kepek, besi başlangıç yemi
D13	Erkek, sığır - 20 ay	Arpa, kepek, besi başlangıç yemi
D14	Erkek, sığır - 20 ay	Arpa, kepek, besi başlangıç yemi
D15	Erkek, sığır - 20 ay	Arpa, kepek, besi başlangıç yemi

3.1.4. Rumen içeriğinin toplanması

Rumen içeriği mezbahanede yeni kesilmiş ruminantların rumeninden falkon tüplere alınmış, zaman kaybetmeden laboratuvara getirilmiş ve gelir gelmez kayıt altına alınarak rumen bakteri izolasyon çalışmalarına başlanmıştır. Rumen içeriğinin geriye kalanı – 20 °C’de depolanmıştır.

3.1.5. Bakteri izolasyonu

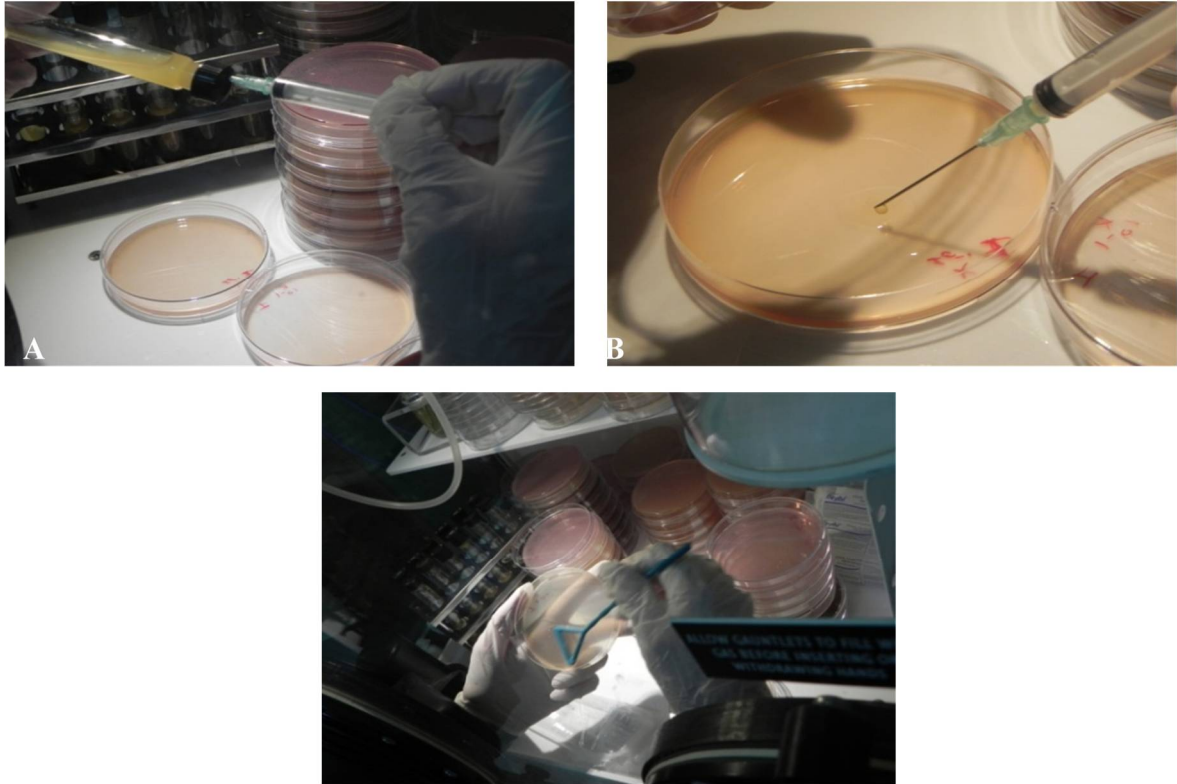
Bakteri izolasyonu anaerobik kabin (Electrotek AW200SG; İngiltere) içerisinde dışkı örneği ve rumen içeriği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 1 gr dışkı örneği 50 ml bazal besiyerinde CO₂ gazı ile çözülmüştür. Diğer taraftan yaklaşık 50 µl rumen içeriği ise anaerobik kabinde 5 ml bazal besiyerine eklenmiştir. Hazırlanan dışkı örneği veya rumen içeriğinin yer aldığı 0.5 ml besiyerinden, 4.5 ml farklı karbon kaynağının yer aldığı Hungate tüp içerisindeki besiyerine aktarılmıştır. Aynı şekilde 10⁻², 10⁻³ ve 10⁻⁴’e kadar seyreltme yapılmıştır. Seyreltilen örnekler katı besiyerine yayılmış ve 39 °C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Şekil 3.2’de anaerobik kabin içerisindeki bakteri izolasyonunun aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Anaerobik kabin içerisindeki petri kutularına besiyerinin döküldükten sonraki görüntü (A), mezbahaneden gelen rumen içeriği (B), rumen içeriğinin besiyerine aktarılması (C), rumen içeriğinde seri dilüsyon yapılması (D) gösterilmiştir.

3.1.6. Bakterilerin saflaştırılması

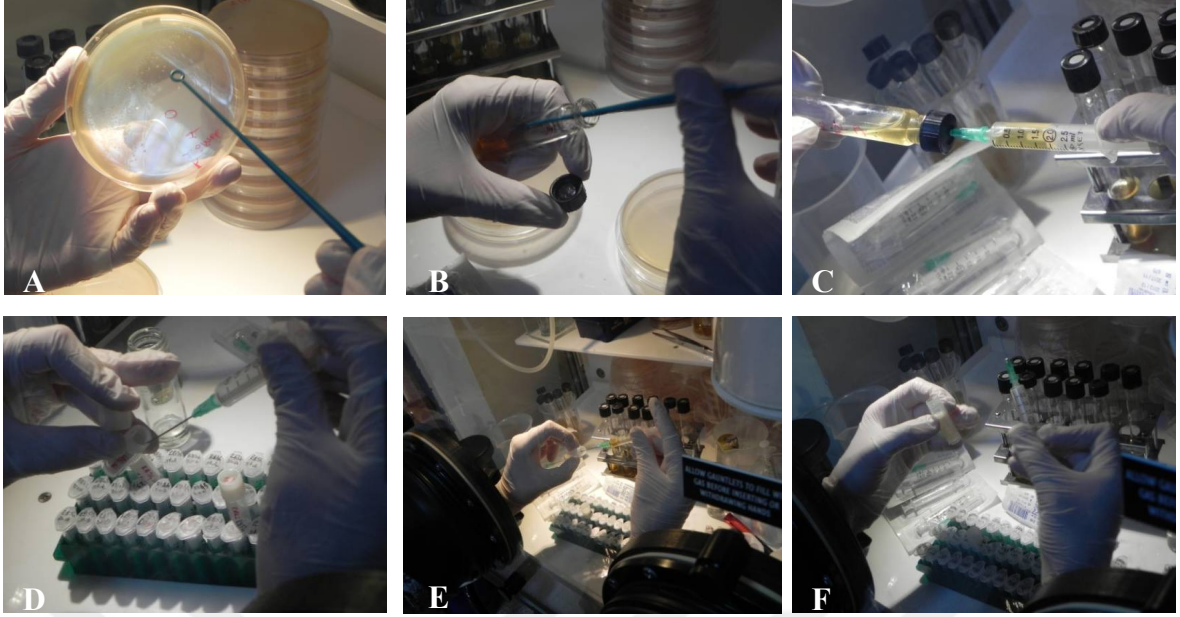
Anaerobik bakteriler büyüdüktan sonra, bakterilerin saflaştırılması aşaması % 0.5 (w/v) farklı karbon kaynağı ve % 1.7 (w/v) agar içeren anaerobik besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Bu besiyeri 3.1.1’de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri kullanılacağı zaman 100 °C’lik su banyosunda eritilmiş ve yaklaşık 45 - 50 °C’ye kadar soğutularak petri kutularına dökülmüştür. Bu aşamada saf kültürlerin elde edilmesi için üç kez saflaştırma yapılmıştır. Şekil 3.3’te bakterilerin saflaştırma aşamaları yer almaktadır.



Şekil 3.3. Hungate tüp içerisinde yer alan dilüsyon yapılmış örneğin enjektör yardımıyla alınması (A), örneğin katı besiyerine eklenmesi (B), örneğin besiyerine yayılması (C) yer almaktadır.

3.1.7. Bakterilerin stoklarının oluşturulması

Petride yer alan saf kolonilerden bir tane seçilmiş, bu koloni sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 39 °C’de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Kültür anaerobik şartlarda % 60’lık steril gliserol ile stoğa alınmıştır (Şekil 3.4). Stok kültür daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere – 20 °C’de depolanmıştır.



Şekil 3.4. Katı besiyerinde büyüyen tek koloninin alınması (A), koloninin sıvı besiyerine inoküle edilmesi (B), karvovial içerisine bir gece büyümüş kültürün aktarılması (C), aynı karyoviale % 60'lık gliserol eklenmesi (D), kültür ve gliserolün karıştırılması (E), karvovial içerisindeki kültürün – 20 °C için hazır hale gelmesi (F) gösterilmiştir.

3.2. Kullanılan Bakteriler ve Büyüme Koşulları

3.2.1. Konak bakteri

Bu çalışmada konak bakteri olarak kullanılan *E. coli* DH5 α Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Klonlama çalışmaları bu bakteri kullanılarak yapılmıştır. *E. coli* DH5 α ve elde edilen bakteriler ve özellikleri Çizelge 3.4'te gösterilmiştir.

3.2.2. Transformant bakteri

Bu çalışmada oluşturulan transformant bakteriler ve özellikleri Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan konak ve transformant bakterilerin bazı özellikleri.

Bakteriler	Özellği	Besiyeri
<i>E. coli</i> DH5 α	Amp ^r , konak hücre	LB broth
<i>E. coli</i> A1	pGEMTA1 içeren <i>E. coli</i> DH5 α	LB broth
<i>E. coli</i> L1	pGEMTL1 içeren <i>E. coli</i> DH5 α	LB broth

3.2.3. Antibiyotik

Kullanılan antibiyotik stok solüsyon olarak hazırlanmıştır. Stok antibiyotik solüsyonu bakteriler inoküle edilmeden önce besiyerine eklenmiştir. Antibiyotik olarak ampisilin kullanılmış ve bu solüsyon 100 mg/ml konsantrasyonda, suda çözünerek hazırlanmıştır. Ampisilinin besiyerindeki son konsantrasyonu ise 150 µg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.4. Kullanılan besiyerleri ve inkübasyon şartları

E. coli 37 °C’de inkübatör (Lovibond; TC 175S) içerisinde Luria-Bertani (LB) Broth besiyerinde 250 rpm’de çalkalamalı olarak (IKA; 260 Basic) veya LB-Agar’da (Sambrook ve Russell, 2001) geliştirilmiştir. LB Broth besiyerinin içeriği Çizelge 3.5’te verilmiştir. Bu ortama % 1.7 (w/v) agar eklenerek LB Agar besiyeri oluşturulmuştur. Besiyerinde herhangi bir kontaminasyonu engellemek için otoklavda 121 °C’de 15 dk steril edilmiştir.

Çizelge 3.5. LB Broth besiyerinin kimyasal ve miktar kompozisyonu.

Kimyasallar	Miktar (gr/L)
NaCl	5
Pepton	10
Maya Özütü	5

3.3. Moleküler Biyoloji Metotları

Rumen bakterilerinden bazı enzim genlerinin moleküler karakterizasyonunun belirlenmesi genomik DNA izolasyonu, primerlerin tasarlanması, genlerin çoğaltılması, izolasyonu, klonlanması, bakterilerin transformasyonu, genlerin DNA dizilimi ve dizi analizi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Genomik DNA izolasyonu

Bakteriler üredikleri karbon kaynaklı anaerobik besiyerinde bir gece büyütülmüştür. Bakteri hücreleri 5000 rpm’de 10 dk santrifüj yapılarak çöktürülmüştür. Bakteriyal genomik DNA’ların izolasyonunda CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) DNA izolasyon protokolü kullanılmıştır (Nishiguchi ve ark., 2002). Bu protokole göre hücre

pelleti Tris-EDTA (TE) ile çözülmüştür. Çözülen pellet üzerine 30 µl % 10'luk SDS ve 3 µl 20 mg/mL konsantrasyonda proteinaz K eklenerek vortekslenmiş ve 37 °C'de 60 dk inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında 100 µl 5 M NaCl ve 80 µl genomik DNA izolasyon çözeltisi (0.7 M NaCl ve % 10 CTAB) eklenerek, iyice karıştırılmış ve 65 °C'de inkübasyona bırakılarak lizis aşaması gerçekleştirilmiştir. DNA kloroform: izoamil alkol (24:1 v/v) ile diğer organik maddelerden arındırılmıştır. Bir hacim izopropanol ve % 70'lik etanol ile DNA çöktürülmüş ve santrifüj sonunda üst sıvı dökülerek, tüp içerisindeki etanol uçurulmuştur. DNA TE ile çözülmüş ve - 20 °C'de depolanmıştır.

3.3.2. Oligonükleotid primerler

İzole edilen rumen bakterilerinin moleküler olarak tanımlanması için literatürde kullanılan 16S rRNA gen bölgesi primerlerinden bazıları temin edilmiştir. Rumen bakterilerin amilaz ve likenaz enzim genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yolu ile çoğaltılması için ise NCBI (National Center of Biotechnology Institute, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)'da bugüne kadar DNA dizisi ortaya çıkartılmış bakteriyel amilaz ve likenaz enzim genlerinin bir kısmı taranmıştır. NCBI'dan elde edilen genlerin analizi CloneManager 5 programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Her bir primer için erime sıcaklığı "DNA Calculator" programı (<http://www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp>) kullanılarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada kullanılan primerler İontek (İstanbul) ve Ella Biotech GmbH'den (Almanya) tedarik edilmiştir. Primerler üretici firmaların protokollerine uygun olarak steril ultra saf su ile sulandırılmış ve istenen konsantrasyonlarda ayarlamalar yapılmıştır.

3.3.2.1. 16S rRNA gen bölgesi primerleri

Bu çalışmada anaerobik kabinden izole edilen bakterilerin tanımlanabilmesi için 16S rRNA gen bölgesi primerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Kullanılan 16S rRNA gen bölgesi primerleri.

Primer Adı	Primer Dizilimi (5' - 3')	Kaynak
27F	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	Lane, 1991
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	Weisburg ve ark., 1991

3.2.2.2. Amilaz primerleri

S. bovis amilaz primerleri NCBI’den yer alan *S. bovis* α -amilaz genleri (AB000830.1 ve U04956.1) seçilerek ve homoloji analizi yapılarak tasarlanmıştır. Çizelge 3.7’de amilaz geni için tasarlanan primerlerin dizilimi verilmiştir. Aşağıda primerlerin tasarlandıkları bölgeler gösterilmiştir. Sekansın kısaltılması için bazı bölgeler çıkartılmış ve yerlerine “=” işareti verilmiştir.

AB000830.1 TGACTAACCAGGAAAAAATACAGATGCTTATCGGTCAGGATAAAGTTTGGGGAGCAATTT
U04956.1 -----

=

AB000830.1 TCATGTTAGCTGCCTTGAGTAACATGTCACTCAAACATTTTCAAAAATCATGTGCATCT
U04956.1 TTATGTTAGCAGCTCTCAGTAACATGCCATTTAAACCTTCGCTAGAATCATCATTTGCT
* * * * *

AmySbF →

AB000830.1 GCAAACCTATTTCAATCATCGGTCATATTCTACTTCTTTTATGGTGGTGAATGGTTTT
U04956.1 GCAAACCCATCTCAATTATTGGTCACATTTTACTGCTTTTATGGTGGTGAATGGGTCA
* * * * *

AB000830.1 TACATATTATGTAAAAGTCTGAGGAAAATCTC-GGGCTTGTTTTATTTTTATTGCGCA
U04956.1 TTCATATCATCTAAGTCTAGGATTTTTTCTTAGAACTTTTATTTTACAACGCA
* * * * *

=

AB000830.1 AAGAGCATCCTACTTCTCTTGCTGTTTTAATCAACAACGCTCATTCTACAGCAAAACGAA
U04956.1 ACGAACACCCAACCTGCTCTTGCTGGTCTCATCAATAATAGCAAAGCCACATCAAAGCGCA
* * * * *

AB000830.1 TGTTTGTAGGCAAAAAATGGGCAGGAAAAACGTTTACAGATTATCTCGGAAATCAAATT
U04956.1 TGTTTGTGGTGAAAAATGGGCTTGCAAATTGTTCACTGATGCTCTTGGCAACCAAGCTG
* * * * *

AB000830.1 CTACTATCGTCATTGACGAAGAAGTTACGGCAGTTTTCCAGTTGGCGCAGAATCCGTCT
U04956.1 CGCATGTCCAAATCGATGAGCAAGGCTATGGTGATTTCCCTAGTCGGTGAAAAATCAGTCA
* * * * *

AB000830.1 CTGCTTATATTCCACAAGATCAATAAATCATCTTATAAAACAAAAACGATTAGA---C
U04956.1 GCGCTTGGATACCACTACCAAAATAATGATATAAAAAAGCGATTAAGAAAGTGTTCCTA
* * * * *

U60830.1 CAGCGTCTTTTAAACGGCACACACATGGAAAGCCAGGACGATTTTTTACTGGAGACAGTG
 HQ834722.1 -----
 Z25877.1 CAGCGTCTTTTAAACGGCACACACATGGAAAGCCAGGACGATTTTTTACTGGAGACAGTG
 Z25880.1 CAGCGTCTTTTAAACGGCACACACATGGAAAGCCAGGACGATTTTTTACTGGAGACAGTG

≠

U60830.1 ATGTATGATCAATAAAGAAAGCGTGTTCAAAAAAGGGGAATGCTAACATGAAACGAGTG
 HQ834722.1 -----
 Z25877.1 ATGTATGATCAATAAAGAAAGCGTGTTCAAAAAAGGGGAATGCTAACATGAAACGAGTG
 Z25880.1 ATGTATGATCAATAAAGAAAGCGTGTTCAAAAAAGGGGAATGCTAACATGAAACGAGTG

LicBF →

U60830.1 TTGCTAATTCTTGTCAACC**GGATTGTTTATGAGTTTGT**GTGGGATCACTTCTAGTGTTCG
 HQ834722.1 -----
 Z25877.1 TTGCTAATTCTTGTCAACC**GGATTGTTTATGAGTTTGT**GTGGGATCACTTCTAGTGTTCG
 Z25880.1 TTGCTAATTCTTGTCAACC**GGATTGTTTATGAGTTTGT**GTGGGATCACTTCTAGTGTTCG

U60830.1 GCTCAACAGGCGGATCGTTTTTTGAACCTTTTAACAGCTATAACTCCGGGTATGGCAA
 HQ834722.1 ATGCAACAGGTGGATCGTTTTTTGAACCTTTTAACAGCTATAACTCCGGATTATGGCAA
 Z25877.1 GCTCAACAGGCGGATCGTTTTTTGAACCTTTTAACAGCTATAACTCCGGGTATGGCAA
 Z25880.1 GCTCAACAGGCGGATCGTTTTTTGAACCTTTTAACAGCTATAACTCCGGGTATGGCAA

≠

U60830.1 GCAGCCAATGCCTATCATACGTATGCGTTCGATTGGCAGCCAACTCTATTAAATGGTAT
 HQ834722.1 GCGGCCAATGCCTATCATACGTATGCGTTCGATTGGCAGCCAACTCTATTAAATGGTAT
 Z25877.1 GCAGCCAATGCCTATCATACGTATGCGTTCGATTGGCAGCCAGGGTATATTAAATGGTAT
 Z25880.1 GCATCAAAGGGCTTCCATACCTATGCTTTCGATTGGCAGCCAGGGTATATTAAATGGTAT
 ** * ** * ** ***** * *****

U60830.1 GTCGACTGGCAATTAAACATACTGCGACAACCCAAATTCGACAGCGCCGGGAAAGATC
 HQ834722.1 GTCGATGGGCAATTAAACATACTGCGACAAGCCAAATCCCACAAACCCGGGAAAGATC
 Z25877.1 GTAGACGGTGTTTTGAAACATACCGCCACCGCGAATATTCGAGTACGCCAGGCAAAATT
 Z25880.1 GTAGACGGTGTTTTGAAACATACCGCCACCGCGAATATTCGAGTACGCCAGGCAAAATT
 ** ** * ** ***** ** ** * ** **

U60830.1 ATGATGAATTTGTGGAATGGTACGGGTGTCAGTGATTGGCTCGGTTCTACAATGGCGTA
 HQ834722.1 ATGATGAACTTGTGGAATGGGATAGGTGTCGATGACTGGCTCGGTTCTACAATGGTGTA
 Z25877.1 ATGATGAATCTATGGAACGGAACCGGAGTGGATGACTGGTTAGGTTCTTATAATGGAGCG
 Z25880.1 ATGATGAATCTATGGAACGGAACCGGAGTGGATGACTGGTTAGGTTCTTATAATGGAGCG
 ***** * ***** ** * ** ** *** ** * ***** ** ***** *

← **LicBR**

U60830.1 AATCCGCTATACGCTCATTACGACTGGG**TGCGCTATACAAAAAATAA**TGTACAGGAAAA
 HQ834722.1 AATCCGCTATACGCTCATTATGACTGGG**TGCGCTATACAAAAAATAA**GCGGC-----

Z25877.1 AATCCGTTGTACGCTGAATATGACTGGGTAAAAATATACGAGCAATTAATATGATTGCAGC
 Z25880.1 AATCCGTTGTACGCTGAATATGACTGGGTAAAAATATACGAGCAATTAATATGATTGCAGC
 ***** * ***** * ** ***** ***** * ** ***

≡

U60830.1 AGCGGAAGCGGCTTCGGCGATGATGGGAAGGACACCGAAGTAAAAGGCGTCATTCGACAT
 HQ834722.1 -----
 Z25877.1 -----
 Z25880.1 -----

U60830.1 GAAAAAGGTGAATGGCATGCTGACG
 HQ834722.1 -----
 Z25877.1 -----
 Z25880.1 -----

Çizelge 3.8. *Bacillus* sp. likenaz geninin tasarlanan primerlerinin dizilimi, baz uzunlukları (bç) ve erime sıcaklıkları (T_m).

Primer Adı	Primer Dizilimi (5' - 3')	Baz Uzunluğu (bç)	Erime sıcaklığı (T _m , °C'de)
LicBF	GGATTGTTTATGAGTTTGT	19	51.1
LicBR	TTATTTTTTTGTATAGCGCA	20	55.27

3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, 0.2 µM ileri ve geri primerler, < 10 ng kalıp DNA, 4 µl 10X tampon, 200 µM dNTP ve 0.5 U Taq DNA polimeraz karışımı ile gerçekleştirilmiştir. PZR amplifikasyonu 94 °C'de 5 dk ilk denatürasyon ile başlatılmıştır. Daha sonra 35 döngü olarak 94 °C'de 30 sn denatürasyon, primerler için optimum yapışma sıcaklığında 30 sn bağlanma ve 72 °C'de 1 dk uzama ile devam ettirilmiştir. PZR'nin gerçekleşmesi için Thermal-cycle (Bio-Rad, ABD) kullanılmıştır.

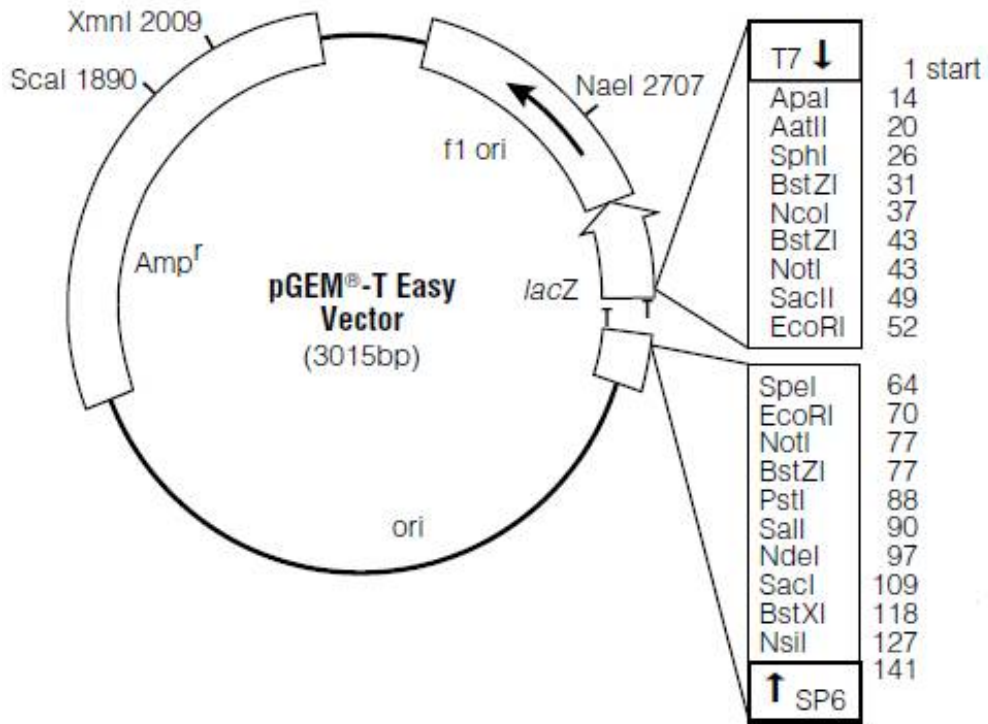
3.2.4. DNA jel elektroforezi

Agaroz jel hazırlamak için, istenilen konsantrasyonda agaroz 1xTBE (90 mM Tris Base; 90 mM Borik Asit; 2 mM EDTA: pH 8) tamponu içerisinde eritilmiş ve dökülmüştür. Jelleşme gerçekleştikten sonra 5 µl örnek ve 1 µl yükleme tamponu (Vivantis, Malezya) karıştırılmış ve jele yüklenmiştir. Jel büyüklüğüne göre 120 V'ta

(Major Science, MP-300V; Tayvan) 35 - 60 dk elektroforezde (Clever Scientific; İngiltere) yürütülmüştür. DNA kontrolü olarak 100 bp uzunluğundaki DNA standardı (Vivantis, Malezya) kullanılmıştır. DNA'nın elektroforezi tamamlandığında 0.5 µg/ml konsantrasyondaki Et-Br ile 20 dk boyanmıştır. UV Transillüminatör (Major Science, Tayvan)'de görüntülenmiş ve fotoğrafı çekilmiştir (Nikon, COOLPIX P100; Japonya).

3.2.5. pGEM-T klonlama vektörüne ligasyon

Klonlama pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega, ABD) ve Taq DNA Polimeraz (Vivantis, Malezya) enzimi kullanılarak yapılmıştır. Bu enzim çoğaltılan bölgenin 3' - 5' uçlarına adenin (A) eklemektedir. Ticari olarak temin edilen pGEM[®]-T Easy vektör linear durumda ve 3' - 5' uçlarında timin (T) yer almaktadır. Bu sebeple DNA bölgesi ve vektör kesme işlemine uğratılmadan ligasyon yapılabilmektedir. Şekil 3.5'te pGEM[®]-T Easy vektör görülmektedir.



Şekil 3.5. pGEM[®]-T Easy vektör.

Ligasyon işleminde 5 µl ligasyon tamponu, 1 µl pGEM[®]-T Easy vektör, 3 µl PZR ürünü ve 1 µl T4 DNA ligaz enzimi kullanılmıştır. Reaksiyon 4 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmış ve 65 °C'de 20 dk sonunda inaktivite edilmiştir.

3.2.6. *E. coli* hücrelerinin kalsiyum klorür metodu ile transformasyonu

E. coli, LB sıvı besiyerine ekilerek 37 °C'de 250 rpm'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Bu kültürden 100 ml LB besiyerine 2 ml inoküle edilmiştir. Hücrelerin OD₆₀₀'leri 0.3 - 0.4 olana kadar 37 °C'de inkübasyona tabi tutulmuştur. Sonrasında hücreler 10 dk buz üzerinde bekletilmiş ve 3000 rpm'de 4 °C'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz atılarak, pellet üzerine 5 ml soğuk, steril 100 mM'lık CaCl₂.2H₂O eklenmiş, hücreler çözülerek, 30 dk buzda bekletilmiştir. Aynı şekilde 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş ve üst faz atılarak, hücreler 500 µl soğuk 100 mM'lık CaCl₂.2H₂O ile tekrar çözülmüştür. Bu hücreler 200 µl olarak tüplere dağıtılmıştır. Alıcı hücrelere ligasyon ürünü eklenmiş, 42 °C'de 2.5 dk ve sonrasında buz üzerinde 10 dk bekletilmiştir. Hücrelerin üzerlerine 700 µl LB besiyeri eklenmiş ve 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda hücreler ampisilin içeren LB agar besiyerine ekilmiş ve 37 °C'de bir gece inkübasyon bırakılmıştır (Mandel ve Higa, 1970).

3.2.7. Amilolitik ve likenolitik enzim geni içeren kolonilerin seçilmesi

Gen transferi sonucunda enzim aktivitesi gösteren transformant hücrelerin seçilebilmesi için kolonilerin üzeri, % 0.4 (w/v) agaroz (Sigma) ve 50 mM sodyum fosfat (pH 6.5) tamponla hazırlanan, amilolitik aktivite için % 0.5 (w/v) nişasta (Merck), likenolitik aktivite için % 0.1 (w/v) likenan (Sigma) ile kaplanmıştır. Bu ortam herhangi bir kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak için, kullanılmadan önce otoklavda steril edilmiştir. Fosfat tampon 50 mM Na₂HPO₄ ve 50 mM NaH₂PO₄ içeriğinden oluşmaktadır. Üzeri kaplanan koloniler 37 °C'de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda nişasta içeren ortam ile üzeri kaplanan koloniler lugol (3 KI+ 7 I₂ w/v) ile boyanmıştır. Likenaz içeren ortam ile üzeri kaplanan koloniler ise Kongo kırmızısı % 0.5 (w/v) ile boyanmış ve fazla boya 1 M NaCl ile yıkanmıştır (Teather ve Wood, 1982).

3.2.8. Plazmit DNA izolasyonu

Plazmit DNA izolasyonu bir gece boyunca büyütülmüş bakteri kültürü kullanılarak yapılmıştır. Kültür 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş, üst faz atılmış ve bakteri hücreleri plazmit DNA izolasyonu için hazırlanmıştır. Plazmit DNA izolasyonu üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir (Vivantis, Malezya). İzolasyon sonunda elde edilen plazmit DNA sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere – 20 °C'de depolanmıştır. Bu çalışmada kullanılan ticari ve elde edilen plazmitler Çizelge 3.9'da yer almaktadır.

3.2.9. DNA dizi analizi

Elde edilen genlerin nükleotid dizilerinin belirlenmesi için uygun primerlerle gerçekleştirilen PZR ürünleri agaroz jele yüklenmiş ve üretici firmanın protokolüne uygun olarak GF-1 AmbiClean Kit (Vivantis, Malezya) kullanılarak saflaştırma yapılmıştır. Sonrasında saflaştırılan PZR ürünleri dizi analizine gönderilmiştir (Makrogen, Kore). Dizi analizinde iki yönlü okuma yapılmış ve kromatogramlarının görüntülenmesi için ChromasPro V1.7.7 (Technelysium Pty Ltd) programı kullanılmıştır.

Çizelge 3.9. Kullanılan plazmidler ve özellikleri.

Plazmitler	Özellikleri
pGEM [®] -T Easy	Amp ^r , klonlama vektörü, 3015 bç
pGEMTA1	Amp ^r , 1640 bç <i>amyI</i> içeren pGEMT vektör, 4655 bç
pGEMTL1	Amp ^r , 564 bç <i>licI</i> içeren pGEMT vektör, 3579 bç

3.2.10. Filogenetik analiz

Bu çalışma ile dizi analizi ortaya çıkartılmış genlerin filogenetik analizinin yapılması için, NCBI’da bulunan benzer genler BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programı kullanılarak belirlenmiştir. Genlerin çoklu dizilenmesi ClustalX programıyla yapılmıştır. Bu dizileme Mega 6.06 programında Mega formatına dönüştürülmüş ve Unweighed Pair Group Method of Aritmetic Averages (UPGMA) metodu ile dendrogram elde edilmiştir.

3.3. Enzim Çalışmaları

Rumen bakterilerinden enzim üretmek ve aktivite denemeleri için enzim genleri ile aşağıda belirtildiği gibi çalışılmıştır.

3.3.1. Enzim ekstraktlarının hazırlanması

Enzim ekstraktları hücre dışı ve hücre içi olarak iki farklı şekilde hazırlanmıştır. Enzim üretilen bakteri 37 °C’de bir gece inkübasyondan sonra, 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Hücre dışı enzimlerin elde edilmesi için süpernatant kullanılmıştır. Hücre içi enzimlerin belirlenmesi için ise pellet temiz bir tüpe alınmış ve iki kez 50 mM sodyum fosfat (pH 6) tampon ile yıkanmıştır. Sonrasında Şekil 3.6’da gösterildiği gibi

hücreler sıvı azot ile dondurulmuş, hücre kırıcıda öğütülerek parçalanmış ve hücre içi materyal açığa çıkartılmıştır. Hücre içi materyal 1 ml 50 mM sodyum fosfat (pH 6) tamponu ile çözülmüştür. Hücre kırıcıda öğütülen pellet 14000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiş, süpernatant temiz bir temiz tüpe alınmış ve hücre içi enzim kaynağı olarak ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C 'de depolanmıştır.

3.3.2. Enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Enzim aktivitelerinin belirlenmesinde Miller (1959)'e ait metot kullanılmıştır. Standart enzim reaksiyonu amilaz için 10 μl enzim ekstraktı ve 240 μl substrat [% 0.5 nişasta ve 50 mM sodyum fosfat tampon (pH 6.5)], likenaz için 50 μl enzim ekstraktı ve 200 μl substrat [% 0.2 likenan ve 50 mM sodyum fosfat tampon (pH 6.5)] karışımından oluşmaktadır. Her iki enzimin aktivitelerinin belirlenmesi için karışımlar 40°C 'de 60 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda karışımın üzerine 250 μl 3-5 dinitrosalisilik asit (DNS) solusyonu (% 30 sodyum potasyum tartarat, 2 N NaOH, % 1 DNS) ilave edilmiş ve reaksiyon 5 dk kaynar su banyosunda bekletilmek suretiyle durdurulmuştur. Kontrol grubunda ise enzimin çeşidine göre deney grubundaki substrat miktarının üzerine, enzim ilave edilmeden önce 250 μl DNS ilave eklenmiş, DNS sonunda enzim ekstraktından ilave edilmiş ve 5 dk kaynar su banyosunda bekletilerek hazırlanmıştır. Kontrol ve deney grubu karışımları saf su ile 1 ml'ye tamamlanmış ve $\text{OD}_{540\text{ nm}}$ 'de absorbansları ölçülmüştür. Bütün enzim çalışmaları üç tekerrürlü çalışılmıştır.



Şekil 3.6. Hücrelerin sıvı azotta dondurulması (A), hücre kırıcıda öğütülerek parçalanması (B), hücre içi materyalin açığa çıkartılması C) gösterilmiştir.

3.3.3. Optimum pH değerinin belirlenmesi

Enzimlerin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin saptanması amacıyla farklı pH'larda hazırlanmış substratlar kullanılmıştır. pH 4.0 – 5.5'in hazırlanması için asetat

tamponu, pH 6.0 – 8.0'nin hazırlanması için sodyum fosfat tamponu ve pH 8.5 – 10.5'in hazırlanması için Glisin-NaOH tamponu kullanılmıştır (Temizkan ve Arda, 2004). Bu tamponlar ile amilaz için % 0.5 nişasta, likenaz için % 0.2 likenan içeren substrat solusyonlar hazırlanmıştır. Sonuçta 50 mM konsantrasyonda, pH değeri 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5 substrat solusyonları hazırlanmıştır. Tüm çalışmalar standart enzim prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir.

3.3.4. Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

Enzimlerin optimum sıcaklık aktivitesinin saptanmasında, amilaz için 4, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C, likenaz için 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 ve 65 °C sıcaklıklarda inkübasyon yapılmıştır.

3.3.5. Enzimlerin termal stabilitelerinin saptanması

Enzimlerin termal stabilitelerinin saptanması için amilaz enzimi 30, 40, 50, 60 ve 70 °C, likenaz enzimi 40, 45, 50, 55, 60 ve 65 °C sıcaklıklarda 60 dk süre ile ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyon sonunda, enzim buz içerisine alınmış, optimum pH ile hazırlanan substrat ilave edilmiş ve optimum sıcaklıkta reaksiyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır.

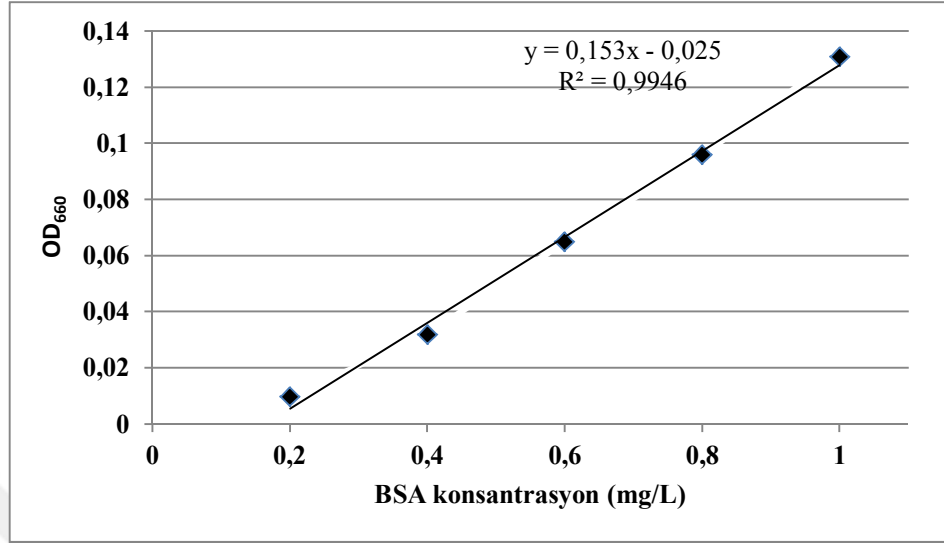
3.3.6. Enzimlerin pH stabilitelerinin saptanması

Enzimlerin pH stabilitesinin belirlenmesi için 4.5, 5.5, 6.5, 7.0, 7.5, 8.5 ve 9.5 pH'larda hazırlanmış tamponlarda enzim çözölmüş ve enzimin termal stabilitesinin en yüksek olduğu sıcaklıkta 15 dk ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyon sonunda, enzim buz üzerine alınmış, substrat ilave edilerek prosedür aynen devam ettirilmiştir.

3.3.7. Protein tayini

Protein miktarının saptanması için Lowry (1951) metoduna dayanan Folin ayracı kullanılmıştır. Bu amaçla Çözelti 1: % 2 CuSO₄.5H₂O (w/v), Çözelti 2: % 2 Na-K Tartarat (w/v), Çözelti A: % 2 NaCO₃ (w/v) (1 M NaOH ile çözölür) hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler (1 ml çözelti 1, 1 ml çözelti 2 ve 98 mL çözelti A) kullanılarak Çözelti B oluşturulmuştur. Temiz bir tüpün içerisine 0.5 mL örnek, 2.5 mL çözelti B ilave edilmiş ve 10 dk bekletilmiştir. Karışım üzerine 0.25 mL Folin ayracı eklenmiş, vorteksenerek 30 dk oda ısısında bekletilmiş ve OD₆₆₀ nm'de okunmuştur. Protein standartı olarak faklı

konsantrasyonlarda (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1.0 mg/ml) sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. Şekil 3.7’de BSA kalibrasyon denklemi gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Farklı BSA konsantrasyonlarındaki kalibrasyon denklemi.

3.3.8. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi ve zimogram analizi

Zimogram analizinde SDS-PAGE elektroforezi (Bio-Rad; Mini Protean Tetra System)’nden yararlanılmış ve enzim aktivitesi belirlenmiştir (Laemmli, 1970).

Amilaz ve likenaz enzimlerinin zimogram analizleri % 0.5 nişasta veya % 0.2 likenan içeren SDS-PAGE’de yapılmıştır. Bunun için % 12.5’lik akrilamit ayrıştırma jeli hazırlanmıştır (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10. Ayrıştırma Jelin İçeriği (%12.5’lik) (Bollag ve ark., 1996).

Solüsyonlar	Miktar (ml)
Akrilamit/bis-akrilamit karışımı (37.5:1)	6.67
1.5 M Tris HCl (pH 8.8)	4
SDS (% 10)	0.16
Amonyum persülfat (% 10)	0.12
TEMED	0.008
dH ₂ O	5.05

Ayrıştırma jeli katılaştıktan sonra, bu jelin üzerine uygun miktarda dengeleyici jel dökülmüştür. Çizelge 3.11’de dengeleyici jelin içeriği verilmiştir.

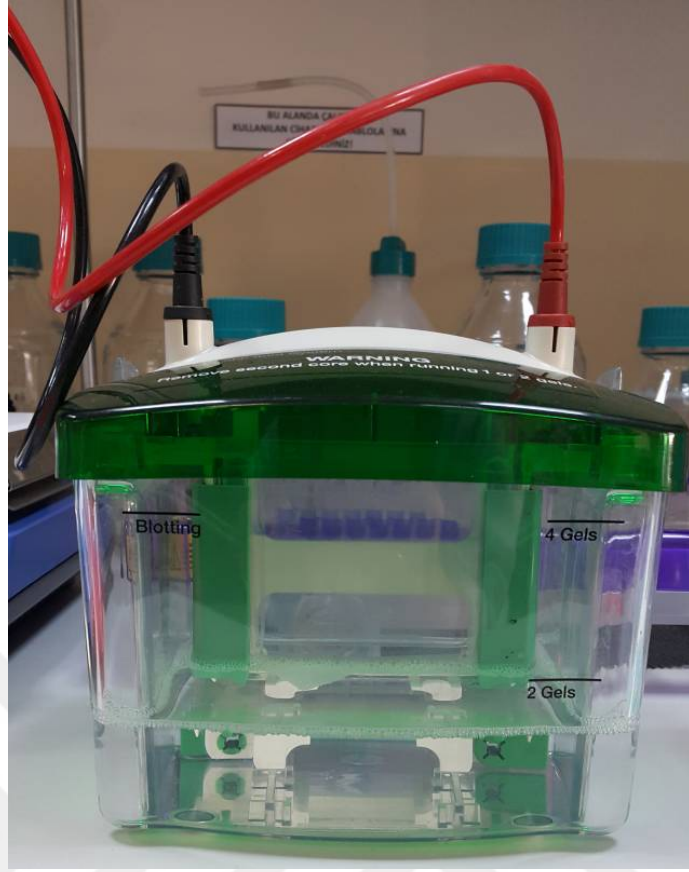
Polimerize olmuş jel, koşturma tampon (25 mM Tris HCl, 200 mM glisin, % 0.1 SDS, pH 8.3) içeren elektroforez tank içerisine yerleştirilmiştir. Enzim örneklerinden 10 µl, yükleme tamponundan (2.4 ml 1M Tris HCl pH 6.8, 3 ml % 20 SDS, 3 ml % 100 gliserol, 0.006 gr bromofenol mavisini) 10 µl olarak karıştırılmış ve gözlere doldurulmuştur. Örnekler jele yüklendikten sonra, dengeleyici jelde 70 V, ayırıştırma jelinde ise 100 V'da yürütülmüştür. Şekil 3.8'de zimogram analizinde kullanılan SDS-PAGE sistemi içerisindeki jel gösterilmiştir.

Çizelge 3.11. Dengeleyici Jelin İçeriği (% 4'lük) (Bollag ve ark., 1996).

Solüsyonlar	Miktar (ml)
Akrilamid/bis-akrilamid karışımı (37.5:1)	0.67
0.5 M Tris HCl (pH 6.8)	1.25
SDS (% 10)	0.05
Amonyum persülfat (% 10)	0.025
TEMED	0.005
dH ₂ O	3

Polimerize olmuş jel, yürütme tampon (25 mM Tris HCl, 200 mM glisin, % 0.1 SDS, pH 8.3) içeren elektroforez tank içerisine yerleştirilmiştir. Enzim örneklerinden 10 µl, yükleme tamponundan (2.4 ml 1M Tris HCl pH 6.8, 3 ml % 20 SDS, 3 ml % 100 gliserol, 0.006 gr bromofenol mavisini) 10 µl olarak karıştırılmış ve gözlere doldurulmuştur. Örnekler jele yüklendikten sonra, dengeleyici jelde 70 V, ayırıştırma jelinde ise 100 V'da yürütülmüştür.

Elektroforez işleminden sonra jel üzerindeki protein marker ve örnekler birbirinden kesilmiştir. Protein marker % 0.1 Coomassie Brilliant R 250 mavisini, % 8 methanol ve % 7 glisial asetik asit içeren solusyonda oda sıcaklığında bir gece boyanmıştır. Daha sonra boyanın fazlası % 8 methanol ve % 7 glisial asetik asit içeren solusyonda bekletilerek jelden uzaklaştırılmıştır. Jele yüklenen örnekler ise % 75 tampon (pH 6.5 50 mM sodyum fosfat) / % 25 izopropanol (v/v) ile iki kez yıkanmış ve 4 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında jel bu karışım içerisinde alınıp 50 mM sodyum fosfat (pH 6.5) tampon ile yıkanıp, aynı tampon içerisinde 37 °C'de 4 saat bekletilmiştir. Enzim aktivitesinin belirlenmesi için jel amilaz için % 1'lik lugol ile 10 dk, likenaz için % 0.1'lik Kongo kırmızısı ile 30 dk boyanmış ve boyanın fazlası 1 M NaCl ile alınmıştır.



Şekil 3.8. Zimogram analizinde kullanılan SDS-PAGE sistemi.

3.3.9. Hidroliz ürünlerinin ince tabaka kromatografisi ile saptanması

Enzim substrat reaksiyonuna bağlı olarak substratların hidroliziyle açığa çıkan son ürün ya da ürünlerin saptanabilmesi için ince tabaka kromatografisi kullanılmıştır (Erich, 1975). Enzim reaksiyonları, amilaz için 15, 30 ve 60 dk, likenaz için 2, 4 ve 24 saat sürelerde optimum aktivite sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra açığa çıkan hidroliz ürünlerinin belirlenenebilmesi için örnekler, enzim, substrat ve standartlar (amilaz için; 1mg/ml konsantrasyonunda hazırlanan glikoz, maltoz, maltotrioz ve maltotetroz çözeltisi, likenaz için; glikoz ve sellobiyoz çözeltisi) silika plaka (Silica gel 60, Merck, 20x20) üzerine 5 µl olarak yüklenmiştir. Açığa çıkan ürünlerin ve standartların birbirlerinden ayrılabilmesi için mobil faz olarak, amilazda kloroform-asetik asit-distile su (6:7:1 v/v/v), likenazda etil asetat-asetik asit-distile su (2:2:1 v/v/v) kullanılmıştır. Hidroliz ürünlerinin plaka üzerinde koşmasının ardından, görünür hale gelmelerinde amilaz için anilin-difenilamin-ortofosforik asit (1:1:10 v/w/v), likenaz için ise % 20'lik H₂SO₄ çözeltileri plakanın üzerine püskürtülmüştür. Sonrasında plaka kurumaya bırakılmış ve 150 °C'lik pastör fırınında bantlar belli oluncaya kadar inkübe edilmiştir.

3.4. Metagenomik Çalışmalar

Bu aşamada öncelikle ruminant dışkısı kullanılarak optimum DNA izolasyon protokolü araştırılmıştır. Sonrasında izole edilen metagenomik DNA'lerden çeşitli enzim genleri taranmış, nükleotid ve aminoasit dizileri ortaya çıkartılarak tanımlanmıştır.

3.4.1. Dışkıdan metagenomik DNA izolasyonu

Metagenomik DNA izolasyonunun optimize edilmesi için, kullanılan dışkı örnekleri simental ırkına ait sığırdan alınmış ve derhal laboratuvara getirilmiştir. Waring Blender (New Hartford, Conn, ABD)'da homojenize edilen dışkı örnekleri sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere - 20 °C'de saklanmıştır. Bütün DNA izolasyon çalışmalarında 50 mg dışkı örneği kullanılmıştır.

Metagenomik DNA izolasyonunda lizis, ekstraksiyon ve saflaştırma aşamalarında farklı parametrelerin deneysel çalışmaları yapılmış ve optimize yöntem belirlenmiştir.

3.4.1.1. Lizis aşaması

Lizis aşaması hücre duvarı ve membranının parçalanmasını sağlamaktadır. Bu aşamada farklı lizis tamponları ve enzimler ile çalışılmıştır.

Lizis tamponu içerisinde yer alan 100 mM Tris-HCl (pH: 8.0), 100 mM sodyum EDTA (pH: 8.0), 100 mM sodyum fosfat (pH: 8.0) sabit tutulmuştur (Zhou ve ark., 1996). NaCl ve CTAB konsantrasyonlarında değişiklik yapılmıştır (Çizelge 3.12). Lizis tamponlar hazırlandıktan sonra, herhangi bir kontaminasyonu engellemek için otoklavda steril edilmiştir.

DNA konsantrasyonlarındaki artış ve PZR'lerin çalışmasına bağlı olarak lizis tampon belirlendikten sonra, optimum enzim ve bu enzimin konsantrasyonunun belirlenmesi için 0, 1.0, 2.5, 5.0 mg/μl lizozim (Calbiochem, Almanya) ve proteinaz K (Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır (Bertrant ve ark., 2005; Desai ve Madamwar, 2007; Pope ve ark., 2011, Zootental ve ark., 2012).

Çizelge 3.12. Çalışmada kullanılan lizis tamponların bileşenleri.

1. Lizis tampon	2. Lizis tampon	3. Lizis tampon	4. Lizis tampon
1.5 M NaCl	0.5 M NaCl	1.5 M NaCl	0.5 M NaCl
% 1 CTAB	% 1 CTAB	% 0 CTAB	% 0 CTAB
100 mM Tris-HCl	100 mM Tris-HCl	100 mM Tris-HCl	100 mM Tris-HCl
100 mM sodyum EDTA	100 mM sodyum EDTA	100 mM sodyum EDTA	100 mM sodyum EDTA
100 mM sodyum fosfat	100 mM sodyum fosfat	100 mM sodyum fosfat	100 mM sodyum fosfat

Çizelge 3.13. Kullanılan enzimlerin (lizozim ve proteinaz K) konsantrasyonları.

Muamele	Konsantrasyon (mg/ml)
1	0
2	1.0
3	2.5
4	5.0

3.4.1.2. Ekstraksiyon aşaması

Ekstraksiyon aşamasında farklı konsantrasyonlarda amonyum asetat (Çizelge 3.14) ve ekstraksiyon çözücülerini kullanılmıştır (Çizelge 3.15).

Çizelge 3.14. Ekstraksiyon aşamasında kullanılan amonyum asetat konsantrasyonları.

Muamele	Konsantrasyon (M)
1	0
2	2.5
3	5
4	10

Çizelge 3.15. DNA'yı diğer organik maddelerden ayıran farklı ekstraksiyon çözücülerini.

Muamele	Yöntem şekli
1	Ekstraksiyon çözeltisi kullanılmadı.
2	Kloroform:İzoamil alkol (24:1)
3	Fenol:Kloroform:İzoamil alkol (25:24:1)

3.4.1.3. Saflaştırma aşaması

Saflaştırma aşamasında ticari kit kartuşları ve silika matriks kullanılmıştır. Ticari kit olarak dokudan DNA izolasyon (Favorgen; Tayvan), bakteriden DNA izolasyon (Vivantis; Malezya), bitkiden DNA izolasyon (Vivantis; Malezya), stool genomik DNA izolasyon (I-genomic; Kore) kitlerinin kartuşları ve silika matriks kullanılmıştır. Ticari kit kartuşları ile saflaştırma aşaması üretici firmanın protokolüne göre yapılmıştır.

Silika matriks, Elphinstone ve ark. (2003)'ün yapmış olduğu çalışmaya göre hazırlanmıştır. Silika 0.25 gr tartılmış ve 5 ml'lik 5 M HNO₃'te buhar çıkana kadar ısıtılmış, 30 dk soğumaya bırakılmış ve üst faz atılmıştır. Sonrasında silika 2.5 ml saf su ile karıştırılmış ve 10 dk bekletilerek yerleşmesi sağlanmıştır. Bu aşama 3 kez tekrarlanmıştır. Silikaya pH'ı 7 olana kadar 1 M Tris-HCl (pH: 8) tampon eklenmiş ve 10 dk yerleşmesi beklenmiştir. Üst faz atılmış ve silika tekrar eşit hacimde distile su ile çözülmüştür.

Silikayı bağlayıcı tampon, 0.2 M sodyum sülfat (Na₂SO₃) ve 6 M sodyum iyodür (NaI) karışımından oluşmaktadır. Bu tampon hazırlandıktan sonra 0.45 µm membran filtreden geçirilmiştir (Elphinstone ve ark., 2003). Yıkama solüsyonu; % 50 etanol, 10 mM Tris-HCl (pH: 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA ile hazırlanmış ve oda ısısında saklanmıştır (Li ve ark., 2010).

Temiz bir tüp içerisinde saflaştırılmamış 250 µl DNA örneği, 750 µl bağlama tamponu ve 100 µl silika matriks eklenmiştir. Oda ısısında 5 dk bekletilmiş ve 16000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml yıkama solüsyonu eklenerek hızlı bir şekilde vorteks yapılmış ve 16000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırılmıştır. Bu aşama 2 kez tekrar edilmiştir. Pellet üzerine 30 µl TE tamponu eklenmiş, vorteks yapılmış ve 70 °C'de 10 dk bekletilmiştir. Üst fazın 26 µl'si temiz bir tüpe alınmış ve DNA silika matriks ile saflaştırılmıştır. Çizelge 3.16'da saflaştırma yöntemleri verilmiştir.

Çizelge 3.16. Saflaştırma yöntemleri.

Muamele No	Muamele yöntemi
1	Favorgen tissue FATG 2 kartuşu
2	Vivantis bacteria kartuşu
3	Vivantis plant kartuşu
4	I-genomic stool kartuşu
5	Silika matriks

3.4.2. Ticari kit ile DNA izolasyonu

Metagenomik DNA izolasyonu QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, ABD) kullanılarak, üretici firmanın protokolüne uygun olarak yapılmıştır.

3.4.3. Metagenomik DNA konsantrasyonu ve saflıklarının belirlenmesi

Metagenomik DNA konsantrasyonu ve saflığını NanoDrop 2000 spektrofotometre ile $A_{260/280}$ (Thermo Scientific, ABD) dalga boylarında ölçülerek bulunmuştur.

3.4.4. Enzim genlerinin taranması

İzole edilen metagenomik DNA'lardan enzim genlerinin taranması için NCBI Blast'ta yer alan amilaz ve ksilanaz genleri araştırılmıştır. Dejenere primerlerin tasarlanması, PZR ve jel elektroforez 3.3.2, 3.3.3 ve 3.3.4'teki gibi uygulanmıştır. Çizelge 3.17'de çalışmada kullanılan dejenere primerler verilmiştir.

Çizelge 3.17. Çalışmada kullanılan dejenere primerler.

Primer Adı	Primer Dizilimi (5' - 3')	Baz Uzunluğu (bp)
AmyWalkF	CCGTAGCGATTAAAATAACG	20
AmyWalkR	AGCTTGACAGTGTCATGAAT	20
Amy1	RTGAKGAAAGAAGCCATYCACCAC	24
Amy2	TYACCAKCTTTCGACCGCGTRAA	23
Amy3	YTNGAYGSIGTITTYAAYCA	18
Amy4	GTRTCRTGISWICCIARIARRTT	19
AmpPF	GAYGCIGGITAYAC	12
AmpPR	TCRTGISWYTCIACCCAIGT	17
CD2	GACGGYTGGCGBYTNGATGT	20
CD4	TCATGACTGCCSAGCARRTT	20
CDA	TGGTATCAAATYTTYCCNGA	20
CDX	TCCCAMACCATRCAYTT	17
P7	TTAAAAACCACAACCACACCAGT	23
P8	TAGAGAGTAATATTT	15
P9	TACTAATTAGTATTTTA	17
P10	AAGCTTGGGAAAATTGAGTAT	21
P15	AGAAAAATGAAATTTAGCTCAGC	23
P16	AATTTAAAGGCATTGTGAATACC	23

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Rumen Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması

4.1.1. Rumen içeriği, rumen sıvısı, dışkı örnekleri ve bakteri izolasyonu

Anaerobik elementlerin önemi 1990'ların öncesine dayanmasına rağmen, anaerobik bakteriler 1940'lara kadar tanımlanamamıştır. İkinci Dünya Savaşı'ndan önce O₂ varlığında büyüeyebilen aerobik mikroorganizmalar kültüre alınabilmiştir. Dolayısıyla klinik, toprak ve mandıra gibi birçok yerde bulunan bu mikroorganizmalar ile sıklıkla çalışılmıştır. Rumen mikroorganizmalarının birçoğunun zorunlu anaerob olması ise izolasyonlarını zorlaştırmıştır (Krause ve ark., 2013). Sonraki yıllarda, Hungate sığır rumeninden selülozu sindiren bakterileri, anerobik teknikler ve indirgeyici ajanların kombinasyonu ile izole etmiştir (Hungate, 1944; Chung ve Bryan, 1997). Hungate, aerobik ortamda petri kutuları kullanılarak anaerobik bakterilerin büyümeleri gerçekleştirilemediği için, günümüzde de kullanılan roll tüp metodunu geliştirmiştir (Krause ve ark., 2013). Bu çalışmada, anaerobik rumen bakterilerinin izolasyonu roll tüp metodu yerine, anaerobik kabin kullanılarak yapılmıştır. Anaerobik kabin içerisinde, aerobik ortamda büyüyen bakterilerde kullanılan tekniklere benzer şekilde, rumen bakterilerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Rumen içeriği ve sıvısı mezbahanedeki yeni kesilen ruminantların rumeninden falkon tüplere alınmış, ruminantların özellikleri kaydedilmiş ve hızlı bir şekilde laboratuvara getirilmiştir. Rumen içeriği ve sıvısı laboratuvara gelir gelmez, bakteri izolasyonlarına başlanmış ve arta kalan örnekler – 20 °C'de saklanmıştır. Bu kapsamda 50 adet rumen içeriği ve sıvısı ile çalışılmıştır. Aynı zamanda ruminant dışkı örnekleri kullanılarak rumen bakteri izolasyonu yapılmıştır. Ruminant dışkı örneklerinin kolay toplanması, taşınması ve saklanması, dışkıdan rumen bakteri izolasyonunun avantajları arasında yer almaktadır. Bu çerçevede, Kahramanmaraş İli'nin farklı alanlarında, tükettikleri besinlerin farklı olmasına özen gösterilerek 15 ruminant seçilmiş, bunların dışkı örnekleri plastik örnek kaplarına alınmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere – 20 °C'de depolanmıştır. Alınan dışkıların hangi hayvana ait olduğu ve hayvanların besleme şekilleri kayıt altına alınmıştır (Çizelge 3.3.).

Rumen bakterilerinin izolasyonunda kullanılan ve anaerobik şartlarda hazırlanan besiyerleri farklı karbon kaynakları içermektedir. Bu karbon kaynakları selüloz, sellobiyoz, ksilan, nişasta, glikoz, kazein ve taninden oluşmaktadır. Anaerobik kabin içerisinde

kazeinli ortamda büyüyen rumen bakteri (Şekil 4.1) kolonilerinin etrafında zon oluşturması, kazeini parçaladığını göstermektedir. Ayrıca yemine kazein eklenen ruminantların rumeni içerisinde daha fazla amonyak ürettiği belirtilmiştir (Bento ve ark., 2015).



Şekil 4.1. Anaerobik kabin içerisinde karbon kaynağı olarak kazein içeren anaerobik besiyerinde büyüyen bakteriler.

Rumen bakterilerinin izole edilmesi için anaerobik şartların sağlanması ve hayatlarını devam ettirebilmesi zaman almakta ve zahmetli bir çalışma gerektirmektedir. Laboratuvarımızda izole edilen rumen bakterileri, bir gecelik inkübasyon sonrasında yüksek gelişim göstermiş ve karyovial tüpler kullanılarak % 20'lik gliserol ile - 20 °C'de saklanmıştır. Bu bakteriler tekrar canlandırılmak istendiğinde, anaerobik şartlarda izole edildikleri karbon kaynağını içeren besiyerine transfer edilmiştir. Teather (1982), zorunlu anaerob rumen bakterilerinin sürdürülebilirliği için dört farklı şekilde depolama yöntemini kıyaslamıştır. Bu yöntemler içerisinde % 20'lik gliserol ile - 20 °C'de karyovial tüplerde depolanan rumen bakterilerinin bir yıldan daha fazla sürede uygun ve güvenli bir şekilde canlı kalabildikleri görülmüştür. Besiyeri olarak modifiye RGCA (rumen fluid glucose cellobiose agar)'yı kullandığını belirtmiştir. Laboratuvarımızdan izole edilen rumen bakterileri ise izole edildikleri besiyerinde depolanmıştır. Bununla beraber rumen

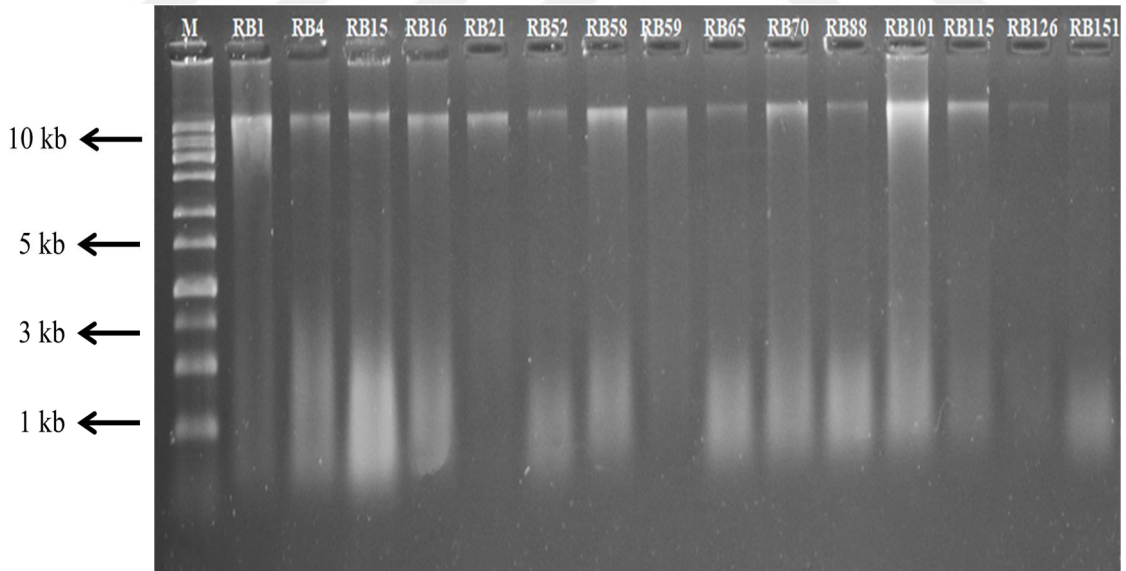
bakterileri birçok çalışmada - 80 °C’de saklamıştır. Luo ve ark. (2017) ticari olarak temin ettikleri *Propionibacterium* türlerini - 80 °C’de saklamış ve bunları aktifleştirmek için sodyum laktat besi ortamını tercih etmiştir. Çalışmalarında laktik asit karbon kaynağı olarak kullanılmış, propiyonat ve asetat miktarı artırılarak ruminal asidozis kontrol altına alınmıştır.

4.1.2. Rumen bakterilerinin moleküler olarak tanımlanması

4.1.2.1. Rumen bakterilerinden DNA izolasyonu

Rumen bakterilerinin moleküler olarak tanımlanması ve enzim genleri ile ilgili yapılan bu çalışmada ilk olarak DNA izole edilmiştir. DNA izolasyonu için CTAB protokolü kullanılmıştır (Nishiguchi ve ark., 2002).

Rumen bakterilerinden DNA izolasyonu için saf kültürün yer aldığı tüpte büyüyen hücre kullanılmıştır. Öncelikle rumen bakterisinin büyüdüğü karbon kaynağının kullanıldığı besiyerinde geliştirilen saf kültürden stok alınmış, sonrasında ise aynı tüpten toplanan hücre ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Şekil 4.2’de izole edilen DNA’ların agaroz jeldeki görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.2. Rumen bakterilerinden izole edilen DNA’ların agaroz jel üzerindeki görüntüsü.

M: 1 kb DNA standardı (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 kb).

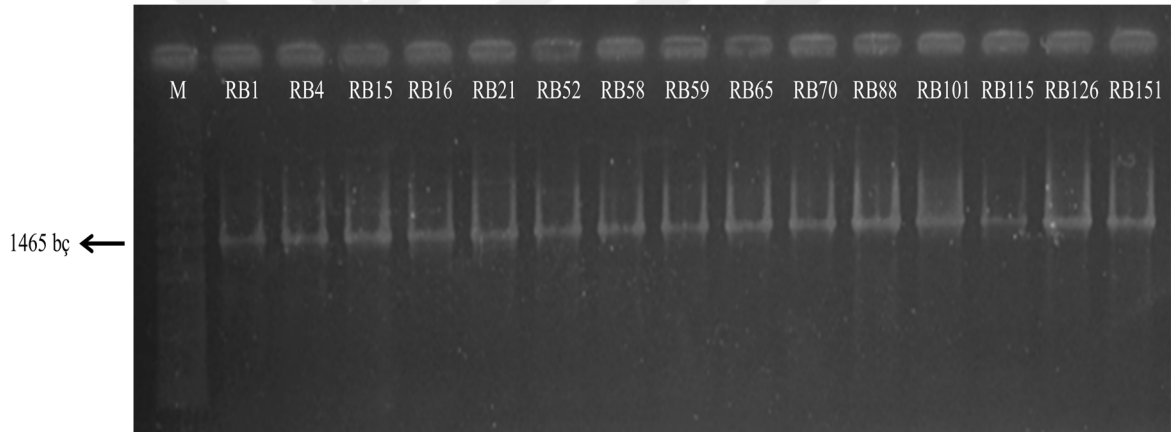
4.1.2.2. Rumen bakterilerinin 16S rRNA gen bölgesi primerleri ile tanımlanması

İzole edilen DNA'lar 16S rRNA gen bölgesi primerleri (27F ve 1492R) kullanılarak PZR optimizasyon çalışmaları yapılmış (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. 27F-1492R primerleri ile gerçekleştirilen PZR optimizasyon çalışma şartları.

	Ön Denatürasyon	Denatürasyon	Yapışma	Uzama	Son Uzama
Sıcaklık (°C)	94	94	50	72	72
Zaman (dk)	4	0.5	0.5	1	5
Döngü	1		30		1

27F-1492R primer çiftleri ile yapılan PZR sonucuna göre ~ 1450 bp'lık ürünler elde edilmiştir (Şekil 4.3). Bu ürünlerin istenen büyüklükte olduğu görülmüştür.



Şekil 4.3. 27F-1492R primerleri ile yapılan PZR. M: 100 bp plus DNA standardı (Vivantis) 100- 3000 bp (aşağıdan yukarıya doğru sırasıyla 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000) büyüklüğünde bantlardan oluşmaktadır.

M: 1 kb DNA standardı (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 kb).

Rumen mikroorganizmalarının tanımlanmasında ruminant türlerinin, ruminantların tükettikleri besinlerin, beslenmelerindeki zaman aralığının ve yaşadıkları bölgenin farklı olmasının büyük öneme sahip olduğu bilinmektedir (Egan, 2005). Bu sebeple farklı yerlerde yaşayan ve farklı besinlerle beslenen ruminantların rumen içeriği, rumen sıvısı ve dışkı örneği kaynak olarak kullanılarak, rumen bakterileri izole edilmiştir. İzole edilen bu bakterilerin tanımlanması için DNA'lar 16S rRNA gen bölgesi primerleri kullanılarak

çoğaltılmış ve dizi analizleri yapılmıştır. Dizi analizi sonucunda elde edilen ürünlerin kromatogramları ChromasPro 2.0.1 programı ile çıkartılmış ve BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) programı yardımıyla izolatlar belirlenmiştir. Çizelge 4.2’de farklı örnek ve karbon kaynakları kullanılarak anaerobik kabin içerisinde izole edilen bakterilerin 16S Blast sonucuna göre tanımlanması verilmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı örnek ve karbon kaynakları kullanılarak izole edilen bakterilerin 16S Blast sonucuna göre tanımlanması

Sıra No	İzolat Adları	16S Blast Sonucu	Örnek Kaynağı	Karbon Kaynağı
1	RB1	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	Dışkı	Glikoz
2	RB4	<i>Streptococcus bovis</i>	Rumen içeriği	Nişasta
3	RB15	<i>Escherichia coli</i>	Dışkı	CMC
4	RB16	<i>Bacillus licheniformis</i>	Dışkı	CMC
5	RB21	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	Rumen sıvısı	Sellobiyoz
6	RB52	<i>Enterobacter cloacae</i>	Rumen sıvısı	Kazein
7	RB58	<i>Streptococcus equinus</i>	Rumen sıvısı	Tanin
8	RB59	<i>Streptococcus macedonicus</i>	Rumen sıvısı	Tanin
9	RB65	<i>Anaerococcus</i> sp.	Rumen sıvısı	Ksılan
10	RB70	<i>Fusobacterium</i> sp.	Rumen sıvısı	Kazein
11	RB88	<i>Cupriavidus</i> sp.	Rumen sıvısı	Tanin
12	RB101	<i>Streptococcus</i> sp.	Rumen sıvısı	Tanin
13	RB115	<i>Fusobacterium</i> sp.	Rumen sıvısı	Kazein
14	RB126	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Rumen sıvısı	Ksılan
15	RB151	<i>Bacillus licheniformis</i>	Rumen sıvısı	CMC

Rumen bakterilerinin tanımlanması ve karakterizasyonunda rumen içeriği kullanılarak izolasyon çalışmaları yer almaktadır. Ghali ve ark. (2004), rumen içeriğini anaerobik dilüsyon solüsyonu (ADS) ile seyreltilip modifiye MRS (DeMan Rogosa Sharp) agar besiyerini kullanarak rumen bakterilerini izole etmiş ve 16S rDNA metodu ile tanımlama yapmıştır (Ghali ve ark., 2004). Bunun haricinde rumen sıvısından direk DNA izole edilerek rumen bakterilerinin moleküler olarak tanımlandığı çalışmalar mevcuttur. İzole edilen DNA’lar 16S rRNA gen bölgesi primerleri ile çoğaltılmış ve klonlama sonrasında sekans ile tanımlama yapılmıştır (Leng ve ark., 2012).

4.2. Streptococcus bovis Amilaz Geninin Klonlanması ve Karakterizasyonu

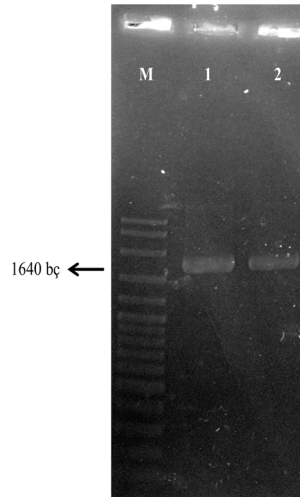
4.2.1. Streptococcus bovis amilaz geninin taranması

Streptococcus bovis'e ait amilaz geninin izole edilebilmesi için bu bakteriye özgü amilaz gen sekansları araştırılmıştır. Bu sekanslardan primerler tasarlanmıştır (Çizelge 3.7). Amilaz geni, izole edilen *S. bovis* RB4 suşunun genomik DNA'sı kullanılarak tasarlanan AmySbF-AmySbR primerleri ile çoğaltılmış (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *S. bovis* RB4 suşunun DNA'sından AmySbF-AmySbR primerleri ile yapılan PZR optimizasyon çalışma şartları.

	Ön Denatürasyon	Denatürasyon	Yapışma	Uzama	Son Uzama
Sıcaklık (°C)	95	94	53	72	72
Zaman (dk)	5	0.5	0.5	2	5
Döngü	1		35		1

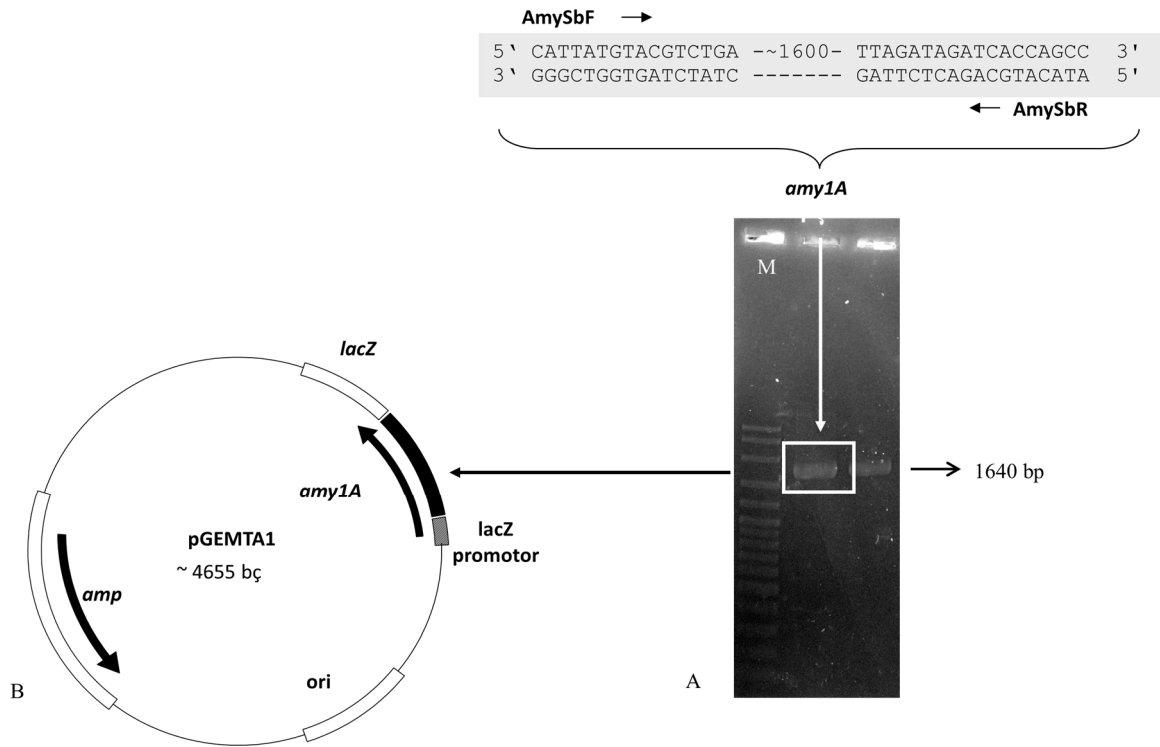
AmySb primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonunda *S. bovis* RB4 izolatından 1640 bp'lık ürün elde edilmiştir (Şekil 4.4). Bu büyüklük istenilen bölgeye uyumluluk gösterdiğinden, amilaz geni olduğu varsayılarak klonlama çalışmalarına başlanmıştır.



Şekil 4.4. *S. bovis* RB4 izolatında AmySb primerleri ile yapılan PZR. 1: 1. Koloni, 2: 2. Koloni, M: 100 bp plus DNA standardı (Vivantis) 100- 3000 bp büyüklüğünde bantlardan oluşmaktadır.

4.2.2. Amilaz geninin klonlanması

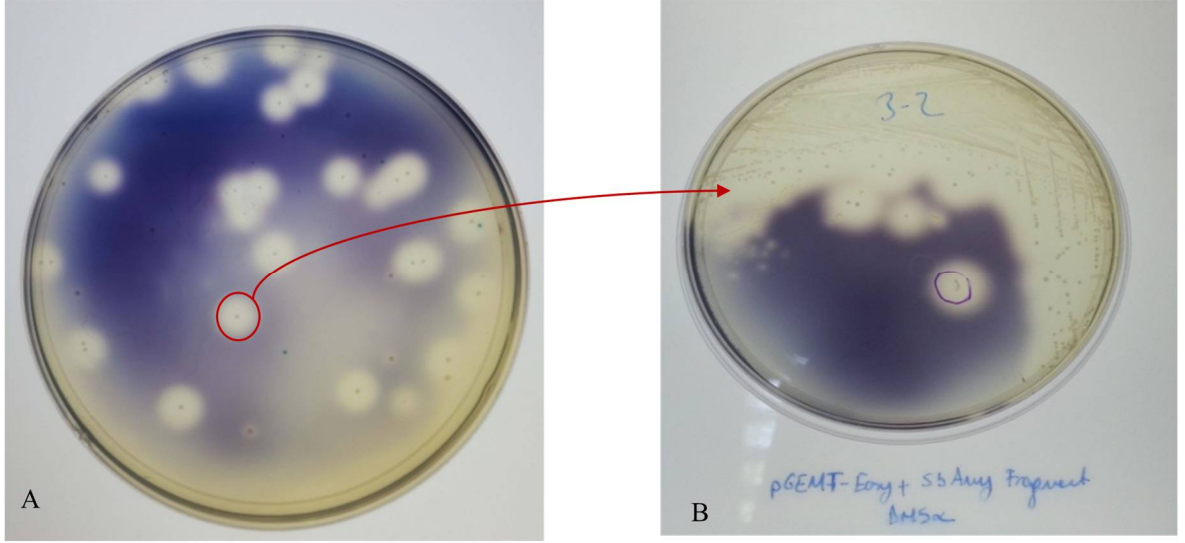
Amilaz geninin yer aldığı düşünölen PZR ürününün elde edilmesinde regular DNA polimeraz enzimi kullanılmıştır. Bu PZR ürünü kesme işlemine maruz kalmadan pGEM-T Easy plazmidi “Ligasyon System” (Promega, ABD) ile ligasyona bırakılmıştır. pGEM-T Easy 3015 bç büyüklüğünde ampisilin dirençlilik geni, lacZ geni ve replikasyon orjinine sahip ticari bir vektördür. Sonuçta AmySbF-AmySbR primer çifti ile amplifiye edilen PZR ürünü pGEM-T Easy plazmidine klonlanmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. PZR amplifikasyonu ile elde edilen *amy1A* geni (A) ve pGEM-T vektörüne *amy1A*'nın klonlanarak pGEMTA1 plazmidinin oluşturulması (B). M: 100 bç plus moleküler standardı 100- 3000 bç büyüklüğünde bantlardan oluşmaktadır.

PZR ürünü pGEM-T plazmidine klonlandıktan sonra CaCl₂ metodu ile *E. coli* DH5α'ya transforme edilmiştir. Hücreler 150 µg/ml ampisilin içeren LB'de geliştirilmiş ve büyüyen kolonilerdeki amilaz genini belirlemek için % 0.5 Nişasta (w/v, Merck) ve % 0.4 Agaroza (w/v, Sigma)'un yer aldığı ortam kolonilerin üzerine yayılmıştır. Amilaz enziminin aktivitesi 37 °C'de 4 saat inkübasyon sonrası Lugol ile boyanarak bulunmuştur. Transformantlar içerisinde amilaz aktivitesi gösteren koloniler belirlenmiş ve bu kolonilerden aktivitesi yüksek olanlar saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış bakteri suşuna

E. coli A1 ismi verilmiş ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere – 20 °C’de saklanmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. pGEMTA1 plazmidinin CaCl₂ metodu ile *E.coli* DH5α’a aktarılmasıyla elde edilen transformant koloni (A). Saflaştırılmış bakteri *E. coli* A1 (B) olarak isimlendirilerek saklanmıştır.

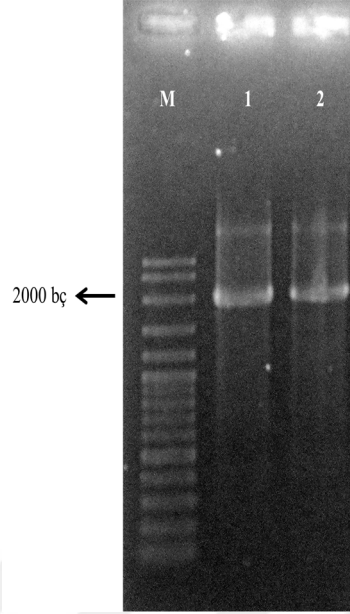
E. coli A1’e aktarılmış olan pGEMTA1 plazmidinin varlığının belirlenmesi için plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu plazmit içerisinde yer alan *amy1A* geninin kontrolü M13F-M13R primer çifti kullanılarak yapılan PZR sonucunda bulunmuştur. PZR’nin çalışma şartları Çizelge 4.4’te verilmiştir.

Çizelge 4.4. *E. coli* A1’den M13F-M13R primerleri ile gerçekleştirilen PZR optimizasyon çalışma şartları.

	Ön Denatürasyon	Denatürasyon	Yapışma	Uzama	Son Uzama
Sıcaklık (°C)	95	94	63	72	72
Zaman (dk)	2	0.5	0.5	1	5
Döngü	1		40		1

amy1A geninin büyüklüğü 1640 bp olmasına rağmen, kuyruklu primer olarak adlandırılan M13F-M13R primerleri ile PZR yapılmış ve yaklaşık 2000 bp büyüklüğünde bant elde edilmiştir. M13, plazmidin çoklu bağlanma bölgesinde yer almakta ve klonlanan geni de içerisine almaktadır. Dolayısıyla pGEMTA1 plazmidinin içerisine *amy1A* geninin

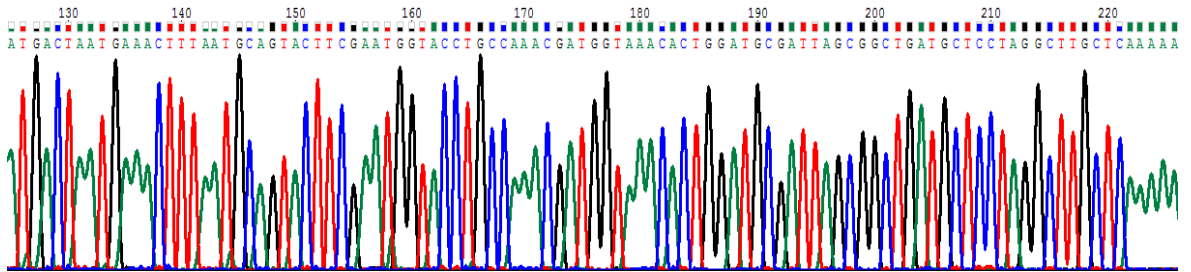
klonlandığı doğrulanmıştır. Şekil 4.7’te *E. coli* A1’den izole edilen pGEMTA1 plazmidinin M13 primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucu gösterilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *E. coli* A1’den izole edilen pGEMTA1 plazmidinin M13 primerleri ile gerçekleştirilen PZR görüntüsü. M: 100 bp plus DNA standardı 100-3000 bp büyüklüğünde bantlardan oluşmaktadır. , 1: 1. Koloni, 2: 2. Koloni.

4.2.3. *amy1A*’nın nükleotid ve amino asit dizisi

amy1A genini içeren pGEMTA1 plazmidi *E. coli* DH5 α ’dan izole edilmiştir. Bu genin nükleotid dizisinin ortaya çıkartılmasında ileri ve geri primerlerin her ikisi de kullanılmıştır. Şekil 4.8’de ChromasPro 2.0.1 programı ile belirlenen kromatogramların bir kısmı gösterilmiştir.



Şekil 4.8. *amy1A*’nın ileri primer ile elde edilen sekansına ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı.

amy1A geninin 1640 bp dizisi ortaya çıkartılmıştır. Ortaya çıkan sekanstan yola çıkılarak amino asit dizisi belirlenmiştir. Bu gen içerisinde iki açık okuma çerçevesi (ORF)

bulunmaktadır. ORF1'in nükleotid dizisi ve bu dizi kullanılarak 149 amino asit içeren dizisi Şekil 4.9'da gösterilmiştir. ORF2'nin nükleotid dizisi ve 242 amino asit içeren dizisi Şekil 4.10'da verilmiştir. Literatürde genomik DNA ve plazmidin restriksiyon enzimleri ile kesilip klonlandığı çalışmalar sıklıkla yer almaktadır. Whitehead ve Cotta (1995), *S. bovis*'den pUC18'e klonladıkları amilaz geninin ORF'sinin 1721 bç uzunluğunda olduğunu ve 485 amino asit kodladığını bildirmiştir. Çalışmamızda, kesim enzimlerine ihtiyaç duyulmadan *S. bovis* RB4 *amy1A* genini içeren PZR ürünü pGEM-T Easy plazmidine klonlanmıştır.

```

1   cattatgtacgtctgagaatctcgggcttggtttttatTTTTTgct

50  acgcaaacgtctgcataatttcggtttttttg-----

117 atg act aat gaa act tta atg cag tac ttc gaa tgg tac ctg cca
    M  T  N  E  T  L  M  Q  Y  F  E  W  Y  L  P
162 aac gat ggt aaa cac tgg atg cga tta gcg gct gat gct cct agg
    N  D  G  K  H  W  M  R  L  A  A  D  A  P  R
207 ctt gct caa aaa ggt atc aca aaa att tgg atg cct cca gct ttt
    L  A  Q  K  G  I  T  K  I  W  M  P  P  A  F
252 aag gct acg cat gat agc gac gtt ggt tat ggc gtt tat gac ctt
    K  A  T  H  D  S  D  V  G  Y  G  V  Y  D  L
297 ttt gac ctc ggt gaa ttt gac caa aaa ggg act atc cga aca aaa
    F  D  L  G  E  F  D  Q  K  G  T  I  R  T  K
342 tac gga acc aaa gct gac tat cta caa gca att tcc gct tta aaa
    Y  G  T  K  A  D  Y  L  Q  A  I  S  A  L  K
387 gca aat cat att gcg cct tta gct gat gtt gtc tta aat cac aaa
    A  N  H  I  A  P  L  A  D  V  V  L  N  H  K
432 gct gct gct gac cat act gaa act ttt tcc gtt gtc gaa gtt gcc
    A  A  A  D  H  T  E  T  F  S  V  V  E  V  A
477 ccc gat gac cgt aca aaa atc atc agt aaa cct ttt gac att gaa
    P  D  D  R  T  K  I  I  S  K  P  F  D  I  E
522 ggc tgg aca aac ttc act ttt gat ggt cga cat aag ctt aca tga
    G  W  T  N  F  T  F  D  G  R  H  K  L  T
567 -----catcgattcattcttt

```

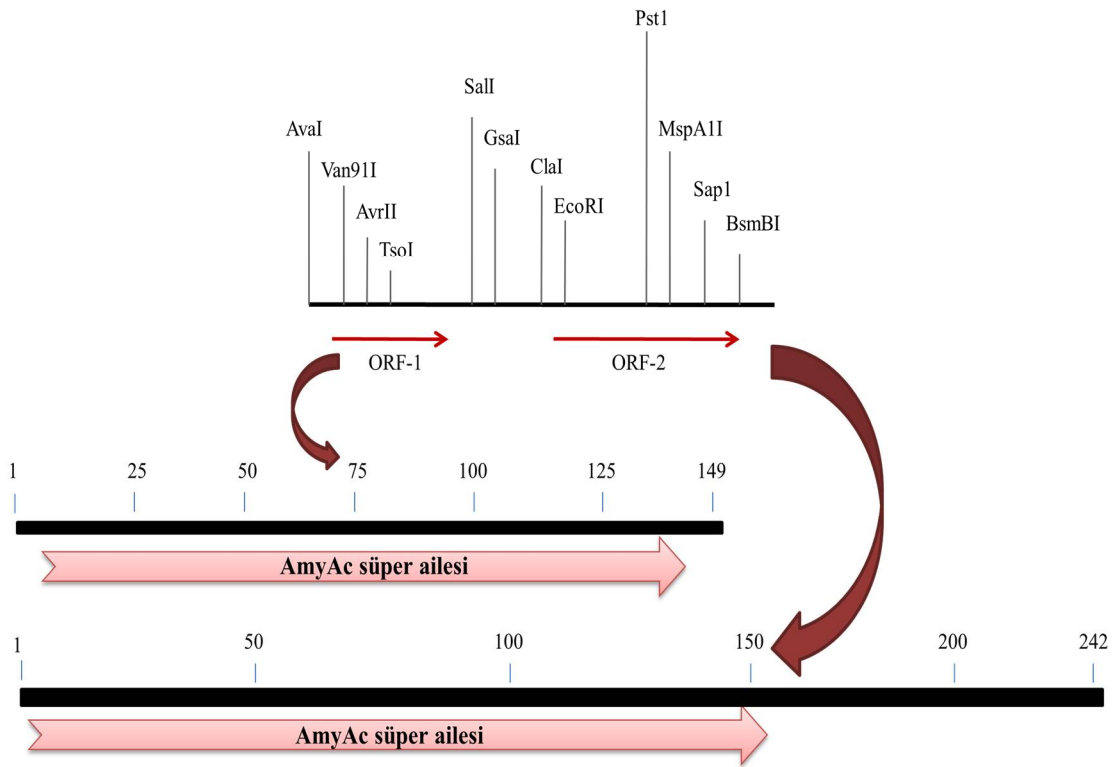
Şekil 4.9. *S. bovis* RB4'ten klonlanan *amy1A* geni ORF1'in nükleotid ve amino asit dizisi.

837 atg agc aat ttc atc cgc gat atg aag gaa aaa tac ggt aaa gac
M S N F I R D M K E K Y G K D
882 ttt tat gtt ttt ggc gaa ttc tgg aac ggt gat gaa aaa act aac
F Y V F G E F W N G D E K T N
927 aac gat tat ctt gaa acg act ggg cac cgc ttt gac cta atc gac
N D Y L E T T G H R F D L I D
972 gtt cga ctc cac caa aat ctt tat gaa gca agc aaa gaa aaa gct
V R L H Q N L Y E A S K E K A
1017 tat tac gac ttg cga caa att ttt aat cat act ttg gtg aaa aat
Y Y D L R Q I F N H T L V K N
1062 cac cct aac tct gct gtt act ttc gtt gat aat cat gat acc caa
H P N S A V T F V D N H D T Q
1107 cga ggg caa gca ctt gaa tct aca att gaa gaa tgg ttt aag cct
R G Q A L E S T I E E W F K P
1152 gca gct tac gct ctc atc tta ctt cgc caa act ggt ctt cca tgc
A A Y A L I L L R Q T G L P C
1197 atc ttc tac ggt gac tac tac ggc att tca ggt gaa ttt gcg caa
I F Y G D Y Y G I S G E F A Q
1242 caa gac ttt caa gat gat att gat aaa tta ctt ttc tta aga caa
Q D F Q D D I D K L L F L R Q
1287 gca gct gtt tat ggc aaa gaa atg aac tat ttt gac aat cca aat
A A V Y G K E M N Y F D N P N
1332 tgt gtt ggt tgg act tat ctt gga aat gaa gag cac cct act tct
C V G W T Y L G N E E H P T S
1377 ctt gct gtt tta atc aac aac gct cat tct aca gca aaa cga atg
L A V L I N N A H S T A K R M
1422 ttt gta ggc aaa aaa tgg gca gga aaa acg ttt aca gat tat ctc
F V G K K W A G K T F T D Y L
1467 gga aat caa act gct act atc act atc gac gaa gaa ggt tac ggc
G N Q T A T I T I D E E G Y G
1512 agt ttt cca gtt ggc gca gaa tcc gtc tct gct tat att cca caa
S F P V G A E S V S A Y I P Q
1557 -----gatagatcaccagccc

Şekil 4.10. *S. bovis* RB4'ten klonlanan *amy1A* geni ORF2'nin nükleotid ve amino asit dizisi.

Amy1A ORF1'in amino asit dizisi BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) programı kullanılarak gen bankasına kaydedilen amilaz genleri ile karşılaştırılmıştır. Amy1A ORF1'in amino asit dizisi bakımından, *S. equinus* α -amilaz (SDL24386.1) ile % 98, *Streptococcus* sp. sitoplazmik α -amilazla (EQC69700.1) ile % 95 oranında benzer olduğu belirlenmiştir. Amy1A ORF2'nin amino asit dizisi *S. equinus* α -amilaz (WP_027968747.1) ve *Streptococcus* sp. sitoplazmik α -amilaz (EQC69699.1) ile sırasıyla % 99 ve % 96 oranında homoloji göstermiştir.

Amy1A'nın iki ORF içeren amino asit dizisi α -amilaz katalitik domain (Alpha Amylase Catalytic domain - AmyAc) ailesinde yer almaktadır (Şekil 4.11). α -amilaz enzimlerinin birçoğu glikozil hidrolazların en geniş ailesinden biri olan GH13 altında yer almaktadır. GH13 enzimleri katalitik bölgenin oluşumunda yer alan yedi yüksek korunmuş domain içermektedir (Sarian ve ark., 2017).



Şekil 4.11. Amy1A ORF1'in ve ORF2'nin kesim enzimlerinin bir kısmı ve AmyAc süper aileleri.

Amy1A ORF1 (Şekil 4.12) ve ORF2 (Şekil 4.13)'nin yüksek homoloji gösteren korunmuş domainlerle amino asit farklılıkları verilmiştir.

```

EQC69700.1      MTNETLMQYFEWYLPNDGKHWMLAADAPTLAQKGITKIWMPPAFKATHDGDVGYGVYDL
amy1A_ORF1      MTNETLMQYFEWYLPNDGKHWMLAADAP LAQKGITKIWMPPAFKATHD DVGYGVYDL
SDL24386.1      MTNETLMQYFEWYLPNDGKHWMLAADAP LAQKGITKIWMPPAFKATHD DVGYGVYDL
                  *****.*****.*****

EQC69700.1      FDLGEFDQKGTIRTGYGKADYLQAISALKANHIAPLADVVLNHKAAADHTEDFSVEVD
amy1A_ORF1      FDLGEFDQKGTIRTGYGKADYLQAISALKANHIAPLADVVLNHKAAADHTE FSVVEV
SDL24386.1      FDLGEFDQKGTIRTGYGKADYLQAISALKANHIAPLADVVLNHKAAADHTE FSVVEV
                  *****.*****.

EQC69700.1      PNDRTKVISKPFNIEGWTNFTFDGRHKTYNDFEWHWYHFTGTDYDVRTGKNGIFQIQGDN
amy1A_ORF1      P DRTK ISKPF IEGWTNFTFDGRHK -----
SDL24386.1      P DRTK ISKPF IEGWTNFTFDGRHKAYNDFEWHWYHFTGTDYDVKTGKNGIFQIQGDN
                  *.****.*****.*****:;

EQC69700.1      KGWANQDLVDGENGYDYLMYADLDFKHPEVIKNIYDWAEFVETTGVCGRFLDAIKHID
amy1A_ORF1      -----
SDL24386.1      KGWANQDLVDDENGYDYLMYADLDFKHPEVIKNIYDWAEFVKTGVCGRFLDAIKHID

EQC69700.1      SFFMSNFIRDMKEKYGKDFYVFGEFWNGDEKLTTIILKRLGTALT-----
amy1A_ORF1      -----
SDL24386.1      SFFMSNFIRDMKEKYGKDFYVFGEFWNGDEKTNNDYLETTGHRFDLIDVRLHQNLFEASK

```

Şekil 4.12. Amy1A ORF1’in diğer amilaz amino asit sekanslarıyla homolojisi.
 SDL24386.1: *S. equinus* α -amilaz, EQC69700.1: *Streptococcus* sp. sitoplazmik α -amilaz.

```

EQC69699.1      -----
amy1A_ORF2      --MSNFIRDMKEKYGKDFYVFGEFWNGDEKTNNDYLETTGHRFDLIDVRLHQNLFEASK
WP_027968747.1 SFFMSNFIRDMKEKYGKDFYVFGEFWNGDEKTNNDYLATTGHRFDLIDVRLHQNLFEASK

EQC69699.1      -----MVKNQPSAVTFVDNHDQRGQALESTIEEWFKPAAYALILLRQTG
amy1A_ORF2      EKAYYDLRQIFNHT VKNHPNSAVTFVDNHDQRGQALESTIEEWFKPAAYALILLRQTG
WP_027968747.1 EKAYYDLRQIFNHT VKNQPSAVTFVDNHDQRGQALESTIEEWFKPAAYALILLRQTG
                  .*** *****

EQC69699.1      LPCIFYGDYGISGEFAQQDFQDDIDKLLFLRQAAYVGKEMNYFDNPNCIGWSYLGDEEH
amy1A_ORF2      LPCIFYGDYGISGEFAQQDFQDDIDKLLFLRQAAYVGKEMNYFDNPNC GWTYLG EEH
WP_027968747.1 LPCIFYGDYGISGEFAQQDFQDDIDKLLFLRQAAYVGKEMNYFDNPNC GWTYLG EEH
                  *****.***.***

```

```

EQC69699.1      PTSLAVLINNTHSTAKRMFVGKKWAGKTFTDYLGNQTATITIDEEGYGSFPVGAESVSAY
amy1A_ORF2      PTSLAVLINN HSTAKRMFVGKKWAGKTFTDYLGNQTATITIDEEGYGSFPVGAESVSAY
WP_027968747.1 PTSLAVLINN HSTAKRMFVGKKWAGKTFTDYLGNQTATITIDEEGYGSFPVGAESVSAY
*****.*****

```

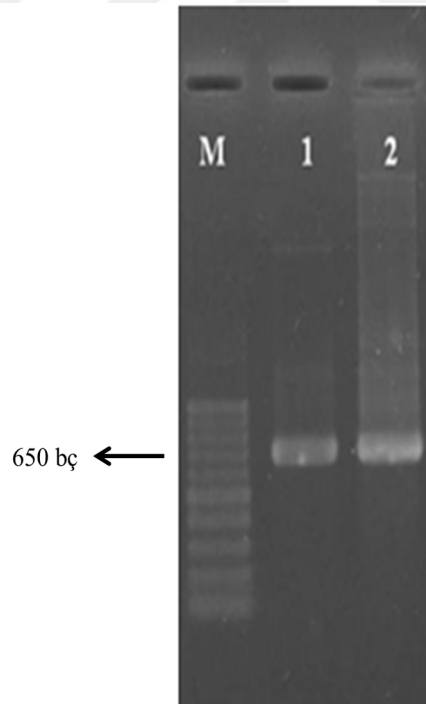
```

EQC69699.1      IPQDQ
amy1A_ORF2      IPQDQ
WP_027968747.1 IPQDQ
*****

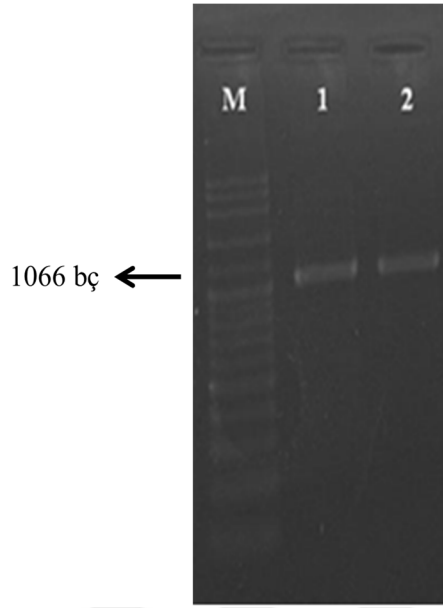
```

Şekil 4.13. Amy1A ORF2'nin diğer amilaz amino asit sekanslarıyla homolojisi. WP_027968747.1: *S. equinus* α-amilaz, EQC69699.1: *Streptococcus* sp. sitoplazmik α-amilaz.

amy1A geninin içerisinde iki ORF'nin varlığının kanıtlanması için, bu genin farklı bölgelerinden AmySbF2 ve AmySbR2 adı verilen ileri ve geri primerler tasarlanmıştır. AmySbF2 – AmySbR, AmySbF – AmySbR2 primerleri kullanılarak iki farklı PZR gerçekleştirilmiştir. PZR şartları Çizelge 4.3'te verilmiştir. AmySbF – AmySbR2 650 bp (Şekil 4.14), AmySbF2 – AmySbR ise 1066 bp (Şekil 4.15) büyüklüğündedir.



Şekil 4.14. *S. bovis* RB4 izolatında AmySbF–AmySbR2 primerleri ile gerçekleştirilen PZR. 1: 1. Koloni, 2: 2. Koloni, M: 100 bp DNA standardı (Vivantis) 100- 1000 bp (aşağıdan yukarıya doğru sırasıyla 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000) büyüklüğünde bantlardan oluşmaktadır.



Şekil 4.15. *S. bovis* RB4 izolatında AmySbF2 – AmySbR primerleri ile gerçekleştirilen PZR. 1: 1. Koloni, 2: 2. Koloni, M: 100 bp plus DNA standardı, 100-3000 bp (aşağıdan yukarıya doğru sırasıyla 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000) büyüklüğünde bantlardan oluşmaktadır.

Her iki PZR ürünü de ayrı ayrı pGEM-T Easy vektörüne klonlanmış ve *E. coli* DH5 α 'ya CaCl₂ metodu ile transforme edilmiştir. Transformant kolonilerdeki amilaz aktivitesinin belirlenmesi için nişasta ve agaroz içeren ortam kolonilerin üzerine dökülmüştür. İnkübasyon sonrası Lugol ile boyanmış, pGEMTA2 ve pGEMTA3 plazmidi olarak isimlendirilmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. pGEMTA2 plazmidinin CaCl₂ metodu ile *E. coli* DH5 α 'a aktarılmasıyla elde koloni (A), pGEMTA3 plazmidinin CaCl₂ metodu ile *E. coli* DH5 α 'a aktarılmasıyla elde edilen koloni (B).

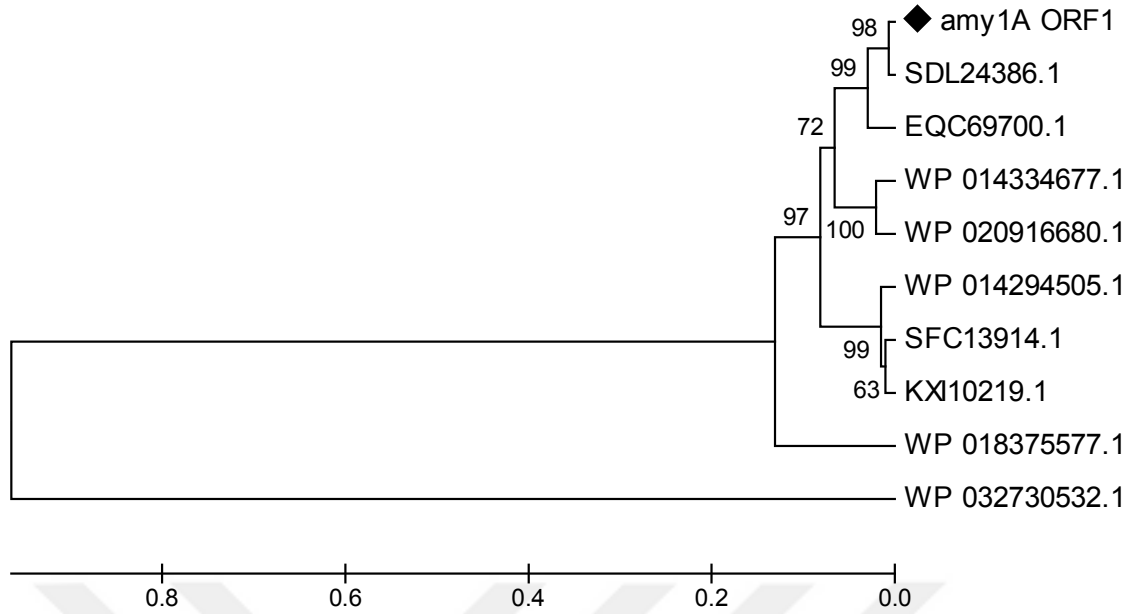
Transformant kolonilerde amilaz aktivitesi görülmemiştir. Dolayısıyla ORF1 ve ORF2'nin ayrı ayrı amilaz aktivitesine sahip olmadığı belirlenmiştir. Her iki ORF'nin birbirlerini tetikleyerek amilaz aktivitesini oluşturduğu düşünülmüştür.

4.2.4. *amy1A*'nın filogenetik analizi

Yapılan çalışmada *S. bovis* RB4'ün *amy1A* amilaz geninin sekansı ortaya çıkartılmış ve bu sekansın kullanımıyla NCBI'dan diğer bakteriyel amilaz genleri seçilmiştir. İki ORF bölgesine sahip olan *amy1A*'nın, her iki ORF'sinin sekansı kendi içinde ve birlikte olmak üzere ayrı ayrı filogenetik analiz yapılmıştır.

amy1A ORF1'inin *Streptococcus* türlerinin amilaz genleri ile genetik yakınlığı Şekil 4.17'de gösterilmiştir. Referans olarak *B. subtilis* amilaz geni (WP_032730532.1) seçilmiştir. *Streptococcus* amilaz genleri iki kola ayrılmıştır. İlk kolda *Streptococcus orisratti* amilaz geni (WP_018375577.1), ikinci kolda ise seçilen diğer *Streptococcus*'lara ait amilaz genleri ve izole edilen *S. bovis* RB4 *amy1A*'nın ORF1'i yer almaktadır. *amy1A* amilaz geni ORF1'inin *S. equinus* amilaz geni (SDL24386.1) ile genetik olarak yakın bulunduğu, bu gruba en yakın amilaz geninin *Streptococcus* sp. (EQC69700.1)'de olduğu görülmüştür. *Streptococcus lutetiensis* (WP_020916680.1) ve *Streptococcus infantarius* (WP_014334677.1)'a ait amilaz genleri bir grup meydana getirmiştir. *Streptococcus gallolyticus* (SFC13914.1) ve *Streptococcus pasteurianus* (KXI10219.1)'un amilaz genleri kendi arasında yakınlık gösterirken, bunların *Streptococcus macedonicus* amilaz geni (WP_014294505.1) ile bağlantısı bulunmuştur.

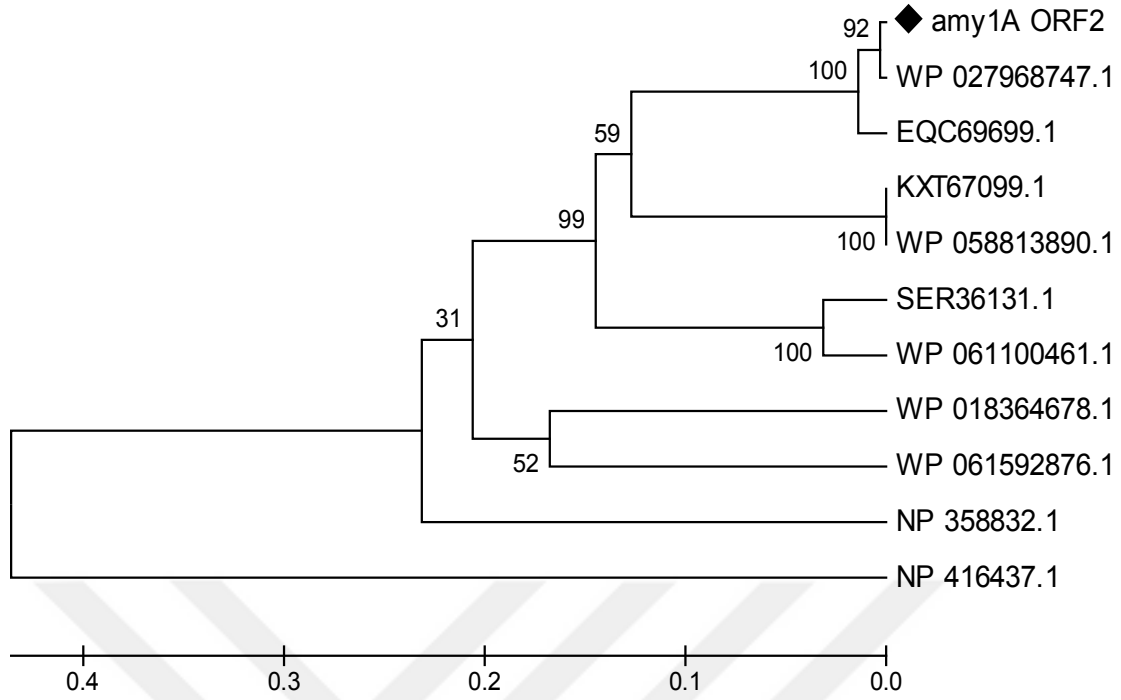
amy1A ORF2 ile elde edilen sonuçlara göre, seçilen amilaz genleri iki ana kola ayrılmıştır (Şekil 4.18). *E. coli* str. K-12 amilaz geni (NP_416437.1) bir kolda diğer kolda ise *amy1A* ORF2 ile birlikte *Streptococcus* türlerine ait amilaz genleri yer almıştır. Bu amilaz genleri içerisinde *Streptococcus caballi* (WP_018364678.1) ve *Streptococcus sanguinis* (WP_061592876.1)'a aitler bir grup, *S. gallolyticus* (SER36131.1) ve *S. pasteurianus* (WP_061100461.1)'a aitler diğer bir grup, *S. lutetiensis* (KXT67099.1) ve *S. infantarius* (WP_058813890.1)'a aitler ise ayrı bir grubu oluşturmuştur. *amy1A* geni ORF2'sinin *S. equinus* amilaz geni (WP_027968747.1) ile genetik olarak yakın bulunduğu ve bu gruba en yakın amilaz geninin *Streptococcus* sp. HSISB1 (EQC69699.1)'de olduğu belirlenmiştir. *Streptococcus pneumoniae* R6 amilaz geni (NP_358832.1) ise diğer *Streptococcus* türlerinin amilaz genlerinden daha uzakta yer almaktadır.



Şekil 4.17. *Streptococcus* türlerine ait amilaz genlerinin *amy1A* geni ORF1'i ile birlikte filogenetik ağacı. Bu filogenetik ağaç MEGA programı kullanılarak UPGMA yöntemiyle elde edilmiştir.

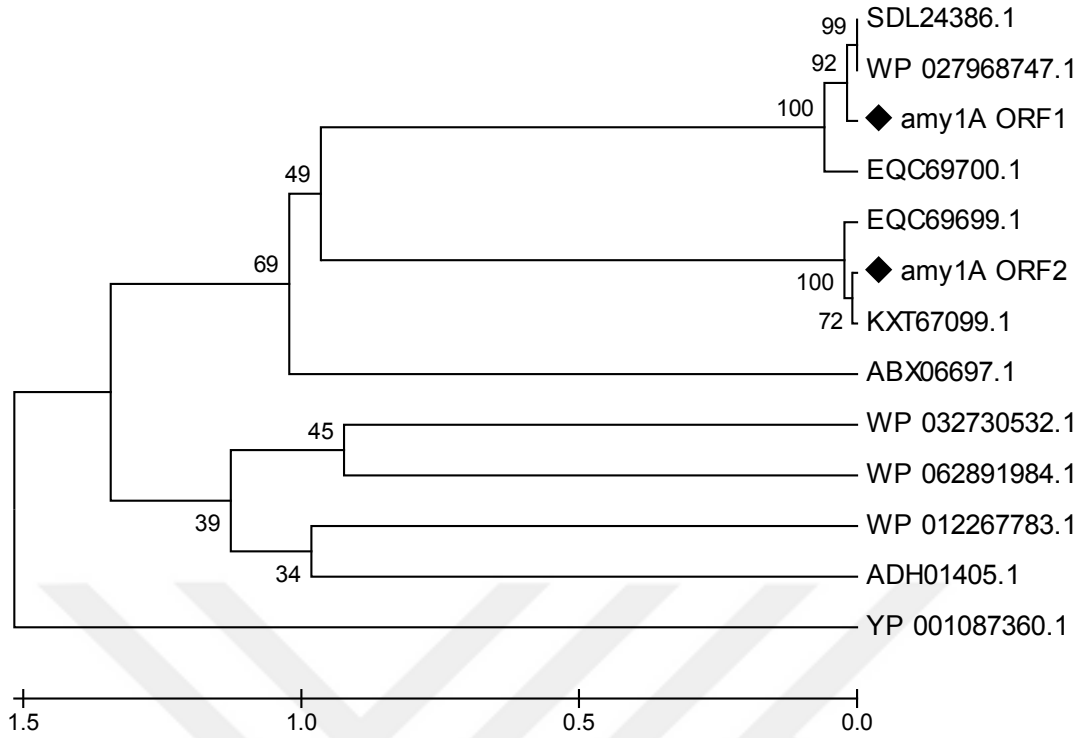
Bu çalışmada yapılan filogenetik analiz sonucuna göre *S.bovis* RB4 suşundan elde edilen *amy1A* amilaz geni ORF1 ve ORF2'sinin ayrı bir şekilde ağaçları çizilmiş ve bunların farklı suşlardaki *S. equinus* amilaz genleri ile genetik olarak yakınlıkları görülmüştür. *S. lutetiensis*'in rumen içeriğinde belirlenmesi (Derakhshani ve ark., 2016), bu bakterinin amilaz geninin, *amy1A*'ya yakınlığı ile doğrulanmıştır. Birçok *Streptococcus* cinsi süt ve süt ürünlerinde sıklıkla büyüebilmektedir. Böyle *Streptococcus*'lar temel olarak *S.bovis*/*S. equinus* kompleksinde yer almaktadır. Bu kompleks içinde bulunan *S. gallolyticus*, *S. pasteurianus*, *S. macedonicus* ve *S. infantarius* rumene adapte olmuş ve amilaz aktivitesi göstermiştir (Papadimitriou ve ark., 2014). *amy1A* ORF1 filogenetik ağacında bulunan *S. orisratti*'nin ağızdan izole edilmesi (Papadimitriou ve ark., 2014), bu bakterinin amilaz geninin diğer seçilen *Streptococcus* cinslerinin amilaz genlerinden ayrı bir kolda yer almasına neden olabilmektedir.

amy1A ORF2 filogenetik ağacında yer alan *S. sanguinis*'in ağızdan, *S. caballi*'nin at midesinde izole edilmesine rağmen, bunların amilaz genlerinin genetik olarak birbirlerine yakın olduğu görülmüştür. Bununla beraber *Streptococcus* cinsi bakterilerin içerisinde *S. pneumoniae*'nin yüksek derecede patojenitesi saptanmıştır (Papadimitriou ve ark., 2014).



Şekil 4.18. *Streptococcus* türlerine ait amilaz genlerinin *amy1A* ORF2 ile birlikte filogenetik ağacı. Bu filogenetik ağaç MEGA programı yardımıyla UPGMA yöntemiyle elde edilmiştir.

amy1A amilaz geninin her iki ORF'si aynı filogenetik ağaç içerisinde farklı bakterilere ait amilaz genleri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.19). Belirlenen sekanslar iki ana kol üzerine yerleşmiştir. Birinci kolda *Clostridioides difficile* 630 amilaz geni (YP_001087360.1), ikinci kolda ise seçilen diğer bakterilerin amilaz genleri yer almaktadır. Bu bakterilerin amilaz genleri de iki ana kola ayrılmıştır. İlk kolda *amy1A* ORF1'in, *S. equinus* amilaz genleri (SDL24386.1, WP_027968747.1) ile genetik olarak yakın olduğu görülmüştür. Bu gruba en yakın amilaz geni *Streptococcus* sp. (EQC69700.1)'de belirlenmiştir. *amy1A* ORF2 *S. lutetiensis* amilaz geni (KXT67099.1) ile genetik olarak yakın bulunmuş, bu gruba en yakın amilaz genine *Streptococcus* sp. HSI5B1 (EQC69699.1)'de rastlanmıştır. *amy1A* ORF1 ve *amy1A* ORF2'nin yer aldığı kol *Herpetosiphon aurantiacus* DSM 785 amilaz geni (ABX06697.1) ile yakınlık göstermiştir. *B. subtilis* (WP_032730532.1) ve *E. coli* (WP_062891984.1) amilaz genleri bir kolda, *Microcystis aeruginosa* (WP_012267783.1) ve *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JDM301(ADH01405.1) amilaz genleri ise ayrı bir kolda yer almıştır. Bu iki ayrı kolun da birbiriyle yakınlığı görülmektedir.



Şekil 4.19. Farklı bakteri türlerine ait amilaz genlerinin *amy1A* geninin ORF1 ve ORF2'si ile birlikte filogenetik ağacı. Bu filogenetik ağaç MEGA programı kullanılarak UPGMA yöntemiyle elde edilmiştir.

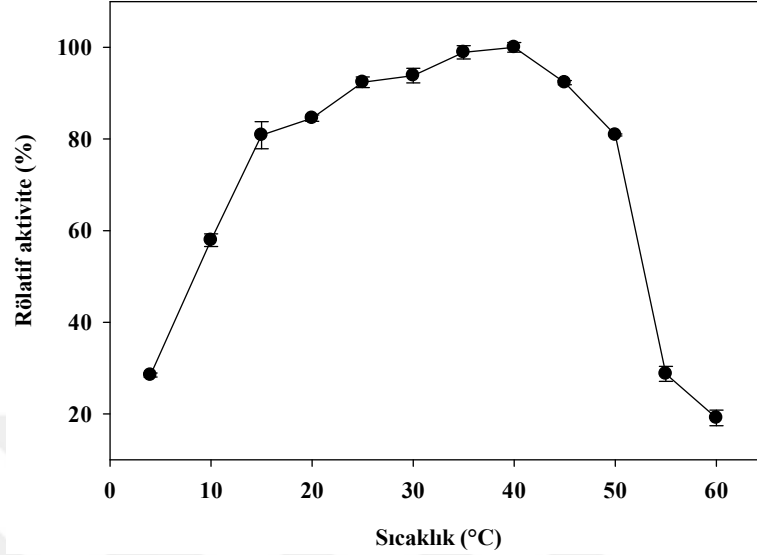
4.2.5. *E. coli* A1'in amilaz üretimi ve aktivitesi

S. bovis RB4'ten klonlanan *amy1A* geni *E. coli* DH5 α 'ya aktarılmış ve *E. coli* A1 oluşturulmuştur. *amy1A* geninin ürünü olan Amy1A enziminin hücresel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Amy1A'nın toplam aktivitesi 11719.32 $\mu\text{mol/dk/ml}$, spesifik aktivitesi 1518.04 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak bulunmuştur.

Amy1A enzimine pH ve sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Buna göre optimum sıcaklık 40 °C olarak belirlenmiştir. Enzimin aktivitesi 15 °C'den sonra hızlı bir artış sergilerken, 25 °C üzerinde % 90'dan fazla aktivite görülmüştür. Enzimin 50 °C'den sonraki sıcaklıklarda önemli miktarda aktivitesi kaybolmuştur (Şekil 4.20).

Literatürde *S. bovis* 148'den α -amilaz genleri *E. coli*'e ekspre edildikten sonra hücre dışı AmyI ve hücre içi AmyII amilaz enzimlerini elde edilmiştir. AmyI'in optimum sıcaklığı 40 °C, AmyII'nin optimum sıcaklığını ise 30 °C olarak belirlenmiştir (Satoh ve ark., 1993). Çalışmamızda *E. coli* A1'den elde edilen ve hücre içi aktivite gösteren Amy1A amilaz enziminin optimum sıcaklığının 40 °C olması, literatürde yer alan

hücre dışı AmyI enzimiyle benzerlik gösterirken, hücre içi AmyII enziminin optimum sıcaklığının daha düşük olduğu görülmüştür.

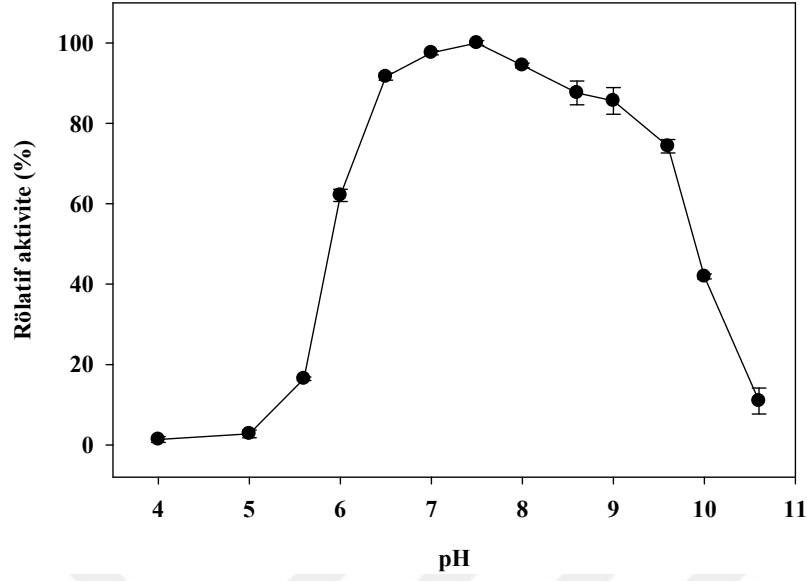


Şekil 4.20. *E. coli* A1'den elde edilen Amy1A enziminin farklı sıcaklıklardaki aktivitesi.

Matsui ve ark. (2007), hücre dışı aktiviteye sahip AmyA amilaz enziminin optimum sıcaklığını 55 °C, hücre içi aktivite gösteren AmyB amilaz enziminin optimum sıcaklığını ise 35 °C olarak bulmuştur. İzole ettiğimiz Amy1A enziminin optimum sıcaklığı 40 °C olmasına rağmen, 35 °C'de % 98.91 aktivite ile literatüre yakınlığı görülmüştür.

Satoh ve ark. (1997), *S. bovis* 148'den izole ettikleri AmyB hücre içi amilaz enziminin 45 °C üzerindeki sıcaklığa karşı çok hassas olduğunu belirlemiştir. Matsui ve ark. (2007), AmyA ve AmyB amilaz enzimlerinin 60 °C'den yüksek sıcaklıklarda aktivitelerini kaybetmeye başladığını belirlemişler. Dolayısıyla literatürde amilaz aktivitesinin sıcaklık hassasiyetinde çeşitlilik görülmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz Amy1A'nın ise 55 °C'de aktivitesinin % 32.43'e azalması, literatürdeki çalışmaların arasında yer aldığını göstermektedir.

Amy1A enziminin optimum pH'ı 7.5 olarak belirlenmiştir. pH değeri 6.5'ten 8.5'e kadar oldukça yüksektir. Enzimin aktivitesi pH 6.0 ve 9.5'te sırasıyla % 61.57 ve % 73.68'e azalma göstermiştir. Bu enzim aktivitesi pH 5.5 ve 10.5'te hızlı bir düşüş göstermiş, pH 5.0'ten sonra ise neredeyse tamamen durmuştur (Şekil 4.21).

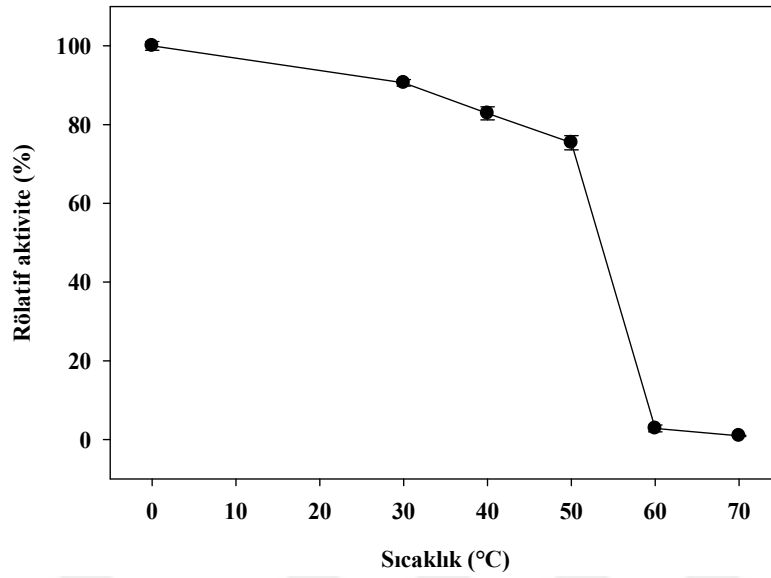


Şekil 4.21. *E. coli* A1'den elde edilen Amy1A enziminin farklı pH aralıklarındaki aktivitesi.

Literatürde hücre dışı aktivite gösteren amilaz enziminin optimum pH'nın 5.5, hücre içi aktiviteye sahip amilazın optimum pH'nın ise 7.0 olduğu belirlenmiştir (Matsui ve ark., 2007). *S. bovis* RB4 *amy1A* geninin *E. coli* DH5α'da ekspresyonu sonucu elde ettiğimiz hücre içi aktivite gösteren Amy1A enziminin optimum pH'nın 7.5 olduğunun görülmesi, literatürle uyumluluk göstermektedir.

Satoh ve ark. (1997), *S. bovis* 148 suşundan izole ettiği AmyB hücre içi enziminin optimum pH'nı 6.5 olarak belirtmiştir. Bu enzimin pH 3.0'den 5.0'e ve pH 8.0'den büyük değerlerde aktivitesini kaybettiğini görmüştür. Rumbak ve ark. (1991), ruminal bir bakteri olan *B. fibrisolvens* H17c amilaz geninin ürünü olan amilaz enziminin optimum pH'nı 6.8 olarak bulmuştur. Elde ettiği amilaz enziminin pH 5.5 ve 7.5'de stabilitesini koruduğunu belirtmiştir. Çalışmamızda *E. coli* A1'den izole edilen ve optimum pH'ı 7.5 olan Amy1A amilaz enziminin pH 6.5 ile 9.0'da stabilitesinin devam ettiği görülmüştür (Şekil 4.21). Bu enzimin aktivitesinin pH 9.0'dan yüksek değerlerde azalması, Amy1A'nın literatürle karşılaştırıldığında daha alkali olduğunu göstermiştir.

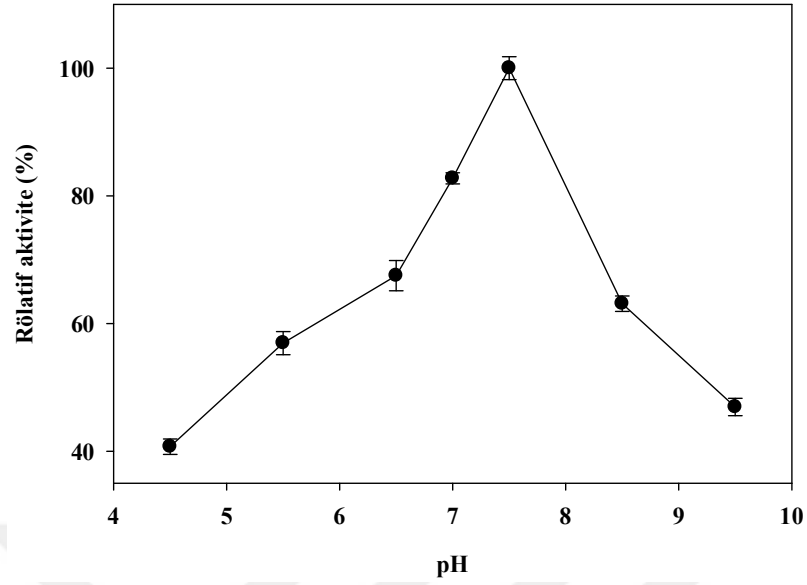
Amy1A enziminin termal stabilitesinin belirlenmesi için, enzim 30, 40, 50, 60 ve 70 °C sıcaklıklarda 60 dk ön inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında optimum pH ve sıcaklık değerlerinde enzimin aktivitesi araştırılmıştır. Amy1A amilaz enzimi, 50 °C ön inkübasyon sıcaklığına kadar aktivitesinin % 80'ini korumuştur (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. *E. coli* A1’den elde edilen Amy1A enziminin termal stabilitesi.

Rumenden izole edilmiş bir bakteri olan *B. fibrisolvens* H17c amilaz geninin *E. coli* C600’de ifade edilerek açığa çıkan enziminin optimum amilolitik aktivitesinin 50 °C olduğu belirtilmiştir. Bu enzimin 20 dk ön inkübasyon sonunda termal stabilitesi 45 °C’in üzerinde azalma göstermiş ve 52 °C’de tamamıyla kaybolmuştur (Rumbak ve ark., 1991). Çalışmamızda, rumen içeriğinden izole edilen *S. bovis* RB4’ten *amy1A* geninin *E. coli* DH5α’da ifade edilerek elde edildiği Amy1A enziminin optimum sıcaklığı 40 °C olarak bulunmuştur. Literatürdeli H17c amilaz enziminin optimum sıcaklığın üzerinde ön inkübasyon sonucunda aktivitenin tamamen durduğu görülürken, klonlanan Amy1A enziminde optimum sıcaklığın (40 °C) üzerinde (~ 55 °C) aktivitenin devam ettirdiği belirlenmiştir.

pH stabilite analizi pH 4.5 - 9.5 arasındaki tampon çözeltilerde 15 dk ön inkübasyona bırakılmış ve sonrasında optimum pH ve sıcaklık değerlerinde standart enzim deneyi gerçekleştirilmiştir. Amy1A amilaz enzimi pH 7.5 de %100 oranında korunurken, pH 6.5 ile 8.5 arasında ortalama % 75.81 kalan aktivite göstermiştir.

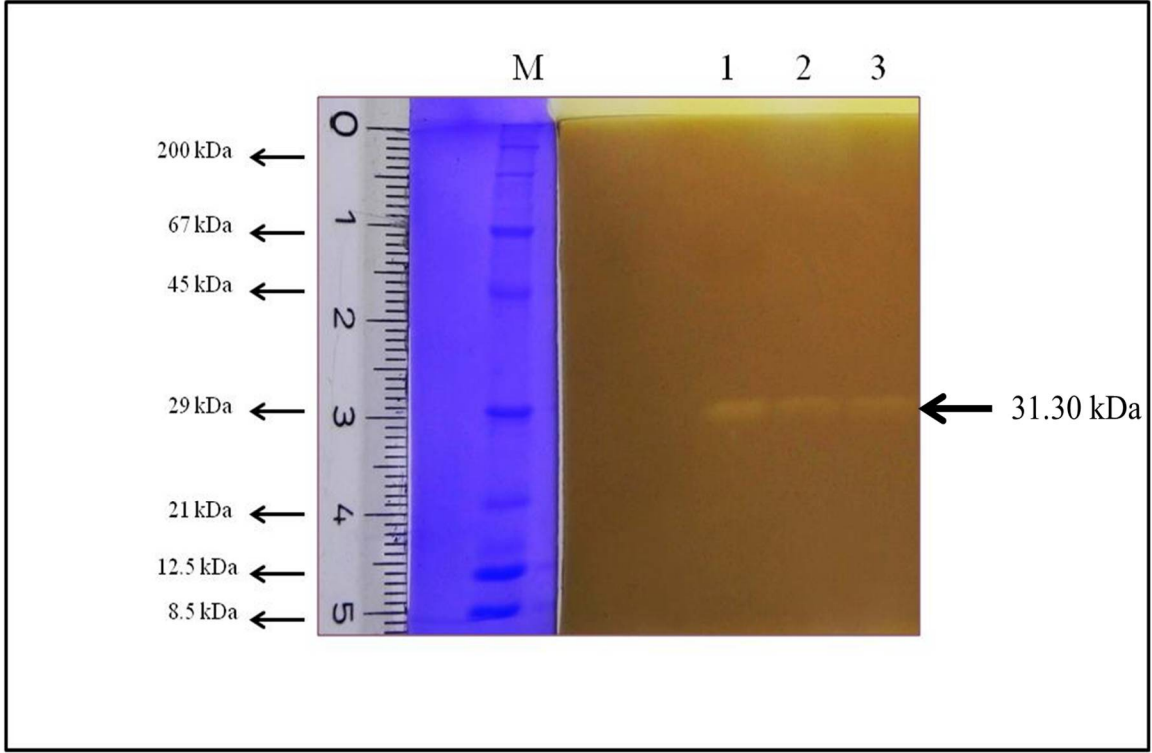


Şekil 4.23. *E. coli* A1'den elde edilen Amy1A enziminin pH stabilitesi.

Amy1A enziminin SDS-PAGE analizinde 31.30 kDa'lık (katedilen mesafeye göre) bir bant gözlenmiştir.(Şekil 4.24).

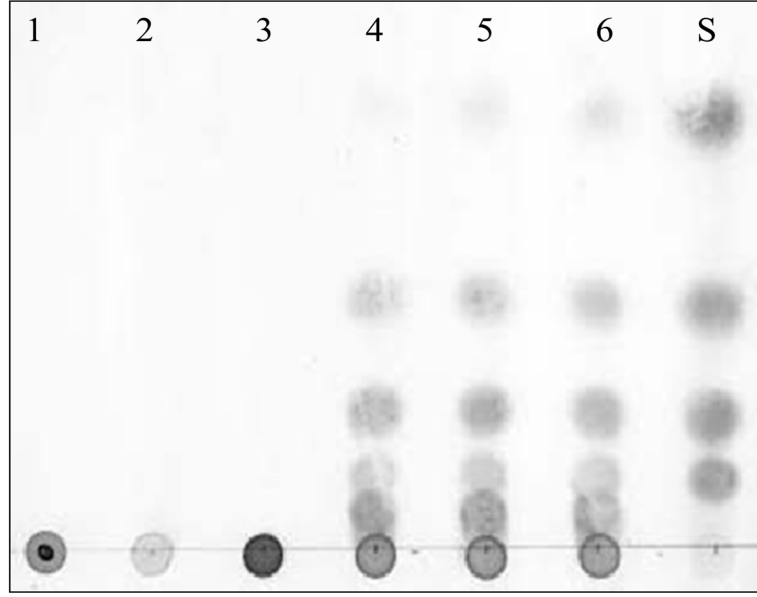
Literatürde *S. bovis*'den *E.coli*'ye klonlanan genlerin hücre içi ve hücre dışı aktivite üreten amilaz enzimleri ile yapılan SDS-PAGE çalışmalarında, moleküler ağırlıkların 50 ve 79 kDa arasında yer aldığı birçok çalışma bulunmaktadır (Cotta ve Whitehead, 1993, Whitehead ve Cotta, 1995; Matsui ve ark., 2007). *B. fibrisolvens* H17c amilaz geni *E. coli* C600'de ifade edilmiş ve enzimin 106 kDa büyüklüğünde olduğunu belirlenmiştir. Bu amilaz enziminin tipik α -amilazlardan daha büyük olduğu bildirilmiştir (Rumbak ve ark., 1991). *E. coli* A1'den elde edilen Amy1A enziminin literatürle karşılaştırıldığında daha düşük moleküler ağırlığa sahip olduğu görülmektedir.

S. bovis RB4'den elde edilen *amy1A* geninin ürünü olan Amy1A amilaz enziminin optimum sıcaklık ve pH değerinde ince tabaka kromatografisi kullanılarak nişastayı glikoza kadar parçaladığı görülmüştür (Şekil 4.25). Plakaya kontrol amacı için inkübasyona uğramamış enzim ekstraktı (0 dk) yüklenmiştir. Ayrıca substrat olarak yüklenen % 1 nişastaya ait herhangi bir hidrolize ürün elde edilmemesi, bu ürünlerin sadece enzimatik aktivite ile ortaya çıktığını doğrulamaktadır.



Şekil 4.24. *E. coli* A1'e ait enzim örneklerinin zimogram analizi. 1: 5 µl, 2: 10 µl, 3: 15 µl enzim örnekleri. M: protein standardı.

Hücrel amilaz enziminin temel olarak maltotrioza kadar hidrolize uğraması sebebiyle maltotrioz üreten enzim olduğunu düşünülmüştür (Cotta ve ark., 1997). Cotta ve Whitehead (1993), *S. bovis* JB1 amilaz genini *E. coli* JM83'de ifade ederek ürettikleri amilazın maltooligosakkaritlere hidrolize olduğunu belirtmiştir. Satoh ve ark. (1993), *S. bovis* 148 amilaz genini *E. coli* MC1061'de ifade ettikten sonra hücre dışı AmyI amilaz enziminin nişastayı glikoz ve maltoza parçaladığı, hücre içi AmyII amilaz enziminin büyük bir kısmının maltotrioza, küçük bir kısmının ise maltoza hidrolize olduğunu bulmuştur. *S. bovis* RB4 *amy1A* geninin *E. coli* DH5α'da ekspresyonu ile oluşan hücrel Amy1A amilaz enziminin maltoz, maltotrioz ve maltotetroz gibi olisakkaritlere ek olarak glikoza kadar parçalandığı görülmüştür. Bu hücrel enzim 15 dk inkübasyonda eser miktarda, 60 dk inkübasyon sonunda ise büyük miktarda glikoza kadar hidrolize olmuştur. Dolayısıyla Amy1A amilaz enziminin bu özelliğiyle literatürde yer alan hücrel amilaz enzimlerinden daha avantajlı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.25. *E. coli* A1'e ait ince tabaka kromatografi bulguları. 1: enzim ekstraktı, 2: substrat (% 1 nişasta), 3: enzim ekstraktının optimum sıcaklıkta 0 dk inkübasyonu, 4: enzim ekstraktının optimum sıcaklıkta 15 dk inkübasyonu, 5: enzim ekstraktının optimum sıcaklıkta 30 dk inkübasyonu, 6: enzim ekstraktının optimum sıcaklıkta 60 dk inkübasyonu, S: standart (1 mg/ml konsantrasyonlarda glikoz, maltoz, maltotrioz ve maltotetroz (Merck, Almanya)).

4.3. *Bacillus licheniformis* Likenaz Geninin Klonlanması ve Karakterizasyonu

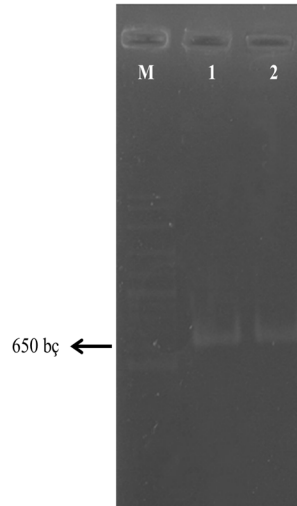
4.3.1. *Bacillus licheniformis* likenaz geninin taranması

Bacillus sp.'e ait likenaz gen sekansları Blast yardımıyla taranmış ve bunların belirli kısımları kullanılarak primerler tasarlanmıştır. Çizelge 3.7'de tasarlanan primerler verilmiştir. *B. licheniformis* RB16 izolatının genomik DNA'sı ve tasarlanan LicBF- LicBR primer çiftinin kullanımıyla likenaz geni çoğaltılmıştır. Çizelge 4.5'te LicBF- LicBR primerleriyle yapılan PZR şartları görülmektedir.

Çizelge 4.5. *B. licheniformis* RB16 DNA'sından LicBF-LicBR primerleriyle gerçekleştirilen PZR optimizasyon çalışma şartları.

	Ön Denatürasyon	Denatürasyon	Yapışma	Uzama	Son Uzama
Sıcaklık (°C)	94	94	55	72	72
Zaman (dk)	5	0.5	0.5	1	5
Döngü	1		40		1

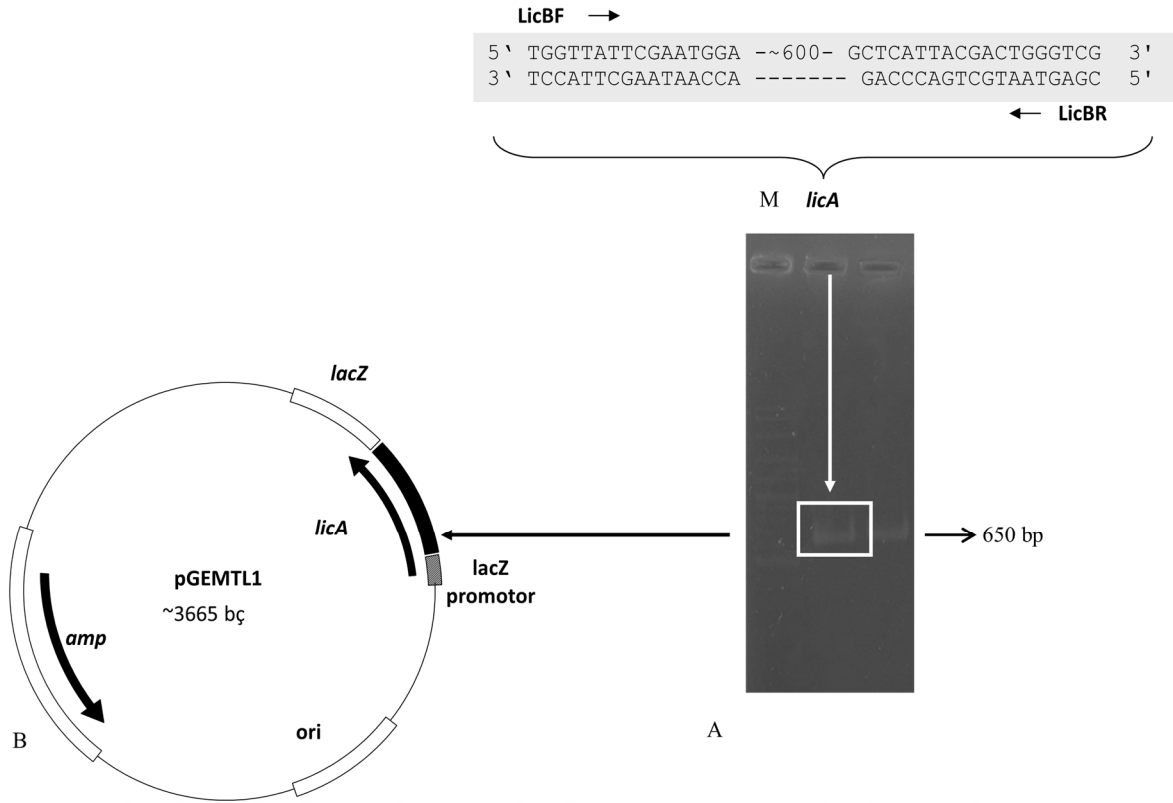
LicB primerleri 650 bp büyüklüğündeki bölgeyi amplifiye etmiştir (Şekil 4.26). Bu büyüklüğün hedeflenen bölge ile uyumu likenaz geni olduğunu doğrulamış ve klonlama çalışmalarına başlanmıştır.



Şekil 4.26. *B. licheniformis* RB16 izolatında LicB primerleri ile yapılan PZR. M: 100 bp plus DNA standardı (Vivantis) 100- 3000 bp büyüklüğünde bantlardan oluşmaktadır. 1: 1. Koloni, 2: 2. Koloni.

4.3.2. Likenaz geninin klonlanması

Likenaz geninin klonlanmasında amilaz geninde kullanılan pGEM-T Easy plazmidi tercih edilerek pGEMTL1 plazmidi elde edilmiştir (Şekil 4.27).

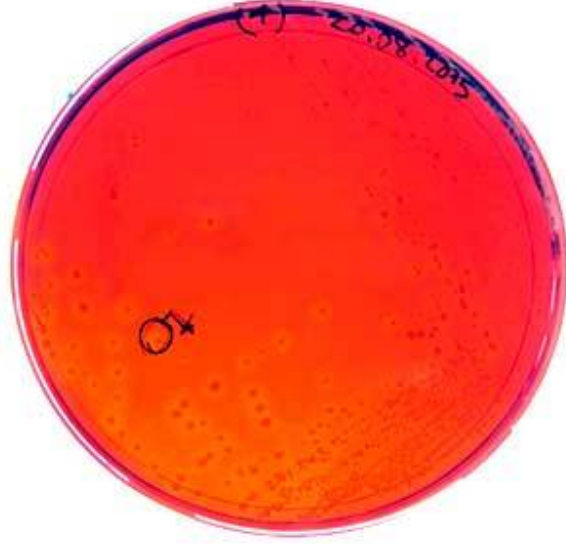


Şekil 4.27. PZR amplifikasyonu sonucunda elde edilen *licIA* geni (A), pGEM-T vektörüne *licIA*'nın klonlanarak pGEMTL1 plazmidinin meydana getirilmesi (B). M: 100 bç plus DNA standardı (Vivantis) 100- 3000 bç büyüklüğünde bantlardan oluşmaktadır.

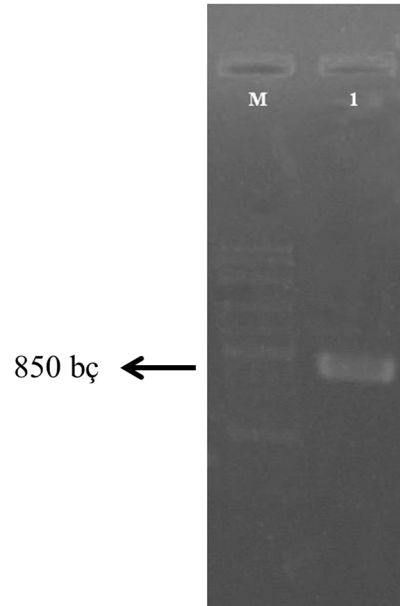
Rekombinant plazmit kalsiyum klorür metodu ile *E. coli* DH5 α 'ya aktarılmıştır. Transformantlar 150 μ g/ml ampisilin içeren LB besiyerinde geliştirilmiştir. Transformantlardaki likenaz geni % 0.1 Likenan (w/v, Merck) ve % 0.4 Agaroza (w/v, Sigma) içeren ortamın kolonilerin üzerine yayılıp, 37 °C'de 4 saat inkübasyon sonrasında % 0.5 Kongo kırmızısı (w/v, Sigma) ile boyanmasıyla tespit edilmiştir. Enzim aktivitesi gösteren koloniler petriden alınarak saflaştırılmış ve saflaştırılan bakteriye *E. coli* L1 ismi verilerek sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere – 20 °C'de depolanmıştır (Şekil 4.28).

E. coli L1'e transforme edilmiş pGEMTL1 plazmidinin kontrol edilmesi için plazmit izolasyonu yapılmıştır. pGEMTL1 plazmidi içerisindeki *licIA* geninin varlığı M13 primerleri ile yapılan PZR sonunda belirlenmiştir. Bu PZR'nin çalışma şartları

Çizelge 4.4'te gösterilmiştir. M13F-M13R primerleri ile gerçekleştirilen PZR'nin yaklaşık 900 bç'de ürün vermesi, pGEMTL1 plazmidine *lic1A* geninin klonlandığını göstermektedir. Şekil 4.29'da pGEMTL1 plazmidinin M13 primerleri ile yapılan PZR ürününün görüntüsü verilmiştir.



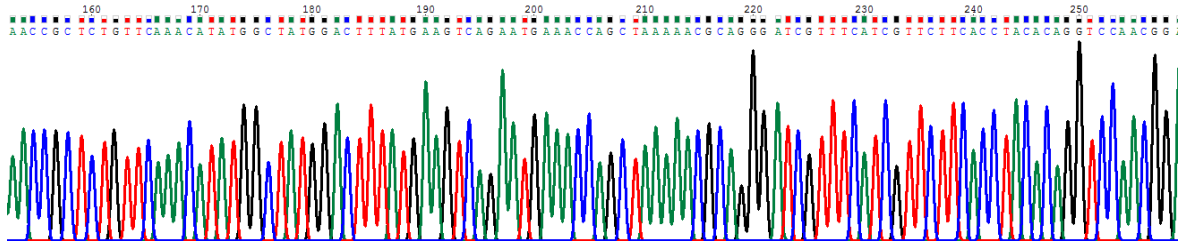
Şekil 4.28. pGEMTL1 plazmidinin CaCl_2 metodu ile *E.coli* DH5 α 'a aktarılmasıyla elde edilen transformant koloni.



Şekil 4.29. *E. coli* L1'den izole edilen pGEMTL1 plazmidinin M13 primerleri ile yapılan PZR görüntüsü. M: 100 bç plus DNA standardı (Vivantis) 100- 3000 bç büyüklüğünde bantlardan oluşmaktadır.

4.3.3. *lic1A*'nın nükleotid ve amino asit dizisi

B. licheniformis RB16'ndan izole edilen ve *E. coli*'de eksprese edilen *lic1A* genini içeren pGEMTL1 plazmidi ile PZR yapılmış ve sekansı belirlenmiştir. Sekansın belirlenmesinde ileri ve geri primerlerin her ikisinde kullanılmıştır. Şekil 4.30'da belirlenen kromatogramların bir kısmı gösterilmiştir.



Şekil 4.30. *lic1A*'nın ileri primer ile elde edilen diziye ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı.

lic1A geninin 650 baz çiftlik nükleotid dizisinde tek ORF bulunmaktadır. Nükleotid dizisinin kullanımıyla 183 amino asit içeren dizi Şekil 4.31'de verilmiştir.

Sun ve ark. (2012), *Bacillus amyloliquefaciens* likenaz genini PZR ile çoğaltmış ve PZR ürününü pTG19-T Easy vektör içerisine klonlamıştır. *E. coli* DH5 α 'da ifade ettikleri pozitif klonları seçerek plazmit izolasyonu yapmıştır. Bu genin tek ORF içeren 720 baz çiftlik nükleotid dizisini kullanarak 239 amino asidi kodladığını bulmuştur. Kim ve ark. (2002), *Bacillus circulans bglBC1* likenaz geninin *E. coli* DH5 α 'ya aktarıldığında 771 bç'lik tek ORF'ye sahip 257 amino asidi kodladığını belirtmiştir. Teng ve ark. (2006), *B. licheniformis*'den izole edilen likenaz genini klonlamış ve *E. coli* BL2'de ifade etmiştir. Sekans sonucunda 645 bç'nin bir ORF'sinin 215 amino asit kodladığını bildirmiştir. Çalışmamızda *B. licheniformis* RB16'dan izole edilen ve *E. coli*'de eksprese edilen *lic1A* geninin 650 bç nükleotid dizisinin tek ORF'sinin 183 amino asit kodladığının bulunması, literatürle karşılaştırıldığında benzerlik göstermektedir.

Lic1A'nın amino asit dizisi *Bacillus atrophaeus* beta glukanaaz (WP_061670840.1) ile % 99, *B. subtilis* endo-beta-1,3-1,4 glukanaaz (EFG93267.1) ile % 97 ve *B. licheniformis* beta glukanaaz (WP_075749294.1) ile % 95 oranında homolog bulunmuştur.

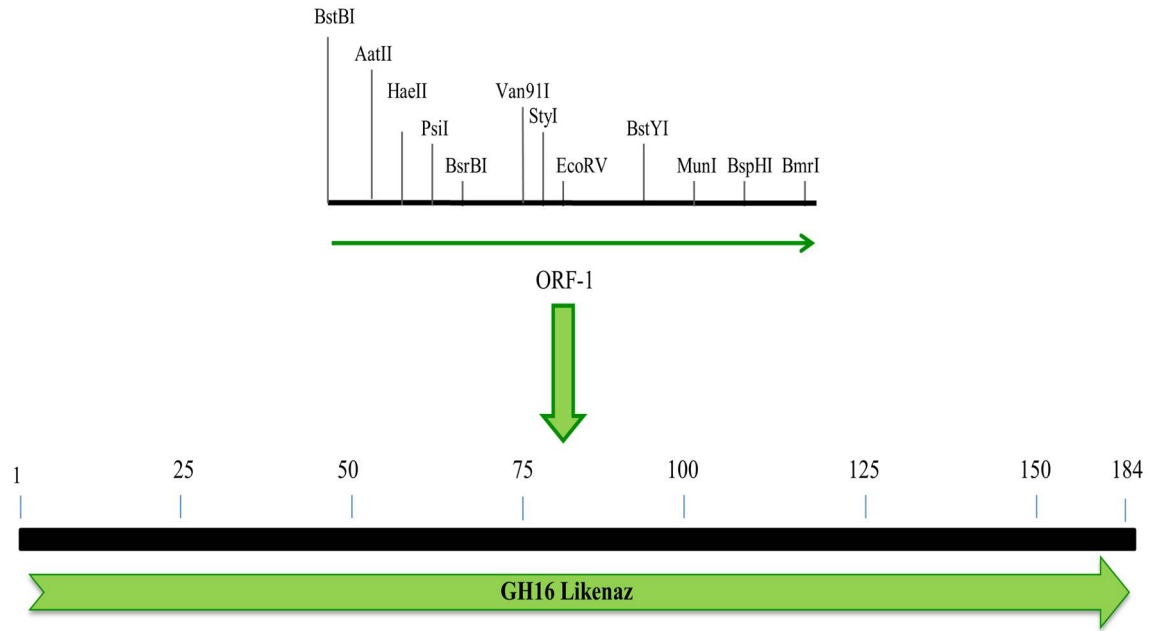
```

12  atg gaa ata tgt tca act gca ctt tgg cgt gca aat aac gta tca
    M  E  I  C  S  T  A  L  W  R  A  N  N  V  S
57  gtg acg tca tta ggt gaa atg cgt ttg gcg cta aca agt cca gct
    V  T  S  L  G  E  M  R  L  A  L  T  S  P  A
102 tat aac aag ttt gac tgc ggg gaa aac cgc tct gtt caa aca tat
    Y  N  K  F  D  C  G  E  N  R  S  V  Q  T  Y
147 ggc tat gga ctt tat gaa gtc aga atg aaa cca gct aaa aac gca
    G  Y  G  L  Y  E  V  R  M  K  P  A  K  N  A
192 ggg atc gtt tca tcg ttc ttc acc tac aca ggt cca acg gat gga
    G  I  V  S  S  F  F  T  Y  T  G  P  T  D  G
237 act cct tgg gat gag att gat atc gaa ttt tta gga aaa gac aca
    T  P  W  D  E  I  D  I  E  F  L  G  K  D  T
282 aca aag gtt caa ttt aac tat tat aca aat ggt gta gga aac cat
    T  K  V  Q  F  N  Y  Y  T  N  G  V  G  N  H
327 gag aag att gtg gat ctc gga ttt gat gca gcc aat gcc aat cat
    E  K  I  V  D  L  G  F  D  A  A  N  A  N  H
372 aca tat gcg ttc gat tgg cag cca aac tct att aaa tgg tat gtc
    T  Y  A  F  D  W  Q  P  N  S  I  K  W  Y  V
417 gat ggg caa ttg aaa cat act gcg aca agc caa att ccg aca aca
    D  G  Q  L  K  H  T  A  T  S  Q  I  P  T  T
462 cca gga aag atc atg atg aac ttg tgg aat ggt acg ggt gta gat
    P  G  K  I  M  M  N  L  W  N  G  T  G  V  D
507 gaa tgg ctc ggt tcc tac aat ggt gta aca ccg cta tac gct cat
    E  W  L  G  S  Y  N  G  V  T  P  L  Y  A  H
552 tac gac tgg gtc g
    Y  D  W  V

```

Şekil 4.31. *B. licheniformis* RB16'dan klonlanan *lic1A* geninin nükleotid ve amino asit dizisi.

E. coli L1'den ifade edilen Lic1A likenaz enzimi “glikozil hidrolaz 16” ailesinde yer almaktadır (Şekil 4.32). Literatürde yer alan farklı *Bacillus* türlerinden izole edilerek likenaz genlerinin *E. coli*'de ekspresyonu ile ortaya çıkan enzimlerin birçoğunun da GH16 ailesinde olduğu belirlenmiştir (Teng ve ark., 2006; Sun ve ark., 2012).



Şekil 4.32. Lic1A'nın kesim enzimlerinin bir kısmı ve GH16 ailesi.

Lic1A'nın literatürden seçilen korunmuş domainlerle amino asit farklılıkları Şekil 4.33'te verilmiştir.

WP_075749294.1	MPYRMKRLLLLLVTGLFISLSAVTSTASAQTGGSFFDPFNSYNSGFWQKANGYSNGDMFN
licA1	-----
WP_061670840.1	MSYRMKRVLLLLVTGLFMSLSAVTSTASAQTGGSFFDPFNSYNSGLWQKANGYSNGNMFN
EFG93267.1	MSYRMKRVLLLLVTGLFMSLSAVTSTASAQTGGSFFDPYNSYNSGLWKKANGYSNGNMFN
	: : : : :
WP_075749294.1	CTWRANNVSMTSLGEMRLVLTSPSYNKFDCCGENRSVQKYGYGLYEVVMKPAKNVGIVSSF
licA1	WRANNVS TSLGEMRL LTSP YNKFDCCGENRSVQ YGYGLYEVVMKPAKN GIVSSF
WP_061670840.1	CTWRANNVS TSLGEMRL LTSPSYNKFDCCGENRSVQ YGYGLYEVVMKPAKN GIVSSF
EFG93267.1	CTWRANNVSMTSLGEMRL LTSPSYNKFDCCGENRSVQ YGYGLYEVVMKPAKNVGIVSSF
	: : ***** . ***** . ***** : ***** . ***** . *****
WP_075749294.1	FITYTGPTDGTPWDEIDIEFLGKDTTKVQFNYYTNGAGNHEKMMDLGFDAAN YHTYAFDW
licA1	FITYTGPTDGTPWDEIDIEFLGKDTTKVQFNYYTNG GNHEK DLGFDAAN HTYAFDW
WP_061670840.1	FITYTGPTDGTPWDEIDIEFLGKDTTKVQFNYYTNG GNHEK DLGFDAAN HTYAFDW
EFG93267.1	FITYTGPTDGTPWDEIDIEFLGKDTTKVQFNYYTNG GNHEK DLGFDAANTYHTYAFDW
	***** . ***** . ***** . ***** . *****
WP_075749294.1	QPNSIKWYVDGQLKHTATSQIPTTPGKIMMNLWNGTGVDLWLSYNGVTPLYAHYDWRVRY
licA1	QPNSIKWYVDGQLKHTATSQIPTTPGKIMMNLWNGTGVDLWLSYNGVTPLYAHYDWRV--
WP_061670840.1	QPNSIKWYVDGQLKHTATSQIPTTPGKIMMNLWNGTGVDLWLSYNGVTPLYAHYDWRVRY
EFG93267.1	QPNSIKWYVDGQLKHTATSQIPTTPGKIMMNLWNGTGVDLWLSYNGVTPLYAHYDWRVRY

WP_075749294.1	TKK
licA1	---
WP_061670840.1	TKK
EFG93267.1	TKK

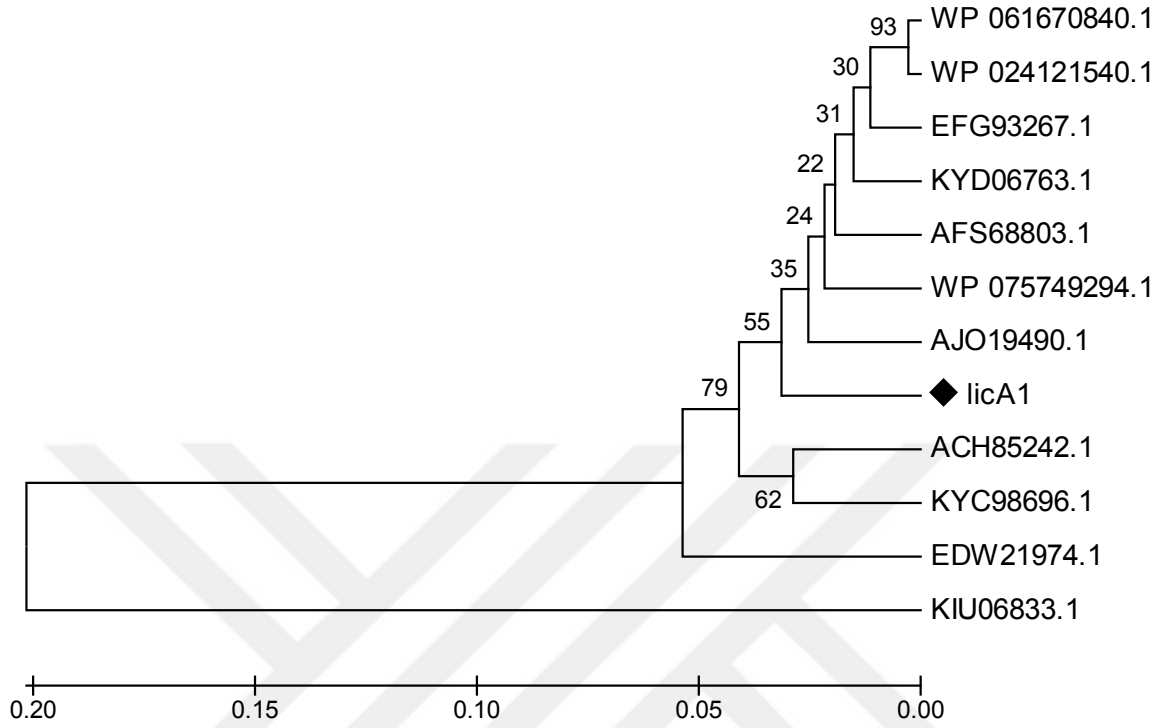
Şekil 4.33. Lic1A'nın diğer amino asit dizileriyle homolojisi. WP_061670840.1: *B. atrophaeus* beta glukanaaz, WP_075749294.1: *B. licheniformis* beta glukanaaz, EFG93267.1: *B. subtilis* endo-beta-1,3-1,4 glukanaaz.

4.3.4. *lic1A*'nın filogenetik analizi

Bu çalışmada *B. licheniformis* RB16 *lic1A* likenaz geninin sekansı belirlenmiştir. *lic1A* geninin sekansı kullanılarak NCBI'dan seçilen *Bacillus* türlerine ait bakteriyel β -glukanaaz ve β -(1,3-1,4) glukanaazlar (likenaazlar) ile filogenetik analiz yapılmış ve *lic1A*'nın belirlenen genlerle genetik yakınlığı Şekil 4.34'te verilmiştir. Filogenetik ağacın bir kolunda *Clostridium butyricum* β -glukanaaz geni (KIU06833.1) diğer kolunda ise *Bacillus* türlerinin β -glukanaazları ve β -(1,3-1,4) glukanaazlar yer almıştır. *Bacillus pumilus* β -(1,3-1,4) glukanaaz (EDW21974.1) diğer *Bacillus* türlerinden ayrılmıştır. *Bacillus* sp. endo- β -(1,3-1,4) glukanaaz (ACH85242.1) ve *Bacillus amyloliquefaciens* endo- β -(1,3-1,4) glukanaaz (KYC98696.1) bir grup meydana getirmiştir. Bu grup iki dala ayrılmıştır. Bir dalda *licA1* diğer dalda ise NCBI'dan seçilen diğer genler yer almaktadır. *Bacillus atrophaeus* (WP_061670840.1) ve *Bacillus mojavensis* (WP_024121540.1)'e ait β -glukanaazlar genetik olarak yakınlık göstermiştir. Bunlar *Bacillus subtilis* endo- β -(1,3-1,4) glukanaaz (EFG93267.1) ile grup oluşturmuştur. *Bacillus vallismortis* endo- β -(1,3-1,4) glukanaaz (KYD06763.1), *Bacillus tequilensis* β -(1,3-1,4) glukanaaz (AFS68803.1), *B. licheniformis* β -glukanaaz (WP_075749294.1) ve *Bacillus paralicheniformis* β -(1,3-1,4) glukanaaz (AJO19490.1) genleri sırasıyla bu gruba yakın bulunmuştur.

Bacillus circulans *bglBC1* likenaz geni endo- β -1,3-1,4-glukanaaz içeren *Bacillus* strain ile % 68, *Bacillus brevis* ile % 51 oranında homoloji göstermiştir (Kim ve ark., 2002). *B. licheniformis* EGW039'dan elde edilen *eg1314* likenaz geni, *B. subtilis* ile % 83, *B. alkalophilus* ile % 55, *B. circulans* ile % 22 ve *F. succinogenes* likenaz genleriyle % 34 oranında benzer bulunmuştur (Teng ve ark., 2006). *Bacillus amyloliquefaciens*'den klonlanan likenaz geni *B. licheniformis* ile % 93, *B. subtilis* ile

% 90, *Paenibacillus* sp. ile % 73 ve *Clostridium thermocellum* likenaz geni ile % 71 oranında homolog bulunmuştur (Sun ve ark., 2012).

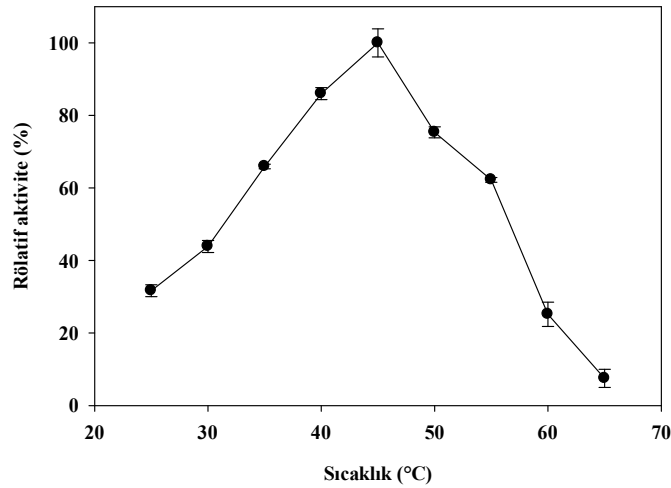


Şekil 4.34. *Bacillus* türlerine ait β -glukanaz ve β -(1,3-1,4) glukanaz genlerinin *lic1A* ile birlikte filogenetik ağacı. Bu filogenetik ağaç MEGA programı kullanılarak UPGMA yöntemiyle elde edilmiştir.

4.3.5. *E. coli* L1'in likenaz üretimi ve aktivitesi

lic1A geninin ürünü Lic1A likenaz enziminin hücresel aktivite gösterdiği görülmüştür. Lic1A'nın toplam aktivitesi 660.99 $\mu\text{mol/dk/ml}$, spesifik aktivitesi 52.97 $\mu\text{mol/dk/mg}$ protein olarak hesaplanmıştır.

Lic1A enziminin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerlerinin belirlenmesi için 25 – 65 °C arasındaki sıcaklıklarda enzim aktivitesi araştırılmıştır. Bu kapsamda optimum sıcaklık 45 °C olarak bulunmuştur. Enzim 40 °C'de % 85'den fazla aktivite göstermiştir. Lic1A'nın aktivitesi 50 °C'de % 75'lere kadar azalmıştır. Lic1A enzimi 30 °C'de aktivitesinin yarıdan fazlasını kaybederken, 55 °C'de % 62.23 aktivite göstermektedir. Enzim 60 °C sıcaklıkla birlikte aktivitesini kaybetmeye başlamış 65 °C'de aktivitesi % 7.49'a düşüş göstermiştir. Lic1A 35 °C'de ile 55 °C'de arasında ortalama % 77.89'luk bir aktivite sergilemiştir (Şekil 4.35).



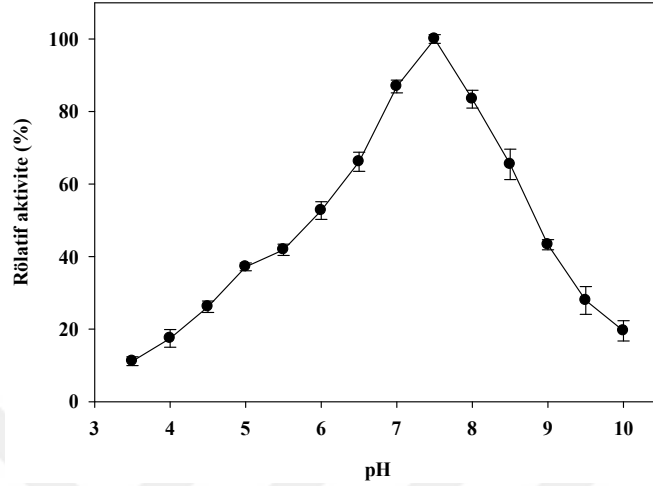
Şekil 4.35. *E. coli* L1'den elde edilen Lic1A enziminin farklı inkübasyon sıcaklıklarındaki aktivitesi.

Kim ve ark. (2002), *Bacillus circulans* ATCC21367 *bglBC1* likenaz genini *E. coli* DH5'a aktarmıştır. Likenaz enziminin optimum 45 °C sıcaklıkta çalıştığını görmüştür. *B. licheniformis* RB16 *lic1A* geninin *E. coli* DH5'da ekspresyonu sonucu Lic1A enziminin optimum sıcaklığının da 45 °C olması literatürle % 100 benzerlik göstermektedir. Bununla beraber *B. amyloliquefaciens* ATCC 23350 ve *B. subtilis* 168 suşlarına ait likenaz genlerinin ürünü olan enzimlerin optimum aktivitesi 50 °C olarak belirlenmiştir (Sun ve ark., 2012; Furtado ve ark., 2011). *B. licheniformis* EGW039'dan likenaz geni *E. coli*'de ifade edilmiştir. Rekombinat likenazın optimum sıcaklığı 40 °C olarak bildirilmiştir (Teng ve ark., 2006). Çalışmamızda elde edilen Lic1A'nın 40 °C'de % 86.01, 50 °C'de % 75.33 aktivite göstermesi, literatürdeki verilerin arasında yer aldığını göstermiştir.

Lic1A enzimin optimum aktivitesi pH 7.5'de saptanmıştır. Likenaz enzimi pH 6.0 ve 9.0 arasında ortalama % 68.48 aktivite göstermiştir. Enzim pH 3.5'te aktivitesinin neredeyse % 90'ını kaybetmiştir (Şekil 4.36).

B. licheniformis EGW039 likenaz geninin *E. coli*'de ekspresyonu ile ortaya çıkan likenaz enziminin optimum pH'ı 5.6 olarak belirtilmiştir (Teng ve ark., 2006). Literatürde yer alan *B. circulans*, *B. subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* likenaz genlerinin *E. coli*'de ifade edilmesi sonucunda da optimum pH değerlerinin 5.6 – 6.0 arasında olduğu belirlenmiştir (Kim ve ark., 2002; Furtado ve ark., 2011; Sun ve ark., 2012). Çalışmamızda izole ettiğimiz *B. licheniformis* RB16 *lic1A* geninin ürünü olan Lic1A'nın optimum

pH'nın ise 7.5 olduğu görülmüştür. Lic1A likenaz enziminin aktivitesi pH 5.5 ve 6.0'da ortalama % 45.72'e düşmüştür.



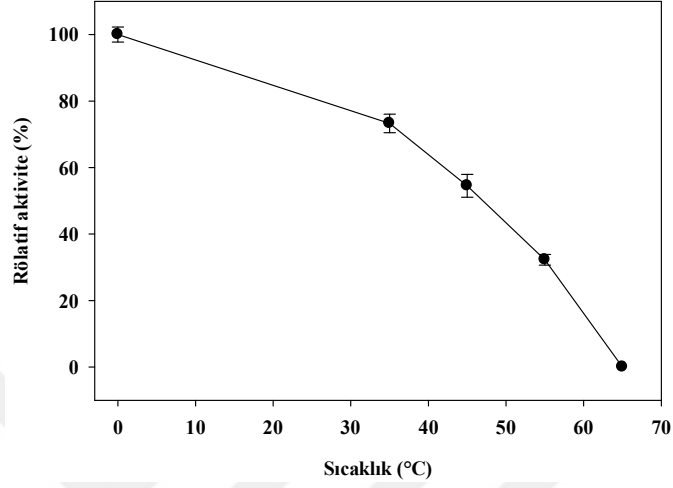
Şekil 4.36. *E. coli* L1'den elde edilen Lic1A enziminin farklı pH aralıklarında gösterdiği aktivite.

Termal stabiliteyi saptamak için, Lic1A likenaz enzimi substrat ilave edilmeden 35, 45, 55, 65 ve 75 °C sıcaklıklarda 60 dk ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu muameleden sonra enzimin kalan aktivitesi optimum sıcaklık ve pH uygulanarak standart enzim deneyi ile belirlenmiştir. Enzim 35, 45 ve 55 °C deki ön inkübasyon sonunda sırasıyla % 78.31, % 46.03 ve % 36.77 kalan aktivite göstermiştir. Lic1A 65 °C ön inkübasyonda aktivitesinin tamamını kaybetmiştir (Şekil 4.37).

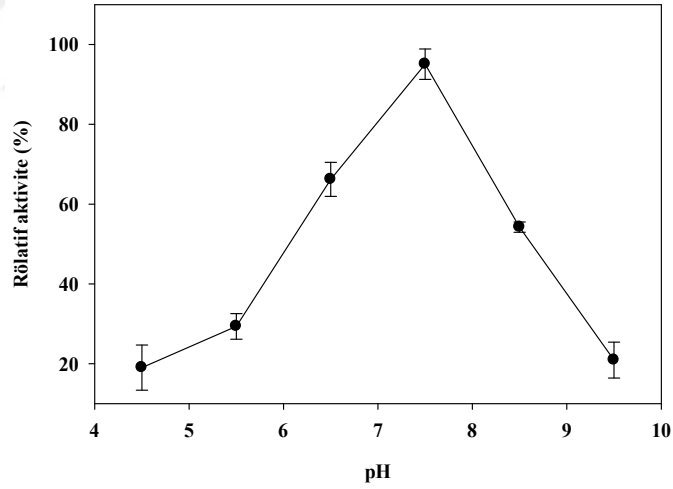
B. subtilis 168'in likenaz geninin *E. coli*'de ekspresyonu ile ortaya çıkan enzimin 60 °C'de 10 dk ön inkübasyon sonunda, aktivitesinin % 40'ından fazlasını koruduğu görülmüştür (Furtado ve ark., 2011). *B. licheniformis* RB16 *lic1A* geninin *E. coli* DH5'da ifadesi sonucu elde edilen Lic1A enziminin, 55 °C sıcaklıkta 60 dk ön inkübasyon uygulaması sonrasında % 40'tan daha az aktivitesi kalmıştır.

Lic1A likenaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi için pH 4.5 - 9.5 arasındaki tampon çözeltilerle 15 dk ön inkübasyona tabi tutulmuş ve sonrasında kalan aktivitenin tespit edilmesi için optimum pH ve sıcaklıkta standart enzim deneyi devam ettirilmiştir. Lic1A enziminin aktivitesi pH 6.5 ön inkübasyon sonucunda % 69.87'e düşmüştür. Enzim pH 8.5'te yarıdan fazla aktivitesini korumaktadır. Lic1A'nın aktivitesinin pH 4.5'te %

15.3'e düştüğü görülmüştür. Lic1A enzimi maksimum aktivitenin tespit edildiği pH 7.5'te en iyi stabiliteyi göstermiştir (şekil 4.38). Ayrıca pH stabilitesinin kalan aktivite değerlerinin, normal pH aktivite değerleri ile uyumluluğu bulunmaktadır.

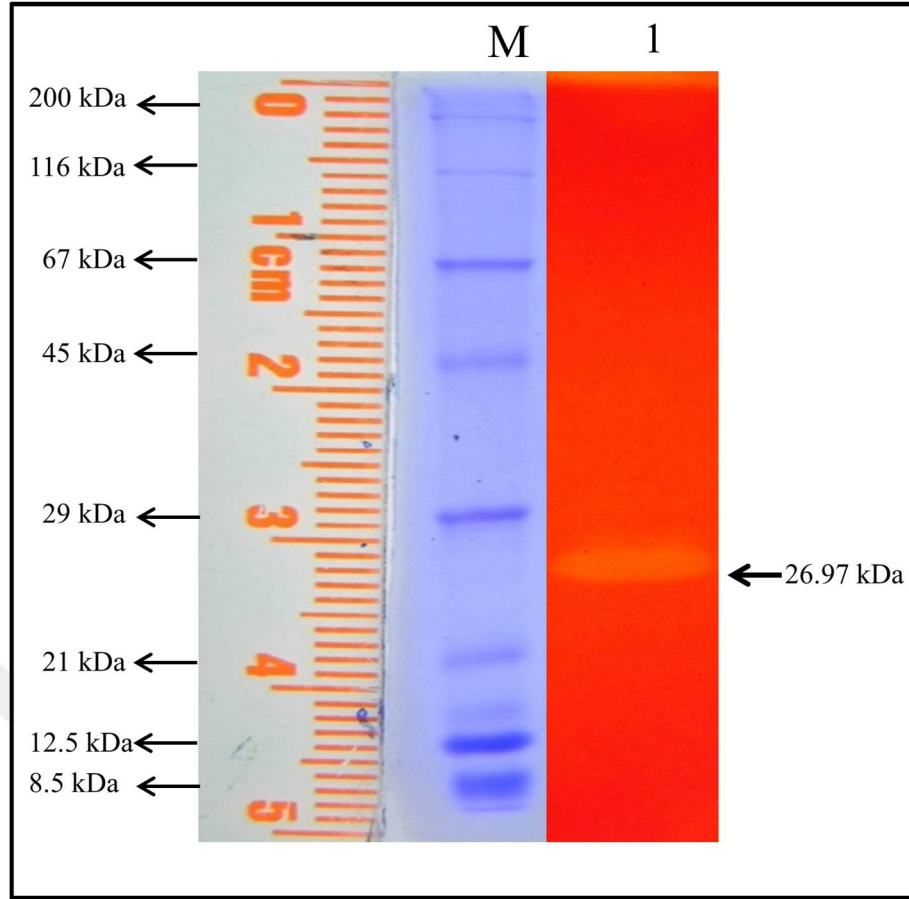


şekil 4.37. *E. coli* L1'den elde edilen Lic1A enziminin termal stabilitesi.



şekil 4.38. *E. coli* L1'den elde edilen Lic1A enziminin pH stabilitesi.

SDS PAGE ve Zimogram analizi sonucunda likenaz enziminin moleküler ağırlığı 26.97 kDa (katedilen mesafeye göre) olarak hesaplanmıştır (şekil 4.39).

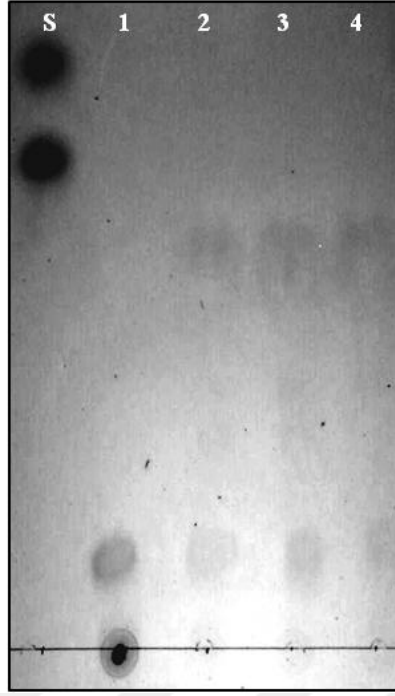


Şekil 4.39. *E. coli* L1'e ait enzim örneğinin zimogram analizi. 1: 10 µl enzim örneği. M: Protein marker (Sigma).

Literatürde yer alan birçok çalışmada likenaz geninin *E. coli*'de ifade edilmesi sonrasında elde edilen likenaz enzimlerinin moleküler ağırlıklarının 23.6 – 29.1 arasında olduğu belirtilmiştir (Kim ve ark., 2002, Teng ve ark., 2006, Furtado ve ark., 2011, Iakiviak ve ark., 2011, Sun ve ark., 2012). Çalışmamızda *B. licheniformis* RB16'dan *lic1A* geninin *E. coli* DH5'da ekspresyonu ile oluşan Lic1A likenaz enziminin moleküler ağırlığı 26.97 kDa olması, literatürle uygunluk göstermiştir.

Lic1A likenaz enziminin ince tabaka kromatografi analiz sonucuna göre likenanı selooligosakkaritlere kadar parçaladığı görülmüştür (Şekil 4.40).

Bacillus circulans ATCC21367 *bglBCI* likenaz geninin *E. coli*'de ifade edilmesiyle oluşan likenaz enziminin likenanı 3-O-β-Cellobiozil-D-glikoza kadar parçaladığı belirtilmiştir (Kim ve ark. 2002). *E. coli* L1'den ifade edilen Lic1A likenaz enziminin de likenanı hidrolize ettiği görülmektedir.



Şekil 4.40. *E. coli* L1'e ait ince tabaka kromatografi bulguları. S: standart [1 mg/ml konsantrasyonlarda glikoz ve sellobiyoz (Merck, Almanya)], 1: substrat (% 1 likenan), 2: enzim ekstraktının optimum sıcaklıkta 2 saat inkübasyonu, 3: enzim ekstraktının optimum sıcaklıkta 4 saat inkübasyonu, 4: enzim ekstraktının optimum sıcaklıkta 24 saat inkübasyonu.

4.4. Ruminant Dışısından Optimum Metagenomik DNA İzolasyon Protokolünün Belirlenmesi ve Enzim Genlerinin Taranması

4.4.1. Ruminant dışkı örnekleri

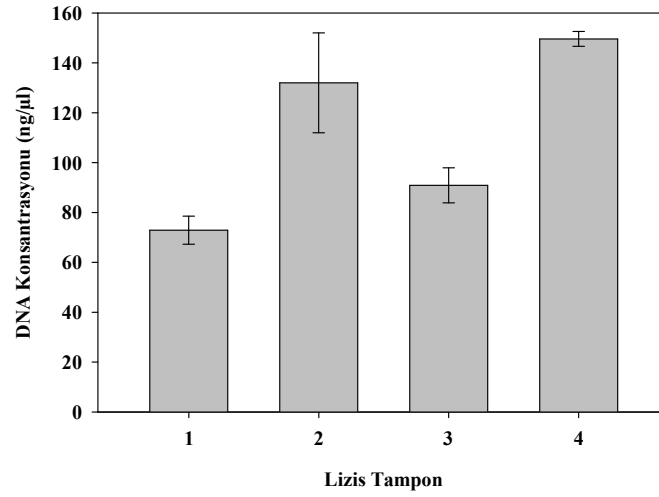
Farklı besin kaynakları ile beslenen ruminantlardan alınan dışkı örnekleri Çizelge 3.3'te verilmiştir.

4.4.2. Optimum metagenomik DNA izolasyonu

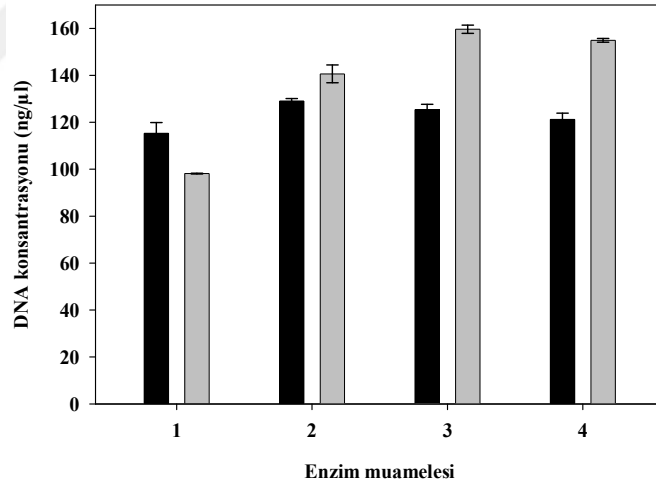
4.4.2.1. Lizis aşamasının belirlenmesi

Metagenomik DNA izolasyonu için lizis aşamasında, lizis tampon ve enzim etkisi araştırılmıştır. Lizis tamponlarda yer alan değişkenler ve bunların konsantrasyonları Çizelge 3.12'de gösterilmiştir. Değişkenler ve konsantrasyonları literatür baz alınarak belirlenmiştir (Zhou ve ark., 1996; Yu ve Morrison, 2004). Farklı lizis tamponlar kullanıldığında nanodropta ölçülen metagenomik DNA konsantrasyonları; % 1 CTAB ve 1.5 M NaCl'de 72.9 ng/μl, % 1 CTAB ve 0.5 M NaCl içerdiğinde 132 ng/μl, CTAB içermeyen ve 1.5 M NaCl içeren ortamda 90.9 ng/μl, CTAB içermeyen ve 0.5 M NaCl içeren lizis tamponda ise 149.6 ng/μl olarak ölçülmüştür (Şekil 4.41). Bütün deneyler üç tekerrürlü çalışılmıştır. DNA konsantrasyonlarına göre; CTAB içermeyen ve 0.5 M NaCl içeren lizis tampon, optimum tampon olarak belirlenmiştir.

Lizis aşamasının ilk kısmını oluşturan optimum lizis tampon belirlendikten sonra, ikinci kısım için literatürden yararlanılarak lizozim ve proteinaz K enzimleri seçilmiştir. Seçilen bu iki enzimin konsantrasyonları için ortak bir değer belirlenmeye çalışılmıştır (Bertrant ve ark., 2005; Desai ve Madamwar, 2007; Pope ve ark., 2011, Zootental ve ark., 2012) Buna göre enzimlerin konsantrasyonları 0, 1.0, 2.5 ve 5.0 mg/ml olarak seçilmiştir (Çizelge 3.13). Optimum enzim ve konsantrasyonunun belirlenmesi için lizozim ve proteinaz K ayrı ayrı çalışılmıştır. Metagenomik DNA konsantrasyonları, enzim konsantrasyon sırasına göre lizozim için 115.30, 129.10, 125.43, 121.23 ng/μl, proteinaz K için 98.15, 140.63, 157.3, 154.90 ng/μl olarak ölçülmüştür (Şekil 4.42). Bu sonuçlara göre metagenomik DNA'ların en yüksek konsantrasyonunun 2.5 mg/ml proteinaz K'da olduğu görülmüştür.



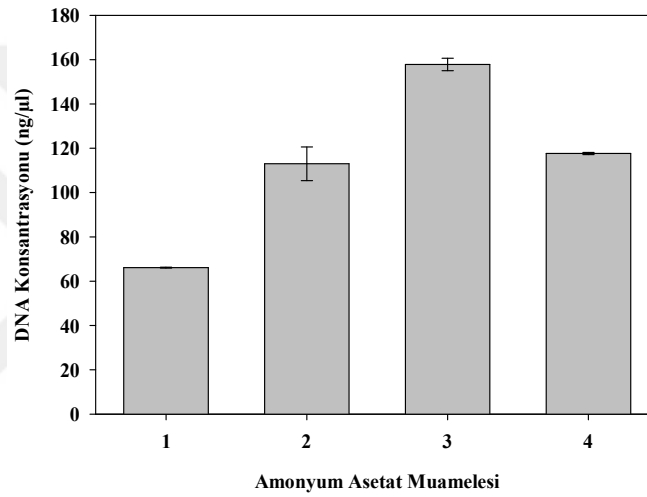
Şekil 4.41. Farklı lizis tamponlar kullanılarak belirlenen metagenomik DNA bulguları. 1-) % 1 CTAB ve 1.5 M NaCl, 2-) % 1 CTAB ve 0.5 M NaCl, 3-) CTAB içermeyen ve 1.5 M NaCl içeren ortam, 4-) CTAB içermeyen ve 0.5 M NaCl içeren lizis tampon.



Şekil 4.42. Farklı enzim ve konsantrasyonlarının uygulanmasıyla belirlenen metagenomik DNA bulguları. 1-) 0 mg/ml lizozim ve proteinaz K, 2-) 1 mg/ml lizozim ve proteinaz K, 3-) 2.5 mg/ml lizozim ve proteinaz K, 4-) 5 mg/ml lizozim ve proteinaz K. (■): Lizozim, (▨): Proteinaz K enzimlerini göstermektedir.

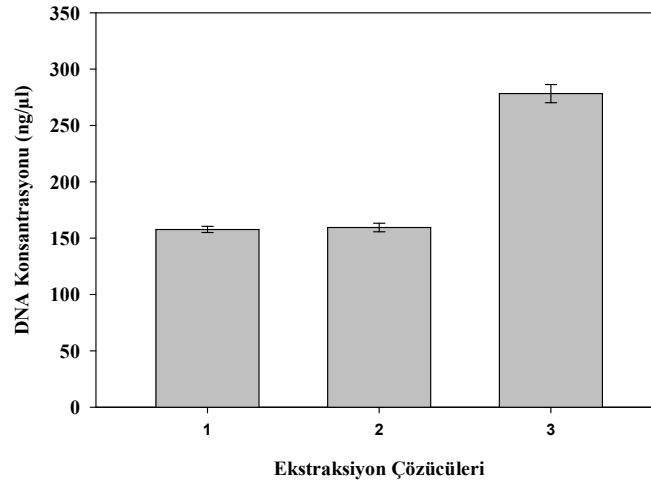
4.4.2.2. Ekstraksiyon aşamasının belirlenmesi

Metagenomik DNA izolasyonunun bu aşamadasında farklı konsantrasyonlarda amonyum asetat ve DNA'yı diğer maddelerden ayırmak için farklı çözücüler kullanılmıştır. Amonyum asetat konsantrasyonu 0, 2.5, 5, 10 M olarak belirlenmiştir (Yu ve Morrison, 2004; Miller ve ark., 1999). Çizelge 3.14'de amonyum asetat konsantrasyonları gösterilmiştir. Metagenomik DNA konsantrasyonları muamele sırasına göre 66.1, 113, 157.8, 117.63 ng/μl olarak ölçülmüştür. Dolayısıyla 5 M amonyum asetat konsantrasyonu optimum olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.43. Farklı amonyum asetat konsantrasyonlarıyla belirlenen metagenomik DNA bulguları 1-) 0 M amonyum asetat, 2-) 2.5 M amonyum asetat, 3-) 5 M amonyum asetat, 4-) 10 M amonyum asetat.

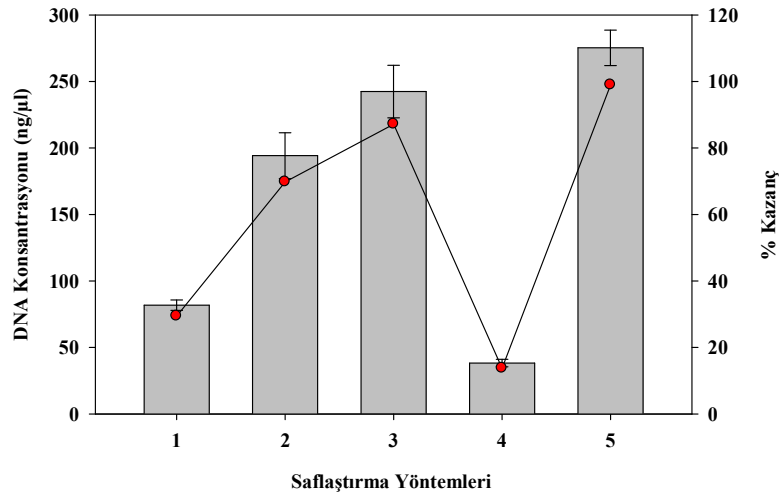
DNA'yı diğer organik maddelerden ayırmak için ekstraksiyon çözücüsü kullanılmayan, kloroform:izoamil alkol (24:1) ve fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) çözücülerini olmak üzere üç farklı muamele uygulanmıştır (Çizelge 3.15). Muameleler sırasıyla ele alındığında DNA konsantrasyonları 157.7, 159.4, 278.25 ng/μl olarak bulunmuştur (Şekil 4.44). En yüksek DNA konsantrasyonuna fenol:kloroform:izoamil alkol çözücüsünde ulaşılmıştır. Bu sebeple optimum çözücü olarak fenol:kloroform:izoamil alkol seçilmiştir.



Şekil 4.44. Farklı ekstraksiyon çözücileri kullanıldığında belirlenen metagenomik DNA konsantrasyonları 1-) Ekstraksiyon çözücüsü kullanılmayan, 2-) Kloroform:İzoamil alkol (24:1) ekstraksiyon çözücüsü, 3-) Fenol:Kloroform:İzoamil alkol (25:24:1) ekstraksiyon çözücüsü.

4.4.2.3. Saflaştırma aşamasının belirlenmesi

Saflaştırma aşamasında ticari kit kartuşları ve silika matriks metodu kullanılarak izole edilen, metagenomik DNA'ların konsantrasyonları Nanodrop'ta ölçülmüştür (Şekil 4.45). Metagenomik DNA'ların konsantrasyonları Favorgen tissue FATG 2 ticari kit kartuşu ile 81.8 ng/μl, Vivantis bacteria ticari kit kartuşu ile 194.2 ng/μl, Vivantis plant ticari kit kartuşu ile 242.45 ng/μl, I-genomic stool ticari kit kartuşu ile 38.25 ng/μl, Silika matriks metodu ile 275.3 ng/μl olarak belirlenmiştir. Saflaştırma yapmadan izole edilen metagenomik DNA ile saflaştırma sonucunda izole edilen DNA'ların % kazançları hesaplanmıştır. Saflaştırılan metagenomik DNA'ların % kazançları; Favorgen tissue FATG 2 ticari kit kartuşu 29.39, Vivantis bacteria ticari kit kartuşu ile 69.79, Vivantis plant ticari kit kartuşu ile 87.13, I-genomic stool ticari kit kartuşu ile 13.74 ve Silika matriks metodu ile 98.93 olarak belirlenmiştir. Buna göre silika matriks metodunun, saflaştırma yapılmadan izolen edilen metagenomik DNA'ya yakın bir konsantrasyonda olduğu görülmüştür.



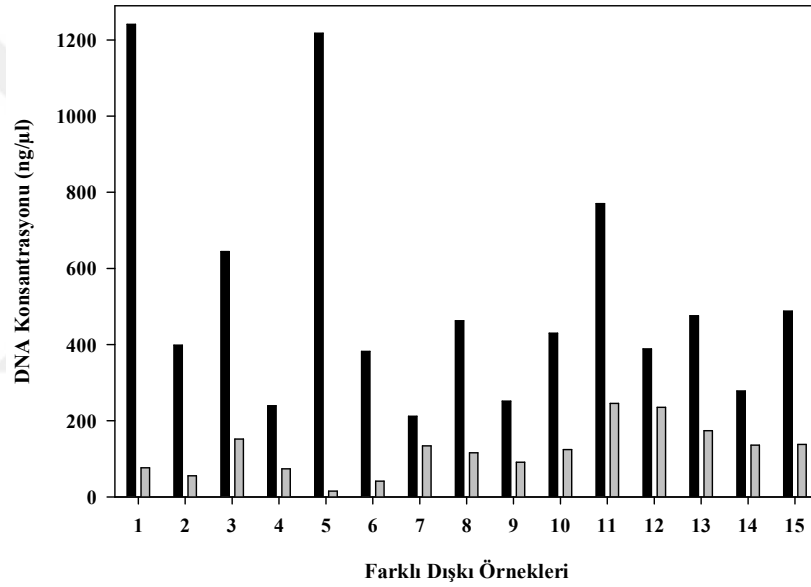
Şekil 4.45. Farklı saflaştırma yöntemleri kullanılarak izole edilen metagenomik DNA konsantrasyonları. 1-) Favorgen tissue FATG 2 ticari kit kartuşu 2-) Vivantis bacteria ticari kit kartuşu, 3-) Vivantis plant ticari kit kartuşu, 4-) I-genomic stool ticari kit kartuşu, 5-) Silika matriks metodu.

4.4.3. Farklı dışkı örneklerinden manual ve ticari kit kullanılarak DNA izolasyonu

Ruminat dışkısından optimum metagenomik DNA izolasyon protokolünün belirlenmesi için öncelikle tek dışkı örneği kullanılmıştır. DNA konsantrasyonun yoğunluğu ve PZR'nin çalışma sonucuna göre belirlenen optimum protokol ile diğer ruminant dışkı örneklerinin de (Çizelge 3.3) DNA'ları izole edilmiştir. Farklı dışkı örnekleri kullanılarak izole edilen metagenomik DNA'ların konsantrasyonları sırasıyla 1241, 398.7, 644.2, 239.3, 1217.9, 382.2, 212, 462.5, 251.4, 430.1, 770.1, 388.8, 476, 278.25 ve 487.8 ng/μl olarak belirlenmiştir (Şekil 4.46). D1 ve D5 örneklerinin DNA konsantrasyonlarının diğer örneklerin konsantrasyonlarından daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu bulgunun küçükbaş hayvan dışkısı olan D1 ve D5'in sığır dışkısından daha yoğun ve sıkılaştırılmış yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir.

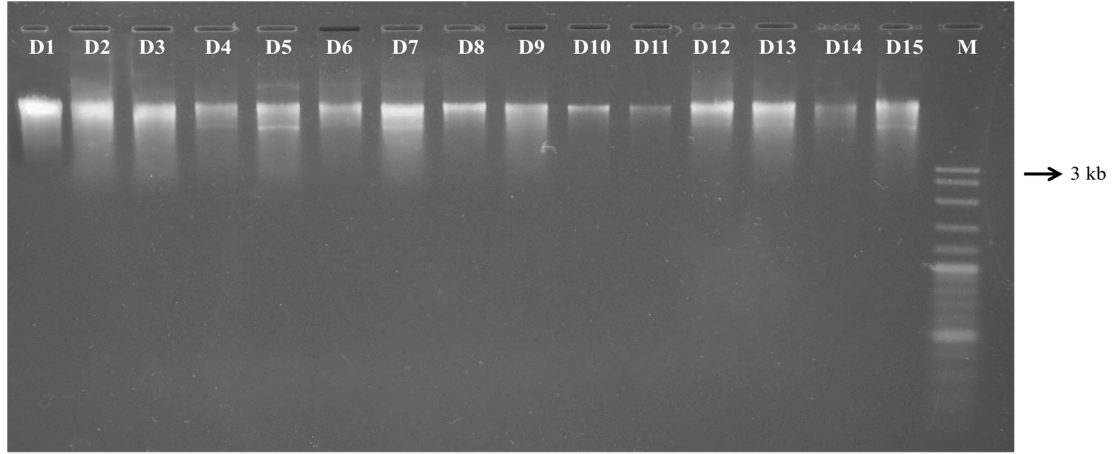
Ruminantların tükettikleri besinler sebebiyle, bu hayvanların dışkılarında sekonder metabolitler yaygın bir şekilde yer almaktadır. Sekonder metabolitler, PZR inhibisyonuna neden olabilmektedir (Espinosa ve ark., 2015). Bu sebeple literatürde metagenomik DNA izolasyonu ile yapılan çalışmalarda, dışkıdan DNA izolasyon kitlerinin kullanımı yoğunluktadır. Ancak kullanılan ticari kitler ekonomik olarak yüksek giderlere neden olabilmektedir (Zhang ve ark., 2006). Dolayısıyla, manual olarak ruminant dışkısından

izole edilen metagenomik DNA'ların optimum protokolü belirlenmek istenmiştir. Bununla beraber aynı dışkı örnekleri ticari kit kullanılarak izole edilmiş ve DNA konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Dışkıdan DNA'nın izole edilmesinde sıklıkla kullanılan QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, ABD) seçilmiştir ve üretici firmanın protokolüne uygun olarak kullanılmıştır. Ticari kit ile izole edilen DNA'ların konsantrasyonları sırasıyla 76.3, 55.3, 151.9, 73.8, 15.2, 41.6, 134.3, 115.7, 91.2, 124.3, 245.65, 235.4, 173.9, 135.9 ve 137.9 ng/μl olarak ölçülmüştür (Şekil 4.46). Manuel protokol ile izole edilen metagenomik DNA konsantrasyonlarının ticari kit kullanılarak izole edilen metagenomik DNA konsantrasyonlarından daha yüksek olduğu görülmektedir.



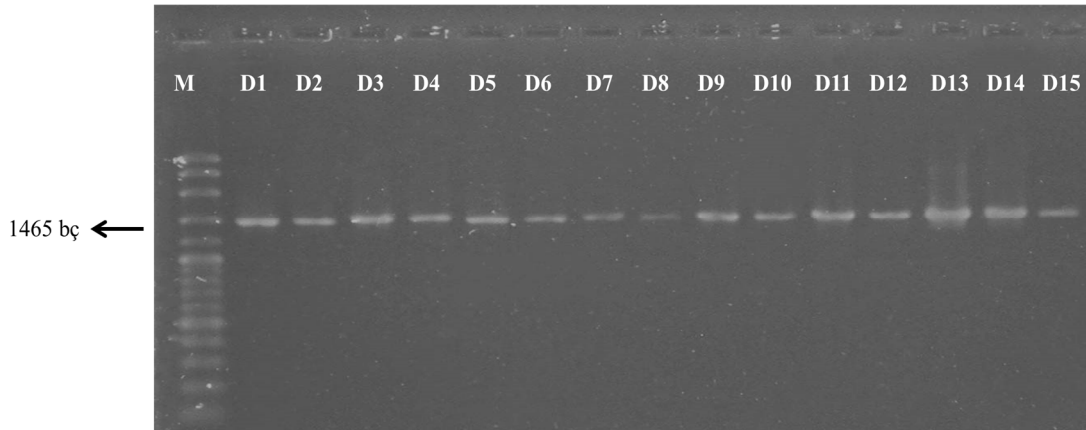
Şekil 4.46. Farklı dışkı örneklerinden manuel ve ticari kit kullanılarak izole edilen metagenomik DNA konsantrasyonları. (■): Manuel protokol, (▨): Ticari kit ile izole edilen metagenomik DNA konsantrasyonları, 1-15: D1-D15.

Toplanan farklı dışkı örnekleri ile saflaştırma aşaması yapılmadan, belirlenen optimum protokol ile metagenomik DNA'lar izole edilmiş ve Nanodrop'ta konsantrasyon ölçümü yapılmıştır. Konsantrasyonlar belirlendikten sonra metagenomik DNA'lar % 1 agaroz jelde koşturulmuştur (Şekil 4.47).



Şekil 4.47. Farklı besinlerle beslenen ruminantların dışkı örnekleri kullanılarak izole edilen metagenomik DNA'ların % 1 agaroz jeldeki görüntüsü, M: 100 bç plus DNA standardı (Vivantis) 100- 3000 bç (aşağıdan yukarıya doğru sırasıyla 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000) büyüklüğünde bantlardan oluşmaktadır.

Saflaştırma aşaması gerçekleştirilmeden izole edilen metagenomik DNA'lar kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi primerleri ile PZR yapılmıştır. PZR'nin çalışması saflaştırma aşamasının çok önemli olmadığı göstermiş ve bu aşama protokolden çıkartılmıştır. Ayrıca saflaştırma aşamasının protokol içerisinde çıkarılması, izolasyon süresini kısaltmakta ve maliyeti düşürmektedir. Şekil 4.48'de farklı metagenomik DNA'ların 16S rRNA gen bölgesi primerleri ile gerçekleştirilen PZR sonucu gösterilmiştir



Şekil 4.48. Farklı dışkı örnekleri kullanılarak izole edilen metagenomik DNA'ların 16S rRNA gen bölgesi primerleri ile gerçekleştirilen PZR. M: 100 bç plus DNA standardı (Vivantis) 100- 3000 bç (aşağıdan yukarıya doğru sırasıyla 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000) büyüklüğünde bantlardan oluşmaktadır.

4.4.4. Metagenomik DNA'larda enzim genlerinin taranması

Manuel olarak optimum protokol ile izole edilen metagenomik DNA konsantrasyonları > 200 ng/μL, saflıkları ise 1.77-1.88 arasında bulunmuştur. Metagenomik DNA dejenere primerler (Çizelge 3.17) kullanılarak PZR yapılmıştır. PZR ürünleri pGEMT-Easy vektörüne klonlanmış ve *E. coli* DH5α'ya transfer edilmiştir. Klonlama çalışmaları sonrasında 3 adet farklı gen bölgesinin nükleotid dizileri ortaya çıkartılmıştır. Bu genlerin ORF analizi yapılmış ve her genin amino asit uzunluğunun 103-114 arasında değişen tek ORF içerdiği görülmüştür. Amino asit dizilerinin BLAST programı sonucunda, bu katalitik domainler ksilanaz (*xyl*), 6-fosfofruktokinaz (*6pfk*) ve glikozid hidrolaz-3 (*gh3*) olarak tanımlanmıştır.

4.4.5. *xyl*, *6pfk* ve *gh3*'ün nükleotid ve amino asit dizisi

xyl geninin 599 baz çiftlik dizisi içerisinde tek ORF yer almaktadır. ORF nükleotid dizisi kullanılarak 109 amino asit içeren sekans Şekil 4.49'da verilmiştir.

```
1   cttcaaggctgaatggagtgacagctgttaac-----
269 atg gta acc atc gat ggt gca caa tat aag att ttc caa atg gat
    M  V  T  I  D  G  A  Q  Y  K  I  F  Q  M  D
314 cac act ggt cca act atc aat ggt ggt aat gaa acc ttc aag caa
    H  T  G  P  T  I  N  G  G  N  E  T  F  K  Q
359 tac ttc agt gtc cgt caa caa aag aga act tct ggt cat att act
    Y  F  S  V  R  Q  Q  K  R  T  S  G  H  I  T
404 gta tca gat cac ttt aag gca tgg gcc aat caa ggt tgg ggt att
    V  S  D  H  F  K  A  W  A  N  Q  G  W  G  I
449 gga aac ctc tat gaa gtt gca ttg aac gca gaa ggt tgg caa agt
    G  N  L  Y  E  V  A  L  N  A  E  G  W  Q  S
494 agt ggt gtc gct gac gtc acc aag ttg gat gtc tac acc acc aaa
    S  G  V  A  D  V  T  K  L  D  V  Y  T  T  K
539 caa ggt tct gct cct cgt act acc acc acc act acc cgt act act
```

Q G S A P R T T T T T T R T T
584 acc cgt act act aca a
T R T T T

Şekil 4.49. *xyl* geninin nükleotid ve amino asit dizisi.

Xyl'nin amino asit dizisi BLAST programı kullanılarak belirlenmiş ve bu dizi uncultured fungus beta-ksilanaz (AQU14338.1) ve uncultured Neocallimastigales ksilanaz R8 (AAY18781.1) ile % 99, *Orpinomyces* sp. PC-2 ksilanaz (AAD04194.1) ile % 98 benzerlik göstermiştir. Xyl dizisinin “glikozil hidrolaz 11” ailesinde yer aldığı belirlenmiştir. Wang ve ark. (2011), kültürden bağımsız moleküler yaklaşımları kullanarak elde ettikleri ksilanazların büyük bir kısmının GH11 ailesinde olduğunu bildirmiştir.

6pfk geninin 525 baz çiftlik dizisi ortaya çıkartılmıştır. Tek ORF içeren bu genin nükleotid dizisi kullanılarak 114 amino asit içeren dizisi Şekil 4.50’de gösterilmiştir.

1 ttccagtcacgacggttgtaaaacgacggc-----
132 atg aat gct gct atc aga gca gta gtg aga gtt gcg gca tat cac
M N A A I R A V V R V A A Y H
177 gga atc cgt gtt atg ggt gtt aaa aga gga tat aac ggc ctc ata
G I R V M G V K R G Y N G L I
222 aat ggt gat ctt tta gaa atg aat gct aga agt gta tct gat ata
N G D L L E M N A R S V S D I
267 ctt caa aga ggc gga aca gct ctt tat aca gcg cgc tgt ctt gag
L Q R G G T A L Y T A R C L E
312 ttc aag gag cct gca ggt gtt aaa aag gct gtt ggt gta gca aag
F K E P A G V K K A V G V A K
357 gtt ttc gga ctg gac ggt ctt gtt gta atc ggt ggt gac ggt cca
V F G L D G L V V I G G D G P
402 atc act agt gaa ttc gcg gcc gcc tgc agg tcg acc ata tgg gag
I T S E F A A A C R S T I W E

447 agc tcc caa cgc gtt gga tgc ata gct tga gta ttc tat agt gtc
 S S Q R V G C I A
 492 -----aatcatgggtcatagtg

Şekil 4.50. *6pfk* geninin nükleotid ve amino asit dizisi.

6Pfk'n amino asit dizisi BLAST programı yardımıyla belirlenmiş ve gen bankasında yer alan *Firmicutes bacterium* CAG:41 (CDB96935.1)'e ait 6-fosfofruktokinaz geni ile % 81 oranında homoloji göstermiştir.

gh3 geninin 455 baz çifti büyüklüğünde olduğu belirlenmiştir. Bu genin ORF nükleotid dizisi ve bu dizinin kullanımıyla 103 amino asit içeren sekansı Şekil 4.51'de gösterilmiştir.

455 gaaacagctatgaaacagctatgaccatgattacgcc----

311 atg aat atg gaa ggc att aca gaa tac tgg act ccg gag cag gcg
 M N M E G I T E Y W T P E Q A

266 gta atc aac gcc atc aat gcc ggt gtg gat atg atc tgc atg cct
 V I N A I N A G V D M I C M P

221 tgc tct gta caa tgt cct gag gaa ctg gag gat ctg gag cac atc
 C S V Q C P E E L E D L E H I

176 att gat gcg gtt atg aca gcg gtg gaa acc ggt gcc atc tcc cag
 I D A V M T A V E T G A I S Q

131 cag cgg gcg gat gat gaa tcg aat tcc cgc ggc cgc cat ggc ggc
 Q R A D D E S N S R G R H G G

86 cgg gag cat gcg acg tcg ggc cca att cgc cct ata gtg agt cgt
 R E H A T S G P I R P I V S R

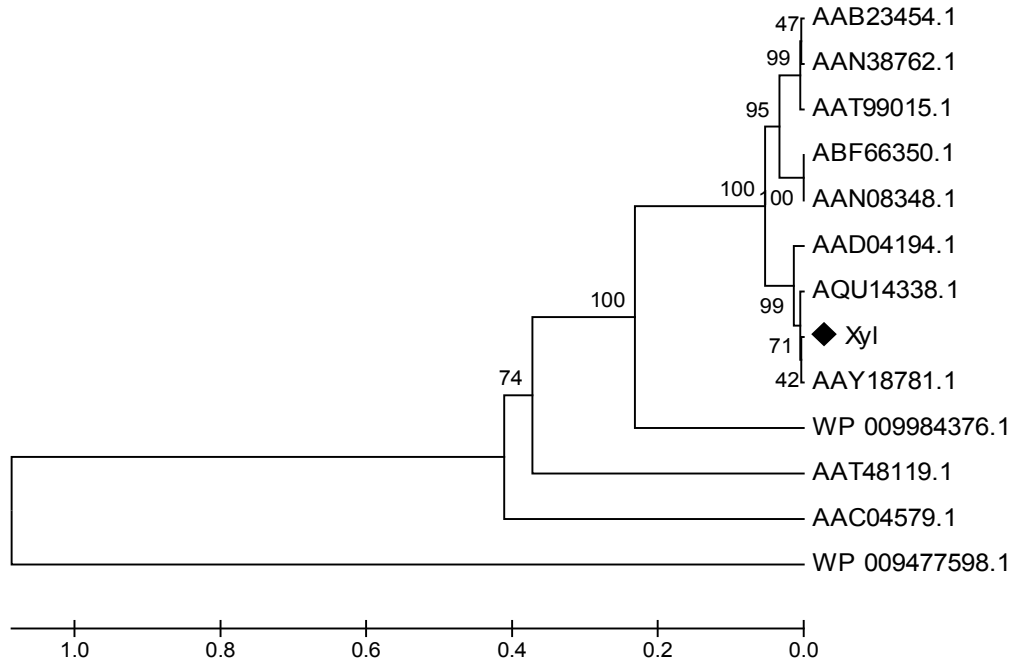
41 att aca att cac tgg ccg tcg ttt tac aac gtc gtg act gg
 I T I H W P S F Y N V V T

Şekil 4.51. *gh3* geninin nükleotid ve amino asit dizisi.

Gh3 amino asit dizisi geni BLAST programı kullanılarak rapor edilmiş ve *Triticum macha* putative puroindoline b protein (CAQ43070.2)'e % 59 oranında benzer bulunmuştur.

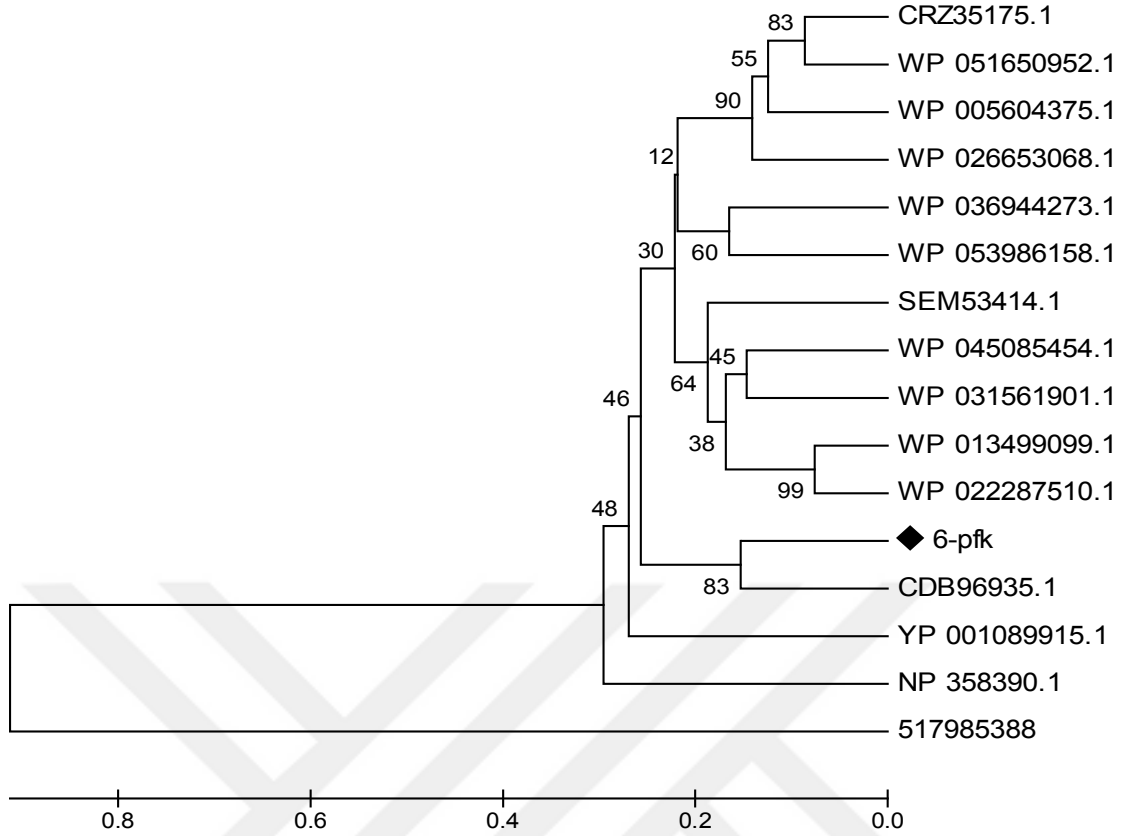
4.4.6. Metagenomik DNA'ların filogenetik analizi

Ruminant dışkı örneklerinden izole edilen metagenomik DNA'a ait *xyl* geninin sekansı ve bu sekansa göre NCBI'dan seçilen ksilanaz genleri ile filogenetik analiz yapılmış ve Şekil 4.52'de *xyl*'nin diğer genlerle genetik yakınlığı gösterilmiştir. Referans olarak *Rhodococcus* sp. JVH1 3-ketosteroid-9- α hidroksilaz oksijenaz (WP_009477598.1) seçilmiştir. *Neocallimastix patriciarum* ksilanaz A (AAB23454.1), *Piromyces* sp. RRY-2002 ksilanaz (AAN38762.1) ve *Neocallimastix frontalis* ksilanaz (AAT99015.1) genleri bir grup oluşturmuştur. *N. frontalis* (ABF66350.1) ve *N. Patriciarum* (AAN08348.1) ksilanazları genetik olarak yakın bulunmuş ve bu iki kolun birbiriyle bağlantısı görülmüştür. *xyl* geninin, uncultured fungus β -ksilanaz (AQU14338.1) ve uncultured Neocallimastigales ksilanaz R8 (AAY18781.1) ile genetik olarak yakın olduğu, bu gruba en yakın ksilanaz geninin *Orpinomyces* sp. PC-2 (AAD04194.1) olduğu görülmüştür. *R. flavefaciens* glikozid hidrolaz ailesi proteini (WP_009984376.1), *R. albus* 8 ksilanaz (AAT48119.1), *R. thermocellum* ksilanaz U (AAC04579.1) genleri ise ayrı kollarda yer almaktadır.



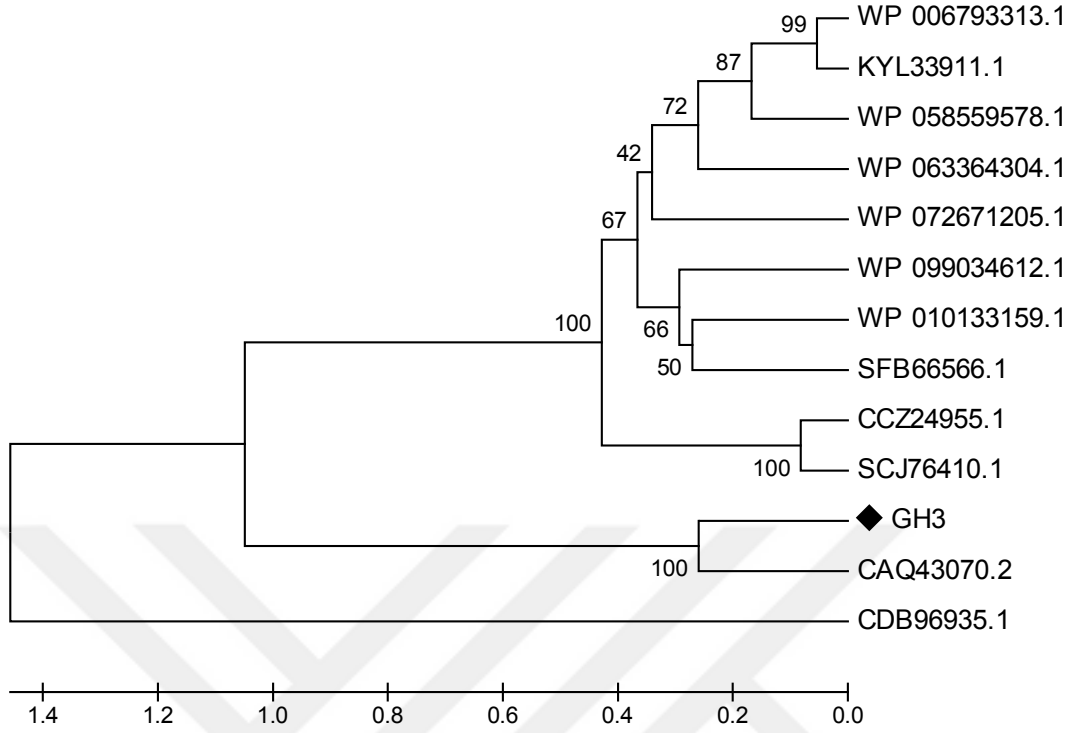
Şekil 4.52. *xyl*'nin seçilen ksilanaz genleri ile birlikte filogenetik ağacı. Bu filogenetik ağaç MEGA programı kullanılarak UPGMA yöntemiyle elde edilmiştir.

Metagenomik DNA'a ait *6pfk*'nın dizisi ve bu dizi kullanılarak NCBI'dan belirlenen 6-fosfofruktokinazlar ile filogenetik analizi yapılmıştır. Şekil 4.53'de ve *6pfk*'nın seçilen genlerle genetik yakınlığı gösterilmiştir. *Bacillus massiliosenegalensis* α -glukozidaz (517985388) referans olarak belirlenmiştir. *Herbinix hemicellulosilytica* (CRZ35175.1) ve *Lachnoclostridium phytofermentans* (WP_051650952.1) 6-fosfofruktokinazları bir grup içerisinde yer almıştır. *Butyrivibrio crossotus* 6-fosfofruktokinaz (WP_005604375.1) bu grup ile genetik yakınlık göstermiştir. *Butyrivibrio proteoclasticus* 6-fosfofruktokinaz (WP_026653068.1)'ın ise bu grup ile bağlantılı olduğu ortaya çıkmıştır. *Pseudobacteroides cellulosolvens* (WP_036944273.1) ve *Lachnospiraceae bacterium* mt14 (WP_053986158.1) 6-fosfofruktokinazları genetik olarak yakın bulunmuştur. *Clostridium cellulosi* (WP_045085454.1) ve *R. flavefaciens* (WP_031561901.1) 6-fosfofruktokinazları kendi arasında bir yakınlık gösterirken, *R. albus* (WP_013499099.1) ve *Ruminococcus bicirculans* (WP_022287510.1) 6-fosfofruktokinazları da ayrı bir grup oluşturmuştur. Bu iki grubun *Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans* 6-fosfofruktokinaz (SEM53414.1) ile bağlantılı olduğu görülmüştür. Metagenomik DNA'ya ait olan *6pfk* ve *Firmicutes bacterium* CAG:41 6-fosfofruktokinaz (CDB96935.1) genetik olarak yakınlık göstermiştir. *Clostridioides difficile* 630 6-fosfofruktokinaz (YP_001089915.1) ve *Streptococcus pneumoniae* R6 6-fosfofruktokinaz (NP_358390.1) ise ayrı dallarda belirlenmiştir.



Şekil 4.53. *6pfk*'nın seçilen 6-fosfofruktokinaz genleri ile birlikte filogenetik ağacı. Bu filogenetik ağaç MEGA programı kullanılarak UPGMA yöntemiyle elde edilmiştir.

gh3 geninin sekansı ve bu sekansın kullanımıyla NCBI'dan seçilen genlerin filogenetik analiz yapılmıştır (Şekil 4.54). *Firmicutes bacterium* CAG:41 6-fosfofruktokinaz (CDB96935.1) referans olarak seçilmiştir. Metagenomik DNA'ya ait olan *gh3* ve *Triticum macha* putative puroindoline b protein (CAQ43070.2) genetik olarak yakınlık göstermiştir. *Alteromonadales bacterium* TW-7 (WP_006793313.1) ve *Pseudoalteromonas telluritireducens* (KYL33911.1) glikozil hidrolaz 3 bir grup meydana getirmiştir. *Pseudoalteromonas* sp. H105 glikozil hidrolaz 3 (WP_058559578.1), *Pseudoalteromonas luteoviolacea* glikozil hidrolaz 3 (WP_063364304.1) ve *Vibrio* sp. M12-1144 beta hekzosaminidaz (WP_072671205.1)'ın bu grupta yakınlığı belirlenmiştir. *Microbulbifer agarilyticus* beta hekzosaminidaz A (WP_010133159.1) ve *Microbulbifer thermotolerans* beta-N-asetil heksozaminidaz (SFB66566.1) kendi aralarında bir grup oluşturmuştur. *Lacimicrobium alkaliphilum* glikozil hidrolaz 3 (WP_099034612.1)'ün bu grupta bağlantısı belirlenmiştir. *Coprobacillus* sp. CAG:235 glikozil hidrolaz 3 N-terminal domain protein (CCZ24955.1) ve uncultured *Clostridium* sp. beta hekzosaminidaz (SCJ76410.1)'ın genetik olarak yakın olduğu görülmüştür.



Şekil 4.54. *gh3*'ün NCBI'dan seçilen genlerle birlikte filogenetik ağacı. Bu filogenetik ağaç MEGA programı kullanılarak UPGMA yöntemiyle elde edilmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Rumen mikroorganizmaları ruminant hayvanlar için sağlık ve enerji açısından eşsiz öneme sahiptir (Russell ve ark., 2009). Ruminant hayvanların midelerinin büyük kısmını oluşturan rumenleri içerisinde milyarlarca mikroorganizma yaşayabilmekte ve bunun en büyük popülasyonunu rumen bakterileri oluşturmaktadır (Bekele ve ark., 2010). Rumen bakterilerinin birçoğu obligate anaerobtur (Koike ve Kobayashi, 2009). Dolayısıyla rumen bakterilerinin izole edilmesi, saflaştırılması ve stoklanması anaerobik ortamlarda gerçekleştirme zorunluluğu vardır. Ancak anaerobik izolasyon çalışmalarının zor olması, emek ve zaman alması rumen bakterilerinin kültür koleksiyonunun oluşturulmasını güçleştirmektedir. Bu sebeple çalışmamızın ilk aşamasında Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda ruminal kökenli bakterilerin kültür koleksiyonunun oluşturulmasına katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Kültür koleksiyonu için, Kahramanmaraş İli'nin farklı yerlerinden 50 adet rumen içeriği ve sıvısı ve 15 adet dışkı örneği kullanılarak 154 izolat elde edilmiştir. Bu çalışmada 15 izolatın kaydı yapılmıştır. İzole edilen bakteriler ileride yapılacak çalışmalar için büyük bir kaynak oluşturabilecektir. Ayrıca kültür koleksiyonunun oluşturulması için Türkiye'nin farklı yerlerinden toplanabilecek rumen içeriği, rumen sıvısı ve dışkı örneklerinden de izolasyon çalışmalarına başlanması ve devam ettirilmesi için temel teşkil edecektir.

Çalışmada izole edilen suşlar 16S rRNA metodu kullanılarak tanımlanmıştır. Bu metot ile kültüre dayalı tanımlama metotlarına gerek duyulmadan daha ileri bir bilgi sağlanmaktadır. 16S rRNA metodu bakterilerin hızlı bir şekilde tanımlanmasında ve çeşitliliğinin değerlendirilmesinde güçlü bir metot olarak gösterilmektedir (Leng ve ark., 2012).

Rumen içerisindeki mikroorganizmaların parçalanmasında çok farklı enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır (Cheng ve ark., 2012). Rumen mikroorganizmaları tarafından üretilen çok sayıda enzimin biyoteknolojik potansiyelinin olduğu bilinmektedir (Zhao ve ark., 2010). Bu kapsamda rumen bakterilerinin enzim genlerinin izolasyonu, klonlanması ve karakterize edilmesi yönünde bilimsel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısıyla tez içerisinde izolasyon, klonlama ve karakterizasyon çalışmaları önemli bir kısmı oluşturmaktadır.

İzole edilen *S. bovis* RB4 ve *B. licheniformis* RB16 izolatlarıyla ayrı ayrı çalışılmıştır. *S. bovis* RB4'ten elde edilen 1640 bp büyüklüğündeki *amy1A* geni pGEM-T Easy plazmidine klonlanmış ve CaCl₂ metodu ile *E. coli* DH5 α 'ya transforme edilmiştir. Transformantlar içerisinde nişasta/agaroz plakları ile büyük zon veren koloniler seçilerek saflaştırma yapılmış ve yüksek aktiviteye sahip *E. coli* A1 oluşturulmuştur. Rekombinant hücreye aktarılan pGEMTA1 plazmidinde *amy1A* geninin klonlandığı doğrulanmıştır. *amy1A* geni iki ORF içermektedir. Her iki ORF'den de primerler tasarlanmış ve klonlama çalışmaları sonunda aktivitelerinin olmadığı görülmüştür. Dolayısıyla bu iki ORF tek başlarına aktiviteye sahip değilken, birbirlerini tetikleyerek aktivite oluşturdukları düşünülmüştür.

amy1A geninin ürünü olan Amy1A amilaz enziminin hücresel aktivite gösterdiği görülmüştür. Amy1A enziminin optimum sıcaklığı 40 °C olarak bulunmuştur. Bu enzim 30 °C'de % 93.85, 35 °C'de % 98.91 ve 45 °C'de % 92.29 aktivite göstermiştir. Amy1A 10 °C'de % 56.52, 50 °C'de % 78.89 aktivite yüksek bir aktivite gösterirken 10°C ile 50°C arasında endüstriyel olarak kullanılabilirliğini ortaya koymuştur. Ancak Amy1A amilaz enzimi 60 °C sıcaklıkta % 83.35 oranında aktivite kaybı göstermiştir. Dolayısıyla elde edilen amilaz enzim aktivitesinde sıcaklık aralığının genişliği dikkat çekmektedir. Literatürde 45 °C ve 60 °C'den yüksek sıcaklıklarda amilaz aktivitesinin kaybolmaya başladığı ile ilgili farklı çalışmalar mevcuttur (Satoh ve ark., 1997; Matsui ve ark., 2007).

Amy1A enziminin optimum aktivitesi pH 7.5'da görülmesine rağmen pH 9.5'te % 73.68'aktivite ile aynı zamanda alkali tabiatlı olduğunu ortaya koymuştur. Rapor edilen *S.bovis* kaynaklı klonlanan amilaz enzimlerinin bir çoğu pH 8.0'den daha alkali değerlerde aktivitesini kaybederken (Satoh ve ark., 1997) Amy1A enzimimiz alkali tabiatıyla literatürde yerini alacaktır. Bu sebeple Amy1A'nın geniş pH aralığında aktivite göstermesi, endüstriyel açıdan kullanılabilir bir enzim adayı olabileceğini göstermektedir.

Amy1A'nın termal stabilitesinin 60 dk ön inkübasyonda 50 °C ye kadar % 80'in üzerinde kalan aktivite sergilediği, pH stabilitesinin ise maksimum kalan aktivitesininin 15 dk ön inkübasyon ile pH 7.5 olarak tespit edildiği görülmüştür.

Amilaz enziminin SDS-PAGE elektroforezde 31.30 kDa'lık moleküler ağırlıkta olduğu bulunmuştur. İnce tabaka kromatografisinde Amy1A enziminin nişastayı 15 dk inkübasyonda dahi glikoza kadar hidrolize ettiği sonucuna ulaşılmıştır. Literatürde hücresel

amilaz enzimlerinin maltooligosakkaritlere kadar parçalandığı görülmüştür (Cotta ve Whitehead, 1993).

B. licheniformis RB16 genomik DNA'sı kullanılarak, tasarlanan likenaz primerleri ile PZR yapılmış ve 650 bp uzunluğunda *lic1A* geni amplifiye edilmiştir. *lic1A* geni, *amy1A* geninde olduğu gibi pGEM-T Easy plazmidine klonlanarak *E. coli* DH5α'ya aktarılmıştır. *E. coli* L1 adı verilen hücreden plazmit izolasyonu yapıp *lic1A* geninin varlığı kontrol edilmiş ve klonlamanın gerçekleştiği görülmüştür. *lic1A* geni tek ORF içermektedir. Lic1A likenaz enzimi, birçok likenazın da yer aldığı GH16 ailesi içerisinde yer almaktadır.

Lic1A enziminin hücresel aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bu enzimin optimum sıcaklığına 45 °C'de ulaşılmıştır. Bu değer literatürle birebir uyumluluk göstermektedir (Kim ve ark., 2002). Enzim 40 °C'de % 86.01, 35 °C'de % 65.90, 30 °C'de % 43.87 ve 25 °C'de % 31.67 aktivitesini devam ettirmiştir. Likenaz enzimi optimum sıcaklığın üstündeki sıcaklıklarda da aktivitesini korumuştur. Lic1A 50 °C'de % 75.33, 55 °C'de % 62.23 ve 60 °C'de % 25.16 aktivite göstermiştir. Enzimin 25 °C ve 60 °C arasında ortalama % 61.27 aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Lic1A'nın maksimum aktivitesine pH 7.5'de ulaşılmıştır. Literatürde likenaz enzimlerinin optimum aktivitesinin daha asidik olduğu belirlenmiştir (Furtado ve ark., 2011). Enzim 7.0 ve 8.0 pH değerlerinde sırasıyla 77.48 ve 75.04, 6.5 ve 8.5 pH değerlerinde ise sırasıyla 66.14 ve 64.74 aktivite göstermiştir. Enzimin pH 5.0 ve 5.5'te ortalama % 36.91, pH 4.5 ve 9.5'te ise ortalama 27.22 aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Lic1A likenaz enzimi pH 6.0 ve 9.0'da ortalama % 68.48 aktivite göstermiştir.

Lic1A'nın termal stabilitesinin saptanması için, enzim 35 - 75 °C sıcaklıklarda 60 dk ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyon sonunda, enzim 35 °C'de % 78.31, 45 °C'de % 46.03 ve 55 °C'de % 36.77 kalan aktivite göstermiş, 65 °C aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Likenaz enziminin pH stabilitesinin belirlenmesinde, enzim pH 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 ve 9.5 tampon çözeltilerde 15 dk ön inkübasyona bırakılmıştır. Enzim pH 6.5'te % 69.87 kalan aktivite sergilemiştir. pH 8.5 değerinde % 53.82, pH 4.5 ve 9.5'te ortalama % 17.77 kalan aktivitesi göstermiştir.

Lic1A likenaz enziminin SDS-PAGE elektroforezdeki büyüklüğü 26.97 kDa olarak bulunmuştur. Bu değerin literatüre uyum içerisinde olduğu görülmüştür

(Iakiviak ve ark., 2011, Sun ve ark., 2012). Lic1A'nın ince tabaka kromatografisi sonucuna göre likenanı parçaladığı belirlenmiştir.

Metagenomik, çevreden direk elde edilen materyalin genomünün çalışılmasını içeren bir yaklaşımdır. Kültüre bağlı yöntemlere alternatif olarak ortaya çıkan metagenomik ile daha kesin bir sonuç sağlanabilmektedir (Su ve ark., 2012). Metagenomiğin en temel kısmını kaliteli bir DNA'nın izolasyonu oluşturmaktadır. Ancak metagenomik DNA'nın çevresel kaynaklardan direk izole edilmesi, izolasyonda sorunlar ile karşılaşılabilceğini göstermektedir (Morita ve ark., 2007).

Ruminant dışkısı kullanılarak optimize metagenomik DNA izolasyon protokolünün belirlenmesi için lizis, ekstraksiyon ve saflaştırma aşamaları ayrı ayrı çalışılmıştır. Buna göre, lizis tamponunda CTAB'ın belirgin etkisinin olmadığı ve 0.5 M NaCl'nin DNA verimini arttırdığı görülmüştür. Enzimatik muamelede ise proteinaz K'nın DNA verimini arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Amonyum asetatın 5 M konsantrasyonu, daha fazla DNA elde edilmesini sağlamış, DNA ekstraksiyonunda kullanılan çözücülere ise fenol ilavesi olumlu sonuç vermiştir. Optimize edilen protokol, farklı ruminant dışkılarından da yüksek miktarda DNA elde edilmesini sağlamıştır. Vivantis Bacteria ve Plant Genomic DNA Isolation ticari kitlerinin kartuşları kullanılarak gerçekleştirilen saflaştırma aşamasında, DNA konsantrasyonundaki kaybın az olduğu ortaya konmuştur. Silika matriks kullanılarak yapılan saflaştırma aşamasında DNA konsantrasyonu > % 80 olduğu görülmüştür. Dolayısıyla bu aşamanın ticari kitler ile kıyaslandığında oldukça ucuz bir metot olması, silika matriks ile saflaştırma aşamasının uygun olduğunu düşündürmektedir.

Ruminant dışkı örneklerinin yapısının heterojen ve kompleks yapıda olması, optimum DNA izolasyon protokolünün belirlenememesine sebep olduğu bildirilmektedir (Salonen ve ark., 2010). Dolayısıyla dışkı örneklerinden DNA izolasyonunda ticari kitler sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışmamızda, manual olarak izole ettiğimiz DNA'ların konsantrasyonları ile dışkıdan DNA'nın izole edilmesinde yaygın olarak kullanılan QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Valencia, ABD) karşılaştırılmıştır. Ticari kit ile izole edilen DNA'ların konsantrasyonlarının manual olarak izole edilenlerden daha düşük olduğu görülmüştür.

Metagenomikte mikroorganizmaların genomlarının klonlanması ve direk izolasyonu ile toplam genetik bilginin değerlendirilmesi mümkün olabilmektedir (Uchiyama ve Miyazaki, 2009). Aynı zamanda yeni enzim genlerinin keşfedilmesine olanak sağlamaktadır. Çalışmada pGEMT-Easy vektörüne klonlanan enzim genlerinin

(ksilanaz - *xyl*, 6-fosfofruktokinaz - *6pfk* ve glikozid hidrolaz-3 – *gh3*) NCBI’da bugüne kadar keşfedilen enzim genleri ile % 59 - 99 arasında homolog olduğu görülmüştür.

Elde edilen tüm verilerden yola çıkılarak aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

- Rumen bakteri kültür koleksiyonunun oluşturulmasına başlanmıştır. Bu kapsamda farklı besiyerleri ve karbon kaynakları kullanılarak farklı rumen içerikleri, rumen sıvıları ve dışkı örnekleri ile izolasyon çalışmalarına devam edilmesi yeni türlerin elde edilmesine imkan sağlayabilir. Ülkemizin farklı bölgelerinden izole edilecek rumen bakterilerinin biyoçeşitlilik açısından önemi büyük olacaktır. Bunun yanında literatüre katkısının da fazla olacağı düşünülmektedir.
- *S. bovis* RB4’ten klonlanan *amy1A* geni *E. coli* DH5α’ya transforme edilmiş ve yüksek amilolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.
- Amilaz enzimin iki farklı gen bölgesine sahip olduğu görülmüştür. Bu enzimin gen bölgeleri ayrı ayrı amilolitik aktivite göstermemiştir. Dolayısıyla iki farklı gen bölgesinin birbirini tetikleyerek amilaz aktivitesi oluşturduğu düşünülmüştür.
- Amy1A enziminin yüksek amilolitik aktivite göstermesi, sıcaklık değerlerindeki aktivite aralıkların geniş olması, alkali pH’larda aktivitesini devam ettirmesi ve nişastayı kısa sürede glikoza kadar hidrolize etmesi sebebiyle önemli bir yere sahip olacağı düşünülmektedir. Amy1A’nın enzimatik özellikleri unlu mamül sanayii için ideal bir özelliktir. Ayrıca nişastadan glikoz şurubu üretimi ve etanol üretimi için de güzel bir kaynak olabileceği görülmüştür. Ayrıca Amy1A amilaz enziminin hayvancılık sektöründe de kullanılabilirliği söz konusudur.
- *B. licheniformis* RB16’dan klonlanan *lic1A* geni *E. coli* DH5α’ya aktarılmış ve likenaz aktivitesi göstermiştir. Lic1A likenaz enziminin yüksek sıcaklıklara kadar aktivitesini devam ettirmesi ve likenanı parçalaması endüstriyel bir aday olabileceğini düşündürmektedir.
- Ruminant dışkı örneklerinden ekonomik, yaygın olarak kullanılabilir, DNA konsantrasyonu yüksek optimum metagenomik DNA izolasyon protokolü belirlenmeye çalışılmıştır. Optimum lizis, ekstraksiyon ve saflaştırma aşamalarını saptamak için birçok parametre denenmiştir. Sonuçta saflaştırılmadan izole edilen metagenomik DNA’ların çeşitli seyreltmeleri ile yapılan PZR’leri sonuç vermiştir. Bu durum saflaştırma aşamasına gerek olmayabileceğini ve protokolün metagenomik çalışmaların başlangıcında kullanılabilirliğini göstermektedir.

- Optimize DNA izolasyon protokolünün belirlenmesi ile ticari kitlelere olan bağımlılık azalacak, ülke kaynaklarının kullanımını artacak ve ülke ekonomisinin gelişmesine katkıda bulunulacaktır.
- Ruminantların dışkı örneklerinden başka farklı organizmaların dışkı örnekleri kullanılarak optimize edilen metagenomik DNA izolasyon denemelerin yapılması gerçekleştirilebilir.
- Metagenomik çalışmalarda elde edilen genlerin ürünü olan enzimlerin karakterizasyonunun yapılması literatüre önemli bir katkı sağlayabilecektir.



KAYNAKLAR

- Abdulmir, A.S., Hafidh, R.R., Bakar, F.A. 2011. The Association of *Streptococcus bovis/gallolyticus* with Colorectal Tumors: The Nature and the Underlying Mechanisms of its Etiological Role. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30 (11): 1-13.
- Adıgüzel, A.O. 2013. Biyoetanolün Genel Özellikleri ve Üretimi için Gerekli Hammadde Kaynakları. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2 (2): 204-220.
- Agarwal, N., Kamra, D.N., Chaudhary, L.C. 2015. Rumen Microbial Ecosystem of Domesticated Ruminants. In Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution (Editörler: Puniya, A.K., Singh, R., Kamra, D.N.). Springer, India. s.17-30.
- Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B. 2011. Biomass Pretreatment: Fundamentals Toward Application. *Biotechnology Advances*, 29 (6): 675-685.
- Akin, D.E., 1993. Plant Structure and Chemistry – Influence on Lignocellulose Degradation by Rumen Protozoa, Bacteria, and Fungi. In: Genetics, Biochemistry, and Ecology of Lignocellulase Degradation. (Editörler: Shimada, K., Ohmiya, K., Kobayashi, Y., Hoshino, S., Saka, K., Karita, S.). Tokyo, Japan.
- Akin, D., Borneman, W., Windham, W. 1988. Rumen Fungi: Morphological Types from Georgia Cattle and the Attack on Forage Cell Walls. *Biosystems*, 21: 385–391.
- Alataş, M.S., Umucalılar, H.D. 2011. Rumenin Mikrobiyel Ekosistemindeki Bakteriler ve Roller. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6 (1): 71-83.
- Al Emery, A.J.A., Yousif, A.A., Al-Hilaly, H.A. 2013. Isolation and Characterization of *Streptococcus bovis* from Rumen Content of Awassi Sheep in Iraq. *AL-Qadisiya Journal of Veterinary Medicine Sciences*, 12 (1): 44-51.
- Aluwong, T., Wuyep, P. A., Allam, L. 2013. Livestock-Environment Interactions: Methane Emissions From Ruminants. *African Journal of Biotechnology*, 10 (8): 1265-1269.
- Atasoglu, C., Newbold, C.J., Wallace, R.J. 2001. Incorporation of [15N] Ammonia by the Cellulolytic Ruminant Bacteria *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus*

- albus* SY3, and *Ruminococcus flavefaciens* 17. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (6): 2819-2822.
- Badhan, A., Wang, Y.X., Gruninger, R., Patton, D., Powlowski, J., Tsang, A., McAllister, T.A. 2015. Improvement in Saccharification Yield of Mixed Rumen Enzymes by Identification of Recalcitrant Cell Wall Constituents Using Enzyme Fingerprinting. *BioMed Research International*, 2015: 1-13.
- Bao, L., Huang, Q., Chang, L., Sun, Q., Zhou, J., Lu, H. 2012. Cloning and Characterization of Two β -Glucosidase/Xylosidase Enzymes from Yak Rumen Metagenome. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166 (1): 72-86.
- Bas, P., Archimede, H., Rouzeau, A., & Sauvant, D. 2003. Fatty Acid Composition of Mixed-Rumen Bacteria: Effect of Concentration and Type of Forage. *Journal of Dairy Science*, 86 (9): 2940-2948.
- Bashir, Y., Rather, I.A., Konwar, B.K. 2015. Rapid and Simple DNA Extraction Protocol from Goat Rumen Digesta for Metagenomic Analysis. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1 (28): 2305-2309.
- Baurhoo, B., Ruiz-Feria, C.A., Zhao, X. 2008. Purified Lignin: Nutritional and Health Impacts on Farm Animals—A Review. *Animal Feed Science and Technology*, 144 (3): 175-184.
- Bayer, E.A., Belaich, J.P., Shoham, Y., Lamed, R. 2004. The Cellulosomes: Multienzyme Machines for Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Annual of Review Microbiology*, 58: 521-554.
- Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., Yang, W.Z. 2003. Use of Exogenous Fibrolytic Enzymes to Improve Feed Utilization by Ruminants. *Journal of Animal Sciences*, 81: 37–47.
- Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Sewalt, V.J.H. 1995. Fibrolytic Enzyme Increase Fiber Digestibility and Growth Rate of Steers Fed Dry Forages. *Canadian Journal of Animal Science*, 75: 641–644.

- Beguín, P. 1990. Molecular Biology of Cellulose Degradation. *Annual Review of Microbiology*, 44: 219-248.
- Bekele, A.Z., Koike, S., Kobayashi Y. 2010. Genetic Diversity and Diet Specificity of Ruminal *Prevotella* Revealed by 16S rRNA Gene-Based Analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 305: 49–57.
- Belanche, A., de la Fuente, G., Newbold, C.J. 2014. Study of Cethanogen Communities Associated with Different Rumen Protozoal Populations. *FEMS Microbiology Ecology*, 90 (3): 663-677.
- Benvenutti, M.A., Pichard, G.R. 2014. Fibrolysis in Rumen Mediated by a Mixture of Exogenous Polysaccharidases. *Animal Feed Science and Technology*, 198: 130-140.
- Bento, C.B.P., de Azevedo, A.C., Detmann, E., Mantovani, H.C. 2015. Biochemical and Genetic Diversity of Carbohydrate-Fermenting and Obligate Amino Acid-Fermenting Hyper-Ammonia-Producing Bacteria from Nelore Steers Fed Tropical Forages and Supplemented with Casein. *BMC Microbiology*, 15 (1): 28.
- Béra-Maillet, C., Gaudet, G., Forano, E. 2000. Endoglucanase Activity and Relative Expression of Glycoside Hydrolase Genes of *Fibrobacter succinogenes* S85 Grown on Different Substrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543 (1): 77-85.
- Bertrand, H., Poly, F., Lombard, N., Nalin, R., Vogel, T. M., Simonet, P. 2005. High Molecular Weight DNA Recovery from Soils Prerequisite for Biotechnological Metagenomic Library Construction. *Journal of Microbiological Methods*, 62 (1): 1-11.
- Bollag, D.M.E., Rozycki, S.J., Bollag, M.D., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J., 1996. Proteins Methods. ISBN:0-471-11837-0.
- Boudet, A.M., Grima-Pettenati, J. 1996. Lignin Genetic Engineering. *Molecular Breeding*, 2: 25–39.

- Brown, M.E., Chang, M.C. 2014. Exploring Bacterial Lignin Degradation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 19: 1-7.
- Bryant, M.P. 1973. Nutritional Requirements of the Predominant Rumen Cellulolytic Bacteria. *Federation Proceedings*, 32: 1809–1813.
- Bryant, M.P., Small, N., Bouma, C., Robinson, I.M. 1958. Characteristics of Ruminal Anaerobic Cellulolytic cocci and *Cilliobacterium cellulosolvens* n. sp. *Journal of Bacteriology*, 76: 529–537.
- Cai, S., Li, J., Hu, F.Z., Zhang, K., Luo, Y., Janto, B., Boissy, R., Ehrlich, G., Dong, X. 2010. *Cellulosilyticum ruminicola*, a Newly Described Rumen Bacterium that Possesses Redundant Fibrolytic-Protein-Encoding Genes and Degrades Lignocellulose with Multiple Carbohydrate-Borne Fibrolytic Enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (12): 3818-3824.
- Callaway, E.S., Martin, S.A. 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* Culture on Ruminal Bacteria that Utilize Lactate and Digest Cellulose. *Journal of Dairy Science*, 80 (9): 2035-2044.
- Calsamiglia, S., Blanch, M., Ferret, A., Moya, D. 2012. Is Subacute Ruminal Acidosis a pH Related Problem? Causes and Tools for its Control. *Animal Feed Science and Technology*, 172: 42–50.
- Cassab, G.I. 1998. Plant Cell Wall Proteins. *Annual Review of Plant Biology*, 49 (1): 281-309.
- Castillo-González, A.R., Burrola-Barraza, M.E., Domínguez-Viveros, J., Chávez-Martínez, A. 2014. Rumen Microorganisms and Fermentation. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46 (3): 349-361.
- Cersosimo, L.M., Lachance, H., St-Pierre, B., Van Hoven, W., Wright, A.D.G. 2015. Examination of the Rumen Bacteria and Methanogenic Archaea of Wild Impalas (*Aepyceros melampus melampus*) from Pongola, South Africa. *Microbial Ecology*, 69 (3): 577-585.

- Chang, L., Ding, M., Bao, L., Chen, Y., Zhou, J., Lu, H. 2011. Characterization of a Bifunctional Xylanase/Endoglucanase from Yak Rumen Microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90: 933–1942.
- Chávez-González, M., Rodríguez-Durán, L.V., Balagurusamy, N., Prado-Barragán, A., Rodríguez, R., Contreras, J.C., Aguilar, C.N. 2012. Biotechnological Advances and Challenges of Tannase: An Overview. *Food and Bioprocess Technology*, 5 (2): 445-459.
- Cheema, T.A., Jirajaroenrat, K., Sirinarumitr, T., Rakshit, S.K. 2012. Isolation of a Gene Encoding a Cellulolytic Enzyme from Swamp Buffalo Rumen Metagenomes and its Cloning and Expression in *Escherichia coli*. *Animal Biotechnology*, 23 (4): 261-277.
- Cheng, F., Sheng, J., Dong, R., Men, Y., Gan, L., Shen, L. 2012. Novel Xylanase from a Holstein Cattle Rumen Metagenomic Library and Its Application in Xylooligosaccharide and Ferulic Acid Production from Wheat Straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 12516-12524.
- Chen, L., Luo, Y., Wang, H., Liu, S., Shen, Y., Wang, M. 2016. Effects of Glucose and Starch on Lactate Production by Newly Isolated *Streptococcus bovis* S1 from Saanen Goats. *Applied and Environmental Microbiology*, 82 (19): 5982-5989.
- Chiba, L.I. 2009. Rumen Microbiology and Fermentation: Animal Nutrition Handbook 2nd Edition (Editor: Chiba, L.I.). Auburn University: Auburn, AL, s.57-81.
- Chung, K.T., Bryan, M.P. 1997. Robert E. Hungate: Pioneer of Anaerobic Microbial Ecology. *Anaerobe*, 3: 213–217.
- Collins, T., Gerday, C., Feller, G. 2005. Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (1): 3-23.
- Corredoira, J., Alonso, M.P., García-Garrote, F., García-Pais, M.J., Coira, A., Rabuñal, R., Gonzalez-Ramirez, A., Pita, J., Matesanz, M., Velasco, D., López-Álvarez, M.J., Varela, J. 2014. *Streptococcus bovis* Group and Biliary Tract Infections: An Analysis of 51 cases. *Clinical Microbiology and Infection*, 20: 405–409.

- Cotta, M.A. 1988. Amylolytic Activity of Selected Species of Ruminal Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 772–776.
- Cotta M.A. 1992. Interaction of Ruminal Bacteria in the Production and Utilization of Maltooligosaccharides from Starch. *Applied Environmental and Microbiology*, 58: 48-54.
- Cotta, M.A., Russell, J.B. 1997. Digestion of Nitrogen in the Rumen: A Model for Metabolism of Nitrogen Compounds in Gastrointestinal Environment: Gastrointestinal Microbiology (Editörler: Mackie, R.I., White, B.A.). International Thomson Publishing, New York, s.380-423.
- Cotta, M.A., Whitehead, T.R. 1993. Regulation and Cloning of the Gene Encoding Amylase Activity of the Ruminal Bacterium *Streptococcus bovis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (1): 189-196.
- Cotta, M. A., Zeltwanger, R. L. 1995. Degradation and Utilization of Xylan by the Ruminal Bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Selenomonas ruminantium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), 4396-4402.
- Creevey, C.J., Kelly, W.J., Henderson, G., Leahy, S.C. 2014. Determining the Culturability of the Rumen Bacterial Microbiome. *Microbial Biotechnology*, 7 (5): 467-79.
- Cruz, M., Fernandes, K., Cysneiros, C., Nassar, R., Caramori, S. 2015. Improvement of Starch Digestion Using α -Amylase Entrapped in Pectin-Polyvinyl Alcohol Blend. *BioMed Research International*, 145903: 1-9.
- Cucurachi, M., Busconi, M., Marudelli, M., Soffritti, G., Fogher, C. 2013. Direct Amplification of New Cellulase Genes from Woodland Soil Purified DNA. *Molecular Biology Reports*, 40: 4317–4325.
- Cunha, I.S., Barreto, C.C., Costa, O.Y., Bomfim, M.A., Castro, A.P., Kruger, R.H., Quirino, B.F. 2011. Bacteria and Archaea Community Structure in the Rumen Microbiome of Goats (*Capra hircus*) from the Semiarid Region of Brazil. *Anaerobe*, 17 (3): 118-124.

- Çömlekcioglu, U., 2009. Rumen Funguslarının İzolasyonu ve Bu Funguslara ait Enzim Genleri Üzerine Moleküler Çalışmalar. Doktora tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Kahramanmaraş, 277s.
- Dehority, B.A. 1998. Microbial Interactions in the Rumen. *Revista de la Facultad de. Agronomia*, 15: 69-86.
- Del Pozo, M.V., Fernández-Arrojo, L., Gil-Martínez, J., Montesinos, A., Chernikova, T.N., Nechitaylo, T.Y., Waliszek, A., Tortajada, M., Rojas, A., Huws, S.A., Golyshina, O.V. 2012. Microbial β -glucosidases from Cow Rumen Metagenome Enhance the Saccharification of Lignocellulose in Combination with Commercial Cellulase Cocktail. *Biotechnology for Biofuels*, 5: 1-13.
- Denman, S.E., McSweeney, C.S. 2006. Development of a Real-Time PCR Assay for Monitoring Anaerobic Fungal and Cellulolytic Bacterial Populations within the Rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, 58 (3): 572-582.
- Derakhshani, H., Corley, S.W., Al Jassim, R. 2016. Isolation and Characterization of Mimosine, 3, 4 DHP and 2, 3 DHP Degrading Bacteria from a Commercial Rumen Inoculum. *Journal of Basic Microbiology*, 56 (5): 580-585.
- Desai, C., Madamwar, D. 2007. Extraction of Inhibitor-Free Metagenomic DNA from Polluted Sediments, Compatible with Molecular Diversity Analysis using Adsorption and Ion-Exchange Treatments. *Bioresource Technology*, 98 (4): 761-768.
- Dimarogona, M., Topakas, E., Christakopoulos, P. 2012. Cellulose Degradation by Oxidative Enzymes. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2 (3): 1-8.
- Ding, S.Y., Rincon, M.T., Lamed, R., Martin, J.C., McCrae, S.I., Aurilia, V., Shoham, Y., Bayer, E.A., Flint, H.J. 2001. Cellulosomal Scaffoldin-Like Proteins from *Ruminococcus flavefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 183 (6): 1945-1953.
- Dodd, D., Kiyonari, S., Mackie, R. I., Cann, I. K. 2010. Functional Diversity of Four Glycoside Hydrolase Family 3 Enzymes from the Rumen Bacterium *Prevotella bryantii* B14. *Journal of Bacteriology*, 192 (9): 2335-2345.

- Duan, C.J., Xian, L., Zhao, G.C., Feng, Y., Pang, H., Bai, X.L., Tang, J.L. Ma, Q.S. Feng, J.X. 2009. Isolation and Partial Characterization of Novel Genes Encoding Acidic Cellulases From Metagenomes of Buffalo Rumens. *Journal of Applied Microbiology*, 107 (1): 245-256.
- Egan, A.R. 2005. Experimental Designs for Rumen Microbiology: Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants (Editörler: Makkar, H., McSweeney, C.S.). Springer, The Netherlands. s.3-19.
- El Kaoutari, A., Armougom, F., Gordon, J.I., Raoult, D., Henrissat, B. 2013. The Abundance and Variety of Carbohydrate-Active Enzymes in the Human Gut Microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 11 (7): 497-504.
- Elphinstone, M.S., Hinten, G.N., Anderson, M.J., Nock, C.J. 2003. An Inexpensive and High-throughput Procedure to Extract and Purify Total Genomic DNA for Population Studies. *Molecular Ecology Notes*, 3: 317–320.
- Ekinci, M.S., Martin, J.C., Flint, H.J. 2001. *Streptococcus bovis* as a Host for the Expression of Cloned Polysaccharidase Genes. *Biotechnology Letters*, 23 (7): 501-505.
- Erich, H. 1975. Chromatography, A Laboratory Handbook of Chromatographic and Electrophoretic Methods. Van Reinhold Company, New York. 968s.
- Eschenlauer, S.C.P., McKain, N., Walker, N.D., McEwan, N.R., Newbold, C.J., Wallace, R.J. 2002. Ammonia Production by Ruminant Microorganisms and Enumeration, Isolation, and Characterization of Bacteria Capable of Growth on Peptides and Amino Acids from the Sheep Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (10): 4925-4931.
- Espinosa, M. I., Bertin, A., Squeo, F. A., Cortés, A., Gouin, N. 2015. Comparison of DNA Extraction Methods for Polymerase Chain Reaction Amplification of Guanaco (*Lama guanicoe*) Fecal DNA Samples. *Genetics and Molecular Research*, 14 (1): 400-406.
- FAO. 2006. Livestock's Long Shadow. Environmental Issues and Options. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

- Faridi, F., Sena, D.S., Sharma, V. 2014. Comparative Evaluation of Faecal Community DNA Isolation Methods in Camels. *Journal of Camel Practice and Research*, 21 (2): 183-186.
- Fernando, S.C., Purvis, H.T., Najar, F.Z., Sukharnikov, L.O., Krehbiel, C.R., Nagaraja, T.G., Roe, B.A., Desilva, U. 2010. Rumen Microbial Population Dynamics During Adaptation to a High-Grain Diet. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (22): 7482–7490.
- Ferrer, M., Beloqui, A., Timmis, K.N., Golyshin, P.N. 2008. Metagenomics for Mining New Genetic Resources of Microbial Communities. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16: 109-123.
- Ferrer, M., Golyshina, O.V., Chernikova, T.N., Khachane, A.N., Reyes□Duarte, D., Santos, V.A., Strompl, C., Elborough, K., Jarvis, G., Neef, A., Yakimov, M.M. 2005. Novel Hydrolase Diversity Retrieved from a Metagenome Library of Bovine Rumen Microflora. *Environmental Microbiology*, 7 (12): 1996-2010.
- Festucci-Buselli, R.A., Otoni, W.C., Joshi, C.P. 2007. Structure, Organization, and Functions of Cellulose Synthase Complexes in Higher Plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19 (1): 1-13.
- Firkins, J. L., Yu, Z., Morrison, M. 2007. Ruminant Nitrogen Metabolism: Perspectives for Integration of Microbiology and Nutrition for Dairy. *Journal of Dairy Science*, 90: 1-16.
- Fliegerova, K., Tapio, I., Bonin, A., Mrazek, J., Callegari, M.L., Bani, P., Bayat, A., Vilkki, J., Kopečný, J., Shingfield, K.J., Boyer, F., Coissac, E., Taberlet, P., Wallace, J. 2014. Effect of DNA Extraction and Sample Preservation Method on Rumen Bacterial Population. *Anaerobe*, 29: 80-84.
- Flint, H.J., Forsberg, C.W., 1995. Polysaccharide Degradation in the Rumen: Biochemistry and Genetics (Editörler: Engelhardt, W.V., Leonhard-Marek, S., Breues, G., Geiesecke, D.). Ferdinand Enke Verlag. s.43-66.
- Flint, H.J., Scott, K.P., Duncan, S.H., Louis, P., Forano, E. 2012. Microbial Degradation of Complex Carbohydrates in the Gut. *Gut Microbes*, 3 (4): 289-306.

- Flint, H.J., Martin, J., McPherson, C.A., Daniel, A.S., Zhang, J.X. 1993. A Bifunctional Enzyme, with Separate Xylanase and Beta (1,3-1,4)-Glucanase Domains, Encoded by the xynD gene of *Ruminococcus flavefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 175 (10): 2943-2951.
- Forsberg, C.W., Beveridge, T.J., Hellstrom, A. 1981. Cellulase and Xylanase Release from *Bacteroides succinogenes* and Its Importance in the Rumen Environment. *Applied Environmental and Microbiology*, 42 (5): 886-896.
- Forsberg, C.W., Cheng, K.J., White, B.A. 1997. Polysaccharide Degradation in the Rumen and Large Intestine: Gastrointestinal Microbiology (Editörler: Mackie R.I., White, B.A.). Chapman and Hall, New York. s.319-379.
- Forterre, P. 2013. The Common Ancestor of Archaea and Eukarya was not an Archaeon. *Archaea*, 372396: 1-18.
- Furtado, G.P., Ribeiro, L.F., Santos, C.R., Tonoli, C.C., De Souza, A.R., Oliveira, R.R., Murakami, M.T., Ward, R.J. 2011. Biochemical and Structural Characterization of a β -1,3-1,4-Glucanase from *Bacillus subtilis* 168. *Process Biochemistry*, 46 (5): 1202-1206.
- Gaiser, O.J., Piotukh, K., Ponnuswamy, M.N., Planas, A., Borriss, R., Heinemann, U. 2006. Structural Basis for the Substrate Specificity of a *Bacillus* 1,3-1,4- β -Glucanase. *Journal of Molecular Biology*, 357 (4): 1211-1225.
- Ghali, M.B., Scott, P.T., Al Jassim, R.A.M. 2004. Characterization of *Streptococcus bovis* from the Rumen of the Dromedary Camel and Rusa Deer. *Letters in Applied Microbiology*, 39: 341-346.
- Gilbert, R.A., Klieve, A.V. 2015. Ruminal Viruses (Bacteriophages, Archaeaphages). In *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution* (Editörler: Puniya, A.K., Singh, R., Kamra, D.N.). Springer India. s.121-141.
- Gilbert, H.J., Knox, J.P., Boraston, A.B. 2013. Advances in Understanding the Molecular Basis of Plant Cell Wall Polysaccharide Recognition by Carbohydrate-Binding Modules. *Current Opinion in Structural Biology*, 23 (5): 669-677.

- Gong, X., Gruniniger, R.J., Forster, R.J., Teather, R.M., McAllister, T.A. 2013. Biochemical Analysis of a Highly Specific, pH Stable Xylanase Gene Identified from a Bovine Rumen-Derived Metagenomic Library. *Applied Microbiology Biotechnology*, 97: 2423–2431.
- Graminha, E.B.N., Goncalves, A.Z.L., Pirota, R.D.P.B., Balsalobre, M.A.A., Da Silva, R., Gomes, E. 2008. Enzyme Production by Solid-State Fermentation: Application to Animal Nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 144 (1): 1-22.
- Grant, R.J., Whitehead, T.R., Orr, J.E. 2000. *Streptococcus bovis* Meningitis in an Infant. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (1): 462–463.
- Guo, T.J., Wang, J.Q., Bu, D.P., Liu, K.L., Wang, J.P., Li, D., Luan, S.Y. 2010. Evaluation of the Microbial Population in Ruminal Fluid Using Real Time PCR in Steers Treated with Virginiamycin. *Czech Journal Animal Science*, 55 (7): 276-285.
- Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., Goodman, R.M. 1998. Molecular Biological Access to the Chemistry of Unknown Soil Microbes: a New Frontier for Natural Products. *Chemistry & Biology*, 5 (10): 245-249.
- Hatakka, A. 1994. Lignin-Modifying Enzymes from Selected White-Rot Fungi: Production and Role from in Lignin Degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 13: 125-135.
- Hattori, K., Matsui, H. 2008. Diversity of Fumarate Reducing Bacteria in the Bovine Rumen Revealed by Culture Dependent and Independent Approaches. *Anaerobe*, 14 (2): 87-93.
- Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., Collaborators, G.R.C., Janssen, P.H. 2015. Rumen Microbial Community Composition Varies with Diet and Host, But a Core Microbiome is Found Across a Wide Geographical Range. *Scientific Reports*, 5: 1-13.
- Henderson, G., Cox, F., Kittelmann, S., Miri, V.H., Noel, S.J., Waghorn, G.C., Janssen, P.H., Zethof, M. 2013. Effect of DNA Extraction Methods and Sampling Techniques on the Apparent Structure of Cow and Sheep Rumen Microbial Communities. *PLOS ONE*, 8 (9): 1-14.

- Hill, J., McSweeney, C., Wright, A.D.G., Bishop-Hurley, G., Kalantar-zadeh, K. 2016. Measuring Methane Production from Ruminants. *Trends in Biotechnology*, 34 (1): 26-35.
- Hoover, W.H., Stokes, S.R. 1991. Balancing Carbohydrates and Proteins for Optimum Rumen Microbial Yield. *Journal of Dairy Science*, 74 (10): 3630-3644.
- Horn, S.J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Eijsink, V.G. 2012. Novel Enzymes for the Degradation of Cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 5 (45): 1-12.
- Hristov, A., Callaway, T., Lee, C., Dowd, S. 2012. Rumen Bacterial, Archaeal, Fungal Diversity of Dairy Cows in Response to Ingestion of Lauric or Myristic Acid. *Journal of Animal Science*, 90: 4449–4457.
- Hua, C., Yan, Q., Jiang, Z., Li, Y., Katrolia, P. 2010. High-level Expression of a Specific β -1,3-1,4-Glucanase from the Thermophilic Fungus *Paecilomyces Thermophila* in *Pichia pastoris*. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 88: 509–518.
- Huang, H., Yang, P., Luo, H., Tang, H., Shao, N., Yuan, T., Wang, Y., Bai, Y., Yao, B. 2008. High-level Expression of a Truncated 1, 3-1, 4- β -D-glucanase from *Fibrobacter succinogenes* in *Pichia pastoris* by Optimization of Codons and Fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78 (1): 95-103.
- Hungate, R.E. 1944. Studies on Cellulose Fermentation. I. The Culture and Physiology of an Anaerobic Cellulose-digesting Bacterium. *Journal Bacteriology*, 48: 499–512.
- Hungate, R.E., 1966. The Rumen and Its Microbes. Academic Press, ISBN: 978-1-4832-3308-6, London, UK, 533s.
- Hungate, R.E. 1975. The Rumen Microbial Ecosystem. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 6: 39-66.
- Iakiviak, M., Mackie, R.I., Cann, I.K. 2011. Functional Analyses of Multiple Lichenin-Degrading Enzymes from the Rumen Bacterium *Ruminococcus albus* 8. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (21): 7541-7550.

- Ikeda, Y., Park, E.Y., Okida, N. 2006. Bioconversion of Waste Office Paper to Gluconic Acid in a Turbine Blade Reactor by the Filamentous Fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 97: 1030–1035.
- Irbis, C., Ushida, K. 2004. Detection of Methanogens and Proteobacteria from a Single Cell of Rumen Ciliate Protozoa. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 50 (4): 203-212.
- Janeček, Š., Svensson, B., MacGregor, E.A. 2014. α -Amylase: An Enzyme Specificity Found in Various Families of Glycoside Hydrolases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71 (7): 1149-1170.
- Kajikawa, H., Kudo, H., Kondo, T., Jodai, K., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, T. 2000. Degradation of Benzyl Ether Bonds of Lignin by Ruminant Microbes. *FEMS Microbiology Letters*, 187 (1): 15-20.
- Kamra, D.N. 2005. Rumen Microbial Ecosystem. *Current Science*, 89 (1): 124-135.
- Kang, J., Zeng, B., Tang, S., Wang, M., Han, X., Zhou, C., Yan, Q., He, Z., Liu, J., Tan, Z. 2016. Effects of *Momordica charantia* Saponins on In vitro Ruminant Fermentation and Microbial Population. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29 (4): 500-508.
- Kang, Y.M., Kim, M.K., An, J.M., Haque, M.A., Cho, K.M. 2015. Metagenomics of Unculturable Bacteria in Cow Rumen: Construction of cel9E–xyn10A Fusion Gene by Site-directed Mutagenesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 113: 29-38.
- Kenters, N., Henderson, G., Jeyanathan, J., Kittelmann, S., Janssen, P.H. 2011. Isolation of Previously Uncultured Rumen Bacteria by Dilution to Extinction using a New Liquid Culture Medium. *Journal of Microbiological Methods*, 84: 52–60.
- Khafipour, E., Li, S., Tun, H.M., Derakhshani, H., Moossavi, S., Plaizier, J.C. 2016. Effects of Grain Feeding on Microbiota in the Digestive Tract of Cattle. *Animal Frontiers*, 6 (2): 13-19.

- Khafipour, E., Li, S., Plaizier, J.C., Krause, D.O. 2009. Rumen Microbiome Composition Determined Using Two Nutritional Models of Subacute Ruminal Acidosis. *Applied of Environmental Microbiology*, 75 (22): 7115–7124.
- Kim, J.Y., Kim, H.B., Lee, D.S. 2002. Cloning and expression of the *Bacillus circulans* endo- β -1,3-1,4-glucanase gene (bglBC1) in *Escherichia coli*. *Biotechnology letters*, 24 (1): 53-57.
- Kim, M., Morrison, M., Yu, Z. 2011. Status of the Phylogenetic Diversity Census of Ruminal Microbiomes. *FEMS Microbiology Ecology*, 76: 49–63.
- Kittelmann, S., Naylor, G.E., Koolaard, J.P., Janssen, P.H. 2012. A Proposed Taxonomy of Anaerobic Fungi (Class Neocallimastigomycetes) Suitable for Largescale Sequence-Based Community Structure Analysis. *PLoS ONE*, 7 (5): 1-13.
- Kittelmann, S., Seedorf, H., Walters, W.A., Clemente, J.C., Knight, R., Gordon, J.I., Janssen, P.H. 2013. Simultaneous Amplicon Sequencing to Explore Co-Occurrence Patterns of Bacterial, Archaeal and Eukaryotic Microorganisms in Rumen Microbial Communities. *PLoS One*, 8 (2): 1-11.
- Klingerman, C.M., Hu, W., McDonell, E.E., DerBedrosian, M.C., Kung, L. 2009. An Evaluation of Exogenous Enzymes with Amylolytic Activity for Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 92 (3): 1050-1059.
- Ko, K.C., Han, Y., Choi, J.H., Kim, G.J., Lee, S.G., Song, J.J. 2011. A Novel Bifunctional Endo-/Exo-Type Cellulase from an Anaerobic Ruminal Bacterium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89 (5): 1453-1462.
- Ko, K.C., Lee, J.H., Han, Y., Choi, J.H., Song, J.J. 2013. A Novel Multifunctional Cellulolytic Enzyme Screened from Metagenomic Resources Representing Ruminal Bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441 (3): 567-572.
- Kobayashi, Y. 2006. Inclusion of Novel Bacteria in Rumen Microbiology: Need for Basic and Applied Science. *Animal Science Journal*, 77: 375–385.

- Kobayashi, Y., Onodera, R. 1999. Application of Molecular Biology to Rumen Microbes. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 12: 77-83.
- Koeck, D.E., Koellmeier, T., Zverlov, V.V., Liebl, W., Schwarz, W.H. 2015. Differences in Biomass Degradation between Newly Isolated Environmental Strains of *Clostridium thermocellum* and Heterogeneity in the Size of the Cellulosomal Scaffoldin. *Systematic and Applied Microbiology*, 38 (6): 424-432.
- Koike, S., Kobayashi, Y. 2009. Fibrolytic Rumen Bacteria: Their Ecology and Functions. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22 (1): 131-138.
- Koike, S., Handa, Y., Goto, H., Sakai, K., Miyagawa, E., Matsui, H., Ito, S., Kobayashi, Y. 2010. Molecular Monitoring and Isolation of Previously Uncultured Bacterial Strains from the Sheep Rumen. *Applied of Environmental Microbiology*, 76 (6): 1887-1894.
- Kong, Y., Teather, R., Forster, R. 2010. Composition, Spatial Distribution, and Diversity of the Bacterial Communities in the Rumen of Cows Fed Different Forages. *FEMS Microbiology Ecology*, 74 (3): 612-622.
- Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M. 1999. Molecular and Biotechnological Aspects of Xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 23 (4): 411-456.
- Kumar, S., Dagar, S.S., Sirohi, S.K., Upadhyay, R.C., Puniya, A.K. 2013. Microbial Profiles, in Vitro Gas Production and Dry Matter Digestibility Based on Various Ratios of Roughage to Concentrate. *Annals of Microbiology*, 63: 541-545.
- Kumar, S., Indugu, N., Vecchiarelli, B., Pitta, D.W. 2015. Associative Patterns among Anaerobic Fungi, Methanogenic Archaea, and Bacterial Communities in Response to Changes in Diet and Age in the Rumen of Dairy cows. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1-10.
- Krause, D.O., Nagaraja, T.G., Wright, A.D., Callaway, T.R. 2013. Board-Invited Review: Rumen Microbiology: Leading the Way in Microbial Ecology. *Journal of Animal Sciences*, 91 (1): 331-341.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA Sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (Editörler: Stackebrandt, E., Goodfellow, M.). John Wiley, USA. s.115-175.
- Lee, C.C., Kibblewhite, R.E., Wagschal, K., Li, R., Orts, W.J. 2012. Isolation of α -glucuronidase Enzyme from a Rumen Metagenomic Library. *The Protein Journal*, 31 (3): 206-211.
- Lee, P., Lee, S., Hong, S., Chang, H. 2002. Isolation and Characterization of a New Succinic Acid-Producing Bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from Bovine Rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58 (5): 663-668.
- Lee, S.S., Shin, K.J., Kim, W.Y., Ha, J.K., Han, I.K. 1999. The Rumen Ecosystem: As a Fountain Sources of Nobel Enzymes-Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 12 (6): 988-1001.
- Leng, J., Cheng, Y.M., Zhang, C.Y., Zhu, R.J., Yang, S.L., Gou, X., Deng, W.D., Mao, H.M. 2012. Molecular Diversity of Bacteria in Yunnan Yellow Cattle (*Bos taurus*) from Nujiang Region, China. *Molecular Biology Reports*, 39 (2): 1181-1192.
- Leng, J., Xie, L., Zhu, R., Yang, S., Gou, X., Li, S., Mao, H. 2011. Dominant Bacterial Communities in the Rumen of Gayals (*Bos frontalis*), Yaks (*Bos grunniens*) and Yunnan Yellow Cattle (*Bos taurus*) revealed by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Molecular Biology Reports*, 38 (8): 4863-4872.
- Li, J.F., Li, L., Sheen, J. 2010. Protocol: A Rapid and Economical Procedure for Purification of Plasmid or Plant DNA with Diverse Applications in Plant Biology. *Plant Methods*, 6 (1): 1-8.
- Lin, C., Stahl, D.A. 1995. Taxon-Specific Probes for the Cellulolytic Genus *Fibrobacter* Reveal Abundant and Novel Equine-Associated Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (4): 1348-1351.

- Li, S., Yoon, I., Scott, M., Khafipour, E., Plaizier, J.C. 2016. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation Product and Subacute Ruminant Acidosis on Production, Inflammation, and Fermentation in the Rumen and Hindgut of Dairy Cows. *Animal Feed Science and Technology*, 211: 50–60.
- Liu, B., Wang, Y., Zhang, X. 2006. Characterization of a Recombinant Maltogenic Amylase from Deep Sea Thermophilic *Bacillus* sp. WPD616. *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (4): 805-810.
- Liu, K., Wang, J., Bu, D., Zhao, S., McSweeney, C., Yu, P., Li, D. 2009. Isolation and Biochemical Characterization of Two Lipases from a Metagenomic Library of China Holstein Cow Rumen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385 (4): 605-611.
- Li, Z., Zhao, H., Yang, P., Zhao, J., Huang, H., Xue, X., Zhang, X., Diao, Q., Yao, B. (2013). Comparative Quantitative Analysis of Gene Expression Profiles of Glycoside Hydrolase Family 10 Xylanases in the Sheep Rumen during a Feeding Cycle. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (4): 1212-1220.
- Loaces, I., Bottini, G., Moyna, G., Fabiano, E., Martínez, A., Noya, F. 2016. EndoG: A Novel Multifunctional Halotolerant Glucanase and Xylanase Isolated from Cow Rumen. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 126: 1-9.
- Lopes, L.D., de Souza Lima, A.O., Taketani, R.G., Darias, P., da Silva, L.R.F., Romagnoli, E.M., Louvandini, H., Abdalla, A.L., Mendes, R. 2015. Exploring the Sheep Rumen Microbiome for Carbohydrate-Active Enzymes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108 (1): 15-30.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193 (1): 265-275.
- Luo, H., Yang, J., Li, J., Shi, P., Huang, H., Bai, Y., Fan, Y., Yao, B. 2010a. Molecular Cloning and Characterization of the Novel Acidic Xylanase XYLD from *Bispora* sp. MEY-1 that is Homologous to Family 30 Glycosyl Hydrolases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86: 1829–1839.

- Luo, H., Yang, J., Yang, P., Li, J., Huang, H., Shi, P., Bai, Y., Wang, Y., Fan, Y., Yao, B. 2010b. Gene Cloning and Expression of a New Acidic Family 7 endo- β -1,3-1,4-Glucanase from the Acidophilic Fungus *Bispora* sp. MEY-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85: 1015–1023.
- Luo, J., Ranadheera, C.S., King, S., Evans, C., Baines, S. 2017. In vitro Investigation of the Effect of Dairy Propionibacteria on Rumen pH, Lactic Acid and Volatile Fatty Acids. *Journal of Integrative Agriculture*, 16: 1-10.
- Mackie, R.I., 1997. Gut Environment and Evolution of Mutualistic Fermentative Digestion: Gastrointestinal Microbiology, Vol. 1 (Editörler: Mackie, R.I., White, B.A.). Chapman & Hall, New York. s.13–35.
- Maktouf, S., Moulis, C., Kamoun, A., Chaari, F., Chaabouni, S.E., Remaud-Simeon, M. 2013. A Laundry Detergent Compatible Lichenase: Statistical Optimization for Production under Solid State Fermentation on Crude Millet. *Industrial Crops and Products*, 43: 349-354.
- Malburg, S.R., Malburg, L.M., Liu, T., Iyo, A.H., Forsberg, C.W. 1997. Catalytic Properties of the Cellulose-Binding Endoglucanase F from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (6): 2449-2453.
- Mandel, M., Higa, A. 1970. Calcium-dependent Bacteriophage DNA Infection. *Journal of Molecular Biology*, 53: 159-162.
- Mansour, A.A., El-Tayeb, T.S., El-Bordeny, N.E. 2014. Identification, Molecular Characterization and Evaluation of Some Ruminant Bacteria That Catalyze and Degrade Plant Cellulosic Materials. *American Journal of Applied Sciences*, 11 (1): 127.
- Mantovani, H.C., Kam, D.K., Ha, J.K., Russell, J.B. 2001. The Antibacterial Activity and Sensitivity of *Streptococcus bovis* Strains Isolated from the Rumen of Cattle. *FEMS Microbiology Ecology*, 37: 223-229.
- Mao, S., Zhang, R., Wang, D., Zhu, W. 2013. Impact of Subacute Ruminant Acidosis (SARA) Adaptation on Rumen Microbiota in Dairy Cattle Using Pyrosequencing. *Anaerobe*, 24: 12–19.

- Matsui, H., Kato, Y., Chikaraishi, T., Moritani, M., Ban-Tokuda, T., Wakita, M. 2010. Microbial Diversity in Ostrich Ceca as Revealed by 16S Ribosomal RNA Gene Clone Library and Detection of Novel *Fibrobacter* Species. *Anaerobe*, 16 (2): 83-93.
- Matsui, Y., Okada, S., Uchimura, Y., Kondo, A., Satoh, E. 2007. Determination and Analysis of the Starch Binding Domain of *Streptococcus bovis* 148 Raw-Starch-Hydrolyzing. ALPHA.-Amylase. *Journal of Applied Glycoscience*, 54 (4): 217-222.
- McCann, J.C., Wickersham, T.A., Loor, J.J. 2014. High-throughput Methods Redefine the Rumen Microbiome and Its Relationship with Nutrition and Metabolism. *Bioinformatics and Biology Insights*, 8: 109-125.
- McSweeney, C.S., Denman, S.E., Mackie, R.I., 2005. Rumen Bacteria: Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants (Editörler: Makkar, H.P.S., McSweeney, C.H.). Springer, Netherlands. s.23-37.
- Mendoza, G.D., Britton, R.A., Stock, R.A. 1998. Ruminant Fermentation and In Situ Starch Digestion with High Moisture Corn, Dry Rolled Grain Sorghum or a Mixture of These Grains. *Animal Feed Science and Technology*, 74: 329–335.
- Michalet-Doreau, B., Fernandez, I., Peyron, C., Millet, L., Fonty, G. 2001. Fibrolytic Activities and Cellulolytic Bacterial Community Structure in the Solid and Liquid Phases of Rumen Contents. *Reproduction Nutrition Development*, 41 (2): 187-194.
- Miller, D.N., Bryant, J.E., Madsen, E.L., Ghiorse, W.C. 1999. Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (11): 4715-4724.
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars. *Analytical Chemistry*, 31: 426–428.

- Miyazaki, K., Hirase, T., Kojima, Y., Flint, H.J. 2005. Medium-to Large-Sized Xylo-Oligosaccharides are Responsible for Xylanase Induction in *Prevotella bryantii* B14. *Microbiology*, 151 (12): 4121-4125.
- Miyazaki, K., Martin, J.C., Marinsek-Logar, R., Flint, H.J. 1997. Degradation and Utilization of Xylans by the Rumen Anaerobe *Prevotella bryantii* (formerly *P. ruminicola* subsp. *brevis*) B 14. *Anaerobe*, 3 (6): 373-381.
- Mohnen, D. 2008. Pectin Structure and Biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11 (3): 266-277.
- Moon, Y.H., Iakiviak, M., Bauer, S., Mackie, R.I., Cann, I.K. 2011. Biochemical Analyses of Multiple Endoxylanases from the Rumen Bacterium *Ruminococcus albus* 8 and their Synergistic Activities with Accessory Hemicellulose-Degrading Enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (15): 5157-5169.
- Morita, H., Kuwahara, T., Ohshima, K., Sasamoto, H., Itoh, K., Hattori, M., Hayashi, T., Takami, H. 2007. An Improved DNA Isolation Method for Metagenomic Analysis of the Microbial Flora of the Human Intestine. *Microbes and Environments*, 22 (3): 214-222.
- Nakamura, M., Nagamine, T., Harada, C., Tajima, K., Matsui, H., Benno, Y. 2003. Expression of *Ruminococcus albus* Xylanase Gene (xynA) in *Streptococcus bovis* 12-U-1. *Current Microbiology*, 47 (1): 0071-0074.
- Nathani, N.M., Kothari, R.K., Patel, A.K., Joshi, C.G. 2015. Functional Characterization Reveals Novel Putative Coding Sequences in *Prevotella ruminicola* Genome Extracted from Rumen Metagenomic Studies. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 25 (4): 292-299.
- Neumann, L.M., Dehority, B.A. 2008. An Investigation of the Relationship between Fecal and Rumen Bacterial Concentrations in Sheep. *Zoo Biology*, 27: 100–108.
- Nigam, P., Singh, D. 1995. Enzyme and Microbial Systems Involved in Starch Processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 770-778.

- Nishiguchi, M.K., Doukakis, P., Egan, M., Kizirian, D., Phillips, A., Prendini, L., Rosenbaum, H.C., Torres, E., Wyner, Y., DeSalle, R. Giribet, G., 2002. DNA Isolation Procedures: In Techniques in Molecular Systematics and Evolution (Editörler: DeSalle, R., Giribet, G., Wheeler, W.). Birkhäuser Basel s.249-287.
- Nozière, P., Steinberg, W., Silberberg, M., Morgavi, D.P. 2014. Amylase addition Increases Starch Ruminant Digestion in First-Lactation Cows Fed High and Low Starch Diets. *Journal of Dairy Science*, 97 (4): 2319-2328.
- Odenyo, A.A., Osuji, P.O. 1998. Tannin-Tolerant Ruminant Bacteria from East African Ruminants. *Canadian Journal of Microbiology*, 44 (9): 905-909.
- Ohara, H., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K. 2000. Characterization of the Cellulolytic Complex (Cellulosome) from *Ruminococcus albus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64 (2): 254-260.
- Ohkawara, S., Furuya, H., Nagashima, K., Asanuma, N., Hino, T. 2005. Oral Administration of *Butyrivibrio fibrisolvens*, a Butyrate-Producing Bacterium, Decreases the Formation of Aberrant Crypt Foci in the Colon and Rectum of Mice. *The Journal of Nutrition*, 135 (12): 2878-2883.
- Orpin, C.G., Joblin, K.N., 1997. The Rumen Anaerobic Fungi: The Rumen Microbial Ecosystem (Editörler: Hobson, P.N., Stewart. C.S.). Elsevier, London. s.140–195.
- Orpin, C.G. 1975. Studies in the Rumen Flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiology*, 91: 249–262.
- Orpin, C.G., 1976. Studies on the Rumen Flagellate *Sphaeromonas communis*. *Journal of General Microbiology*, 94: 270-280.
- Orpin, C.G. 1977a. The Occurrence of Chitin in the Cell Walls of the Rumen Organisms *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and *Sphaeromonas communis*. *Journal of General Microbiology*, 99: 215–218.

- Orpin, C.G. 1977b. The Rumen Flagellate *Piromonas communis*: Its Life History and Invasion of Plant Material in the Rumen. *Journal of General Microbiology*, 99: 107-117.
- Ozcan, N., Cunningham, C., Harris, W.J. 1996. Cloning of a Cellulase Gene from the Rumen Anaerobe *Fibrobacter succinogenes* SD35 and Partial Characterization of the Gene Product. *Letters in Applied Microbiology*, 22 (1): 85-89.
- Ozutsumi, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Itabashi, H. 2005. The Effect of Protozoa on the Composition of Rumen Bacteria in Cattle Using 16S rRNA Gene Clone Libraries. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69 (3): 499-506.
- Özel, O.T., Sariçiçek, B.Z. 2009. Ruminantlarda Rumen Mikroorganizmalarının Varlığı ve Önemi. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 2 (3): 277-285.
- Paillard, D., McKain, N., Chaudhary, L.C., Walker, N.D., Pizette, F., Koppova, I., McEwan, N.R., Kopečný, J., Vercoe, P.E., Louis, P., Wallace, R.J. 2007. Relation between Phylogenetic Position, Lipid Metabolism and Butyrate Production by Different Butyrivibrio-like Bacteria from the Rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91 (4): 417-422.
- Palmonari, A., Stevenson, D.M., Mertens, D.R., Cruywagen, C.W., Weimer, P.J. 2010. pH Dynamics and Bacterial Community Composition in the Rumen of Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 93 (1): 279-287.
- Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Mavrogonatou, E., Blom, J., Papandreou, N.C., Hamodrakas, S.J., Ferreira, S., Renault, P., Supply, P., Pot, B., Tsakalidou, E. 2014. Comparative Genomics of the Dairy Isolate *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 against Related Members of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* Complex. *BMC Genomics*, 15(1), 272.
- Patra, A.K., Yu, Z. 2012. Effects of Essential Oils on Methane Production, Fermentation, Abundance and Diversity of Rumen Microbial Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 4271–4280.

- Patra, A.K., Yu, Z. 2014. Effects of Vanillin, Quillaja Saponin, and Essential Oils on in Vitro Fermentation and Protein-Degrading Microorganisms of the Rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (2): 897-905.
- Patra, A.K., Yu, Z. 2013. Effective Reduction of Enteric Methane Production by a Combination of Nitrate and Saponin without Adverse Effect on Feed Degradability, Fermentation, or Bacterial and Archaeal Communities of the Rumen. *Bioresource Technology*, 148: 352-360.
- 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*). *Letters in Applied Microbiology*, 36: 377–381.
- Pérez, J., Munoz-Dorado, J., de la Rubia, T.D.L.R., Martinez, J. 2002. Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin: an Overview. *International Microbiology*, 5 (2): 53-63.
- Petri, R., Forster, R., Yang, W., McKinnon, J., McAllister, T. 2012. Characterization of Rumen Bacterial Diversity and Fermentation Parameters in Concentrate Fed Cattle With and Without Forage. *Journal of Applied Microbiology*, 112 (6): 1152–1162.
- Pitta, D., Kumar, S., Vecchiarelli, B., Shirley, D., Bittinger, K., Baker, L., Ferguson, J.D., Thomsen, N. 2014. Temporal Dynamics in the Ruminal Microbiome of Dairy Cows During the Transition Period. *Journal of Animal Science*, 92: 4014–4022.
- Pitta, D.W., Indugu, N., Kumar, S., Vecchiarelli, B., Sinha, R., Baker, L.D., Bhukya, B., Ferguson, J.D. 2016. Metagenomic Assessment of the Functional Potential of the Rumen Microbiome in Holstein Dairy Cows. *Anaerobe*, 38: 50-60.
- Pitta, D.W., Pinchak, W.E., Dowd, S.E., Osterstock, J., Gontcharova, V., Youn, E., Dorton, K., Yoon, I., Min, B.R., Fulford, J.D., Wickersham, T.A. 2010. Rumen Bacterial Diversity Dynamics associated with Changing from Bermuda Grass Hay to Grazed Winter Wheat Diets. *Microbial Ecology*, 59 (3): 511-522.

- Plaizier, J.C., Li, S., Le Sciellour, M., Schurmann, B.L., Górka, P., Penner, G.B. 2014. Effects of Duration of Moderate Increases in Grain Feeding on Endotoxins in the Digestive Tract and Acute Phase Proteins in Peripheral Blood of Yearling Calves. *Journal of Dairy Science*, 97: 7076–7084.
- Planas, A. 2000. Bacterial 1,3-1,4- β -Glucanases: Structure, Function and Protein Engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543 (2): 361-382.
- Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S. 2005. Xylanases From Fungi: Properties and Industrial Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67 (5): 577-591.
- Pope, P.B., Totsika, M., de Carcer, D.A., Schembri, M.A., Morrison, M. 2011. Muramidases Found in the Foregut Microbiome of the Tammar Wallaby Can Direct Cell Aggregation and Biofilm Formation. *The ISME Journal*, 5 (2): 341-350.
- Prajapati, V.S., Purohit, H.J., Raje, D.V., Parmar, N., Patel, A.B., Jones, O.A., Joshi, C.G. 2016. The Effect of a High-Roughage Diet on the Metabolism of Aromatic Compounds by Rumen Microbes: a Metagenomic Study using *Mehsani buffalo* (*Bubalus bubalis*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (3): 1319-1331.
- Privé, F., Newbold, C.J., Kaderbhai, N.N., Girdwood, S.G., Golyshina, O.V., Golyshin, P.N., Scollan, N.D., Huws, S.A. 2015. Isolation and Characterization of Novel Lipases/Esterases from a Bovine Rumen Metagenome. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 (13): 5475-5485.
- Qi, M., Jun, H.S., Forsberg, C.W. 2008. Cel9D, an Atypical 1, 4- β -d-glucan Glucohydrolase from *Fibrobacter succinogenes*: Characteristics, Catalytic Residues, and Synergistic Interactions with Other Cellulases. *Journal of Bacteriology*, 190 (6): 1976-1984.
- Qi, M., Jun, H.S., Forsberg, C.W. 2007. Characterization and Synergistic Interactions of *Fibrobacter succinogenes* Glycoside Hydrolases. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (19): 6098-6105.

- Rajendhran, J., Gunasekaran, P. 2008. Strategies for Accessing Soil Metagenome for Desired Applications. *Biotechnology Advances*, 26 (6): 576-590.
- Ramírez-Escudero, M., del Pozo, M.V., Marín-Navarro, J., González, B., Golyshin, P.N., Polaina, J., Ferrer, M., Sanz-Aparicio, J. 2016. Structural and Functional Characterization of a Ruminal β -Glycosidase Defines a Novel Subfamily of Glycoside Hydrolase Family 3 with Permuted Domain Topology. *Journal of Biological Chemistry*, 291 (46): 24200-24214.
- Ransom-Jones, E., Jones, D.L., McCarthy, A.J., McDonald, J.E. 2012. The Fibrobacteres: an Important Phylum of Cellulose-Degrading Bacteria. *Microbial Ecology*, 63 (2): 267-281.
- Rashamuse, K.J., Visser, D.F., Hennessy, F., Kemp, J., Roux-van der Merwe, M.P., Badenhorst, J., Ronneburg, T., Francis-Pope, R., Brady, D. 2013. Characterisation of Two Bifunctional Cellulase–Xylanase Enzymes Isolated from a Bovine Rumen Metagenome Library. *Current Microbiology*, 66 (2): 145-151.
- Rey, M., Enjalbert, F., Combes, S., Cauquil, L., Bouchez, O., Monteils, V. 2014. Establishment of Ruminal Bacterial Community in Dairy Calves from Birth to Weaning is Sequential. *Journal of Applied Microbiology*, 116 (2): 245-257.
- Rira, M., Morgavi, D.P., Popova, M., Marie-Magdeleine, C., Silou-Etienne, T., Archimède, H., Doreau, M. 2016. Ruminal Methanogens and Bacteria Populations in Sheep are Modified by a Tropical Environment. *Animal Feed Science and Technology*, 220: 226-236.
- Robe, P., Nalin, R., Capellano, C., Vogel, T. M., Simonet, P. 2003. Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology*, 39: 183-190.
- Royo, R., Mendoza, G.D., González, S.S., Landois, L., Barcena, R., Crosby, M.M. 2005. Effects of Exogenous Amylases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* on Ruminal Starch Digestion and Lamb Performance. *Animal Feed Science and Technology*, 123: 655-665.
- Rumbak, E., Rawlings, D.E., Lindsey, G.G., Woods, D.R. 1991. Cloning, Nucleotide Sequence, and Enzymatic Characterization of an Alpha-Amylase from the

- Ruminal Bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c. *Journal of Bacteriology*, 173 (13): 4203-4211.
- Russell, J.B., 2002. Rumen Microbiology and its Role in Ruminant Nutrition. Publishing Companies, Ithaca, NY. 121s.
- Russell, J.B., Muck, R.E., Weimer, P.J. 2009. Quantitative Analysis of Cellulose Degradation and Growth of Cellulolytic Bacteria in the Rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, 67: 183–197.
- Sahu, N.P., Kamra, D.N., Paul, S.S. 2004. Effect of Cellulose Degrading Bacteria Isolated from Wild and Domestic Ruminants on In Vitro Dry Matter Digestibility of Feed and Enzyme Production. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 17 (2): 199-202.
- Salonen, A., Nikkilä, J., Jalanka-Tuovinen, J., Immonen, O., Rajilić-Stojanović, M., Kekkonen, R.A., Palva, A., de Vos, W.M. 2010. Comparative Analysis of Fecal DNA Extraction Methods with Phylogenetic Microarray: Effective Recovery of Bacterial and Archaeal DNA using Mechanical Cell Lysis”, *Journal of Microbiological Methods*, 81: 127–134.
- Samal, L., Chaudhary, L.C., Agarwal, N., Kamra, D.N. 2015. Effect of Plants Containing Secondary Metabolites as Feed Additives on Rumen Fermentation and Rumen Microbial Profile of Buffaloes. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 15 (3): 427-437.
- Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Saminathan, M., Siew, C.C., Abdullah, N., Wong, C.M.V.L., Ho, Y.W. 2015. Effects of Condensed Tannin Fractions of Different Molecular Weights from a *Leucaena leucocephala* Hybrid on In Vitro Methane Production and Rumen Fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 (13): 2742-2749.
- Sandri, M., Manfrin, C., Pallavicini, A., Stefanon, B. 2014. Microbial Biodiversity of the Liquid Fraction of Rumen Content from Lactating Cows. *Animal*, 8 (04): 572-579.

- Sarian, F.D., Janeček, Š., Pijning, T., Ihsanawati, S.S., Nurachman, Z., Radjasa, O.K., Dijkhuizen, L., Natalia, D., van der Maarel, M.J.E.C. 2017. A New Group Of Glycoside Hydrolase Family 13 α -amylases with an Aberrant Catalytic Triad. *Scientific Reports*, 7: 1-10.
- Sánchez, C. 2009. Lignocellulosic Residues: Biodegradation and Bioconversion by Fungi. *Biotechnology Advances*, 27 (2): 185-194.
- Satoh, E., Niimura, Y., Uchimura, T., Kozaki, M., Komagata, K. 1993. Molecular Cloning and Expression of Two Alpha-Amylase Genes from *Streptococcus bovis* 148 in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (11): 3669-3673.
- Satoh, E., Uchimura, T., Kudo, T., Komagata, K. 1997. Purification, Characterization, and Nucleotide Sequence of an Intracellular Maltotriose-Producing Alpha-Amylase From *Streptococcus bovis* 148. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (12): 4941-4944.
- Schwarz, W.H., Zverlov, V.V., Bahl, H. 2004. Extracellular Glycosyl Hydrolases from Clostridia. *Advances in Applied Microbiology*, 56: 215–261.
- Selinger, L.B., Forsberg, C.W., Cheng, K.J. 1996. The Rumen: A Unique Source of Enzymes for Enhancing Livestock Production. *Anaerobe*, 2 (5): 263-284.
- Sehgal, J., Jit, D., Puniya, A., Singh, K. 2008. Influence of Anaerobic Fungal Administration on Growth, Rumen Fermentation and Nutrient Digestion in Female Buffalo Calves. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 17: 510–518.
- Seo, J.K., Park, T.S., Kwon, I.H., Piao, M.Y., Lee, C.H., Ha, J.K. 2013. Characterization of Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes of *Bacillus licheniformis* JK7 Isolated from the Rumen of a Native Korean Goat. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 26 (1): 50-58.
- Shanks, O.C., Kelty, C.A., Archibeque, S., Jenkins, M., Newton, R.J., McLellan, S.L., Huse, S.M., Sogin, M.L. 2011. Community Structures of Fecal Bacteria in Cattle From Different Animal Feeding Operations. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (9): 2992-3001.

- Shedova, E.N., Berezina, O.V., Lunina, N.A., Zverlov, V.V., Schwarz, W.H., Velikodvorskaya, G.A. 2009b. Cloning and Characterisation of a Large Metagenomic DNA Fragment Containing Glycosyl-Hydrolase Genes. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 24 (1): 12-16.
- Shedova, E.N., Lunina, N.A., Berezina, O.V., Zverlov, V.V., Schwartz, V., Velikodvorskaya, G.A. 2009a. Expression of the Genes CelA and XylA Isolated from a Fragment of Metagenomic DNA in *Escherichia coli*. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 24 (2): 76-81.
- Shimizu, M., Kinoshita, M., Fujita, J., Imai, S. 1983. Rumen Ciliate Protozoal Fauna and Composition of the Zebu Cattle (*Bos indicus*) and Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) in Philippines. *The Bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College*, 32: 83–88.
- Showalter, A.M. 1993. Structure and Function of Plant Cell Wall Proteins. *The Plant Cell*, 5 (1): 9-23.
- Simon, C., Daniel, R. 2011. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (4): 1153-1161.
- Singh, B., Bhat, T.K., Kurade, N.P., Sharma O.P. 2008a. Metagenomics in Animal Gastrointestinal Ecosystem: a Microbiological and Biotechnological Perspective. *Indian Journal Microbiology*, 48: 216–227.
- Singh, B., Gautam, S.K., Verma, V., Kumar, M., Singh, B. 2008b. Metagenomics in Animal Gastrointestinal Ecosystem: Potential Biotechnological Prospects. *Anaerobe*, 14: 138– 144.
- Singh, K.M., Ahir, V.B., Tripathi, A.K., Ramani, U.V., Sajnani, M., Koringa, P.G., Jakhesara, S., Pandya, P.R., Rank, D.N., Murty, D.S, Kothari, R.K., Joshi, C.G. 2012. Metagenomic Analysis of Surti Buffalo (*Bubalus Bubalis*) Rumen: a Preliminary Study. *Molecular Biology Reports*, 39 (4): 4841-4848.
- Singh, K.M., Jisha, T.K., Reddy, B., Parmar, N., Patel, A., Patel, A.K., Joshi, C.G. 2015. Microbial Profiles of Liquid and Solid Fraction Associated Biomaterial in Buffalo

- Rumen Fed Green and Dry Roughage Diets by Tagged 16S rRNA Gene Pyrosequencing. *Molecular Biology Reports*, 42 (1): 95-103.
- Souza, P.M.D, Magalhães P.D.O.E. 2010. Application of Microbial α -Amylase in Industry-A Review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41 (4): 850-861.
- Stam, M.R., Danchin, E.G., Rancurel, C., Coutinho, P.M., Henrissat, B. 2006. Dividing the Large Glycoside Hydrolase Family 13 into Subfamilies: Towards Improved Functional Annotations of α -amylase-Related Proteins. *Protein Engineering Design and Selection*, 19 (12): 555-562.
- Stevenson, D.M., Weimer, P.J. 2007. Dominance of *Prevotella* and Low Abundance of Classical Ruminant Bacterial Species in the Bovine Rumen Revealed by Relative Quantification Real-Time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75 (1): 165-174.
- Su, C., Lei, L., Duan, Y., Zhang, K. Q., Yang, J. 2012. Culture-Independent Methods for Studying Environmental Microorganisms: Methods, Application, and Perspective. *Applied Microbiology Biotechnology*, 93: 993–1003.
- Sudarman, A., Hayashida, M., Puspitaning, I.R., Jayanegara, A., Shiwachi, H. 2016. The Use of Cassava Leaf Silage as a Substitute for Concentrate Feed in Sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 48 (7): 1509-1512.
- Suen, G., Weimer, P.J., Stevenson, D.M., Aylward, F.O., Boyum, J., Deneke, J., Drinkwater, C., Ivanova, N.N., Mikhailova, N., Chertkov, O., Goodwin, L.A., 2011. The Complete Genome Sequence of *Fibrobacter succinogenes* S85 Reveals a Cellulolytic and Metabolic Specialist. *PloS One*, 6 (4): 1-15.
- Sundarram, A., Murthy, T.P.K. 2014. α -Amylase Production and Applications: a Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2 (4): 166-175.
- Sun, J., Wang, H., Lv, W., Ma, C., Lou, Z., Yao, H., Dai, Y. 2012. Cloning and Expression of a Thermostable β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23350. *Annals of Microbiology*, 62 (3): 1235-1242.

- Sun, Y.Z., Mao, S.Y., Zhu, W.Y. 2010. Rumen Chemical and Bacterial Changes during Stepwise Adaptation to a High-Concentrate Diet in Goats. *Animal*, 4 (02): 210-217.
- Suyub, I.B., 2014. The Biochemical and Microbiological Characteristics of Rumen Fluid From Cattle Co-Grazed With and Without Camels as Compared to That From the Foregut of Camels. Doktora Tezi. The University of Queensland University. School of Agriculture and Food Sciences. Australia. 300s.
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Benno, Y. 2001. Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Real-Time PCR. *Applied Environmental Microbiology*, 67: 2766–2774.
- Teather, R.M., Wood, P.J. 1982. Use of Congo Red—Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 777-780.
- Teather, R.M. 1982. Maintenance of Laboratory Strains of Obligately Anaerobic Rumen Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 44 (2): 499-501.
- Tekce, E., Gül, M. 2014. Ruminant Beslemede NDF ve ADF'nin Önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 9 (1): 63–73.
- Temizkan, G., Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 345s.
- Teng, D., Wang, J. H., Fan, Y., Yang, Y. L., Tian, Z. G., Luo, J., Yang, G.P., Zhang, F. (2006). Cloning of β -1,3-1,4-glucanase Gene from *Bacillus licheniformis* EGW039 (CGMCC 0635) and Its Expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72 (4): 705-712.
- Thurston, J.P., Grain, J. 1971. Holotrich Ciliates From the Stomach of *Hippopotamus amphibius*, with Descriptions of Two New Genera and Four New Species. *Journal Protozoology*, 18: 131–141.

- Uchiyama, T., Miyazaki, K. 2009. Functional Metagenomics for Enzyme Discovery: Challenges to Efficient Screening. *Current Opinion in Biotechnology*, 20: 616–622.
- Vance, C.P., Kilrk, T.K., Sherwood, R.T. 1980. Lignification as a Mechanism of Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 18: 259–288.
- Varner, J.E., Lin, L. 1989. Plant Cell Wall Architecture. *Cell*. 56: 231-239.
- Wallace, R.J., Rooke, J.A., Duthie, C.A., Hyslop, J.J., Ross, D.W., McKain, N., Souza, S.M.D., Snelling, T.J., Waterhouse, A., Roehe, R. 2014. Archaeal Abundance in Post-Mortem Ruminant Digesta May Help Predict Methane Emissions from Beef Cattle. *Scientific Reports*, 4: 1-8.
- Wang, Q., Luo, Y., He, B., Jiang, L.S., Liu, J.X., Wang, J.K. 2015. Characterization of a Novel Xylanase Gene from Rumen Content of Hu Sheep. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177 (7): 1424-1436.
- Wang, X., Li, X., Zhao, C., Hu, P., Chen, H., Liu, Z., Guowen, L., Wang, Z. 2012. Correlation Between Composition of the Bacterial Community and Concentration of Volatile Fatty Acids in the Rumen During the Transition Period and Ketosis in Dairy Cows. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (7): 2386-2392.
- Wang, G., Luo, H., Meng, K., Wang, Y., Huang, H., Shi, P., Pan, X., Yang, P., Diao, Q., Zhang, H., Yao, B. 2011a. High Genetic Diversity and Different Distributions of Glycosyl Hydrolase Family 10 and 11 Xylanases in the Goat Rumen. *PLoS One*, 6 (2): 1-10.
- Wang, G., Luo, H., Wang, Y., Huang, H., Shi, P., Yang, P., Meng, K., Bai, Y., Yao, B., 2011b. A Novel Cold-Active Xylanase Gene From the Environmental DNA of Goat Rumen Contents: Direct Cloning, Expression and Enzyme Characterization. *Bioresource Technology*, 102 (3): 3330-3336.
- Warner, C.D., Camci-Unal, G., Pohl, N.L., Ford, C., Reilly, P.J. 2012. Substrate Binding by the Catalytic Domain and Carbohydrate Binding Module of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 Xyloglucanase/Endoglucanase. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52 (1): 30-36.

- Weisburg, W.G, Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697-703.
- Welkie, D.G., Stevenson, D.M., Weimer, P.J. 2010. ARISA Analysis of Ruminant Bacterial Community Dynamics in Lactating Dairy Cows during the Feeding Cycle. *Anaerobe*, 16 (2): 94-100.
- Whitehead, T.R., Cotta, M.A. 1995. Identification of Intracellular Amylase Activity in *Streptococcus bovis* and *Streptococcus salivarius*. *Current Microbiology*, 30 (3): 143-148.
- Williams, A.G., Coleman, G.S. 1985. Hemicellulose Degrading Enzymes in Rumen Ciliate Protozoa. *Current Microbiology*, 12: 85–90.
- Williams, A.G. 1986. Rumen Holotrich Ciliate Protozoa. *Microbiological Reviews*, 50: 25-49.
- Wood P.J., Weisz J., Blackwell B.A. 1994. Structural Studies of (1→3), (1→4)-Betad-Glucans by C(13)-Nuclear Magnetic-Resonance Spectroscopy and by Rapid Analysis of Cellulose-Like Regions Using High-Performance Anion-Exchange Chromatography of Oligosaccharides Released by Lichenase. *Cereal Chemistry*, 71: 301–307.
- Wright, A.D.G., Williams A. J., Winder, B., Christophersen C.T., Rodgers S.L., Smith K.D. 2004. Molecular Diversity of Rumen Methanogens From Sheep in Western Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (3): 1263–1270.
- Wu, S., Baldwin, R.L., Li, W., Li, C., Connor, E.E., Li, R.W. 2012. The Bacterial Community Composition of the Bovine Rumen Detected using Pyrosequencing of 16S rRNA Genes. *Metagenomics*, 1: 1-11.
- Xia, Y., Kong, Y., Seviour, R., Yang, H.E., Forster, R., Vasanthan, T., McAllister, T. 2015. In Situ Identification and Quantification of Starch-Hydrolyzing Bacteria Attached to Barley and Corn Grain in the Rumen of Cows Fed Barley-Based Diets. *FEMS Microbiology Ecology*, 91 (8): 1-11.

- Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., Yadav, K. D. S. 2009. Pectin Lyase: a Review. *Process Biochemistry*, 44 (1): 1-10.
- Yang, L.Y., Chen, J., Cheng, X.L., Xi, D. M., Yang, S.L., Deng, W.D., Mao, H.M. 2010. Phylogenetic Analysis of 16S rRNA Gene Sequences Reveals Rumen Bacterial Diversity in Yaks (*Bos grunniens*). *Molecular Biology Reports*, 37 (1): 553-562.
- Yavuz, M. 2005. Deterjan Lif Sistemi. *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22 (1): 93-96.
- Yeates, C., Gillings, M.R., Davison, A.D., Altavilla, N., Veal, D.A. 1998. Methods for Microbial DNA Extraction from Soil for PCR Amplification. *Biological Procedures Online*, 1, 40-47.
- Yener, F., Yücebilgiç, G. 2010. Pektinaz Enziminin Farklı İki Destek Üzerine İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 22 (3): 117- 124.
- York, W.S., Darvill, A.G., McNeil, M., Stevenson, T.T., Albersheim, P. 1986. Isolation and Characterization of Plant Cell Walls and Cell Wall Components. *Methods in Enzymology*, 118: 3-40.
- Yu, Z., Morrison, M. 2004. Improved Extraction of PCR-quality Community DNA from Digesta and Fecal Smples. *BioTechniques*, 36 (5): 808-812.
- Zhang, B.W., Li, M., Ma, L.C., Wei, F.W. 2006. A Widely Applicable Protocol for DNA Isolation from Fecal Samples. *Biochemical Genetics*, 44 (11): 503-512.
- Zhang, G., Li, S., Xue, Y., Mao, L., Ma, Y. 2012. Effects of Salts on Activity of Halophilic Cellulase with Glucomannanase Activity Isolated from Alkaliphilic and Halophilic *Bacillus* sp. BG-CS10. *Extremophiles*, 16: 35–43.
- Zhang, Y., Gao, W., Meng, Q. 2007. Fermentation of Plant Cell Ralls by Ruminant Bacteria, Protozoa and Fungi and Their Interaction with Fibre Particle Size. *Archives of Animal Nutrition*, 61 (2): 114-125.
- Zhao, S., Wang, J., Bu, D., Liu, K., Zhu, Y., Dong, Z., Yu, Z. 2010. Novel Glycoside Hydrolases Identified by Screening a Chinese Holstein Dairy Cow Rumen-

- Derived Metagenome Library. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (19): 6701-6705.
- Zhou, J., Bruns, M.A., Tiedje, J.M. 1996. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (2): 316–322.
- Zhou, Z., Meng, Q., Yu, Z. 2011. Effects of Methanogenic Inhibitors on Methane Production and Abundance of Methanogen and Cellulolytic Bacteria in In-vitro Ruminal Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 2634–2639.
- Zhou, Z., Yu, Z., Meng, Q. 2012. Effects of Nitrate on Methane Production, Fermentation, and Microbial Populations in In vitro Ruminal Cultures. *Bioresource Technology*, 103: 173–179.
- Zoetendal, E. G., Raes, J., Van Den Bogert, B., Arumugam, M., Booijink, C. C., Troost, F. J., Bork, P., Wels, M., de Vos, W.M., Kleerebezem, M. 2012. The Human Small Intestinal Microbiota is Driven by Rapid Uptake and Conversion of Simple Carbohydrates. *The ISME Journal*, 6 (7): 1415-1426.
- Zorec, M., Vodovnik, M., Marinšek-Logar, R. 2014. Potential of Selected Rumen Bacteria for Cellulose and Hemicellulose Degradation. *Food Technology and Biotechnology*, 52 (2): 210-221.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Dilek ÖZGÜN EKİZ
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 20.11.1982 Karaman
Medeni hali : Evli
Telefon : 0 (344) 300 14 15
e-posta : dilekozgun@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Selçuk Üniversitesi Biyoloji ABD	2009
Lisans	Selçuk Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2006
Ön lisans	Marmara Üniversitesi Patoloji Lab.	2003
Lise	Karaman İmam Hatip Lisesi	1999

İş Denevimi

Yıl	Yer	Görev
2012-2016	KSÜ	Araştırma Görevlisi
2002-2003	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	Sağlık Teknikeri

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI, SSCI, Arts and Humanities)

1. Comlekcioglu U., Gunes M., Altun H., **Ozgun Ekiz D.**, Aygan A., (2017). Coexpression of rumen fungal xylanase and bifunctional cellulase genes in *Escherichia coli*. Brazilian Archives of Biology and Technology. 60, 1-10.

Uluslararası diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Yavuz A., **Özgün Ekiz D.**, Kenger İ., Çömlekcioglu U. (2016). Metagenomic DNA isolation from sheep feces and PCR detection of several rumen bacteria, Eurasian Journal of Veterinary Sciences, Vol: 32 (1), 15-21.
2. Basak S., **Ozgun D.**, Ozdemir S., Cinar O. (2015). The inhibition effect of ozonation in textile wastewater, World Journal of Environmental Research, 05 (1): 129-136.
3. Basak S., **Ozgun D.**, Cinar O. (2014). The effect of external feed source on color removal with algae in real textile wastewater, Journal of Selçuk University Natural and Applied Science, Special Issue ICOEST 2014, Part 1, 225-233.
4. Hatice U., Basak S., **Ozgun D.**, Cinar O. (2014): The effect of ozonation on different caffeine concentrations in domestic wastewaters. International Journal Engineering Natural Resources. 1 (3): 158-163.
5. **Ozgun D.**, Basak S., Cinar O. (2014). The inhibition effect of three different pharmaceuticals in domestic wastewater World Journal of Environmental Research. 4 (1): 1-6.
6. **Ozgun D.**, Basak S., Cinar O. (2012). Current molecular biological techniques for anaerobic ammonium oxidizing (Anammox) bacteria. Sixteenth International Water Technology Journal, 2(3), 224-235.
7. Vural H.C., **Ozgun D.** (2011). An improving DNA isolation method for identification of anaerobic bacteria in human colostrum and faeces samples. Journal of Medical Genetics and Genomics. 3(5), 95–100.

8. **Ozgun D.**, Vural H.C. (2011). Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens babies and human milk colostrum by API 50 CHL system. Journal of Medical Genetics and Genomics. 3(3), 46– 49.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. Basak S., **Ozgun D.**, Cınar O. Textile wastewater treatment potential of algae. The International Conference on Science, Ecology and Technology I (Iconsete'2015), Vienna, Austria 25.08.2015- 28.08.2015.
2. Basak S., **Ozgun D.**, Cınar O. Shock resistance capacity of algae against to the real textile wastewater, VII. International Symposium on Ecology and Environmental Problems, Antalya, Turkey. 18.12.2013-21.12.2013.
3. **Ozgun D.**, Basak S., Cınar O. 2013. The inhibition effect of three different pharmaceuticals in domestic wastewater. Global Conference on Soil, Water, Energy, Air and Environment. Antalya, Turkey. 08.11.2013-10.11.2013.
4. **Ozgun D.**, Basak S., Cınar O. The Effect of ozonation in textile wastewater. Proceedings of the Second International Conference on Water, Energy and the Environment Kusadası, 354, Turkey. 21.09.2013-24.09.2013.
5. Cırık K., Başak S., Kılıç A., **Özgün D.**, Akman D., Özdemir Ş., Çınar Ö. The Decoloration Methods of Textile wastewater. Second International Conference on Water, Energy and the Environment Kusadası, 295, Turkey, 21.09.2013-24.09.2013.
6. **Özgün D.**, Başak S., Çınar Ö. (2013). The effect of nitrite inhibition in autotrophic denitrification proses. 3th. International Bursa Water Congress and Exhibition, 1210. Bursa, Turkey. 22.03.2013-24.03.2013.

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Başak S., **Özgün D.**, Çınar Ö. (2014). Alglerle biyoyakıt üretiminde atıksuyun kullanımı. İÜ. Su Ürünleri Dergisi, 29 (1): 93-102.
2. Kılıç A., **Özgün D.**, Başak S., Cuci Y., Çınar Ö. (2012). Pestisit Kaynaklı Endosülfanın Yeraltı Sularının Arıtımında Kükürt Bazlı Ototrofik Denitrifikasyona Etkisi. KSÜ Doğa Bil. Derg. 16 (2), 48-55.
3. **Özgün D.**, Başak S., Cırık K., Kılıç A., Akman D., Özdemir Ş., Çınar Ö. (2012). Anammox Bakterilerinin Zenginleştirilmesinde Farklı Dolgu Malzemelerinin

Etkisi. Tarih Kültür ve Sanat Araştırmaları Dergisi (Tüketim Toplumu ve Çevre Özel Sayısı) 1(4), 458-467.

4. Özdemir Ş., Akman D., Cırık K., Başak S., Kılıç A., **Özgün D.**, Çınar Ö. (2012). Farklı Hidrolik Bekletme Sürelerinin Anaerobik Perdeli Reaktörde Sülfat İndirgenmesi Üzerine Etkisi. Tarih Kültür ve Sanat Araştırmaları Dergisi (Tüketim Toplumu ve Çevre Özel Sayısı) 1(4), 487-496.
5. Kılıç A., Başak S., Cırık K., **Özgün D.**, Akman D., Özdemir Ş., Sahinkaya E., Çınar Ö. (2012). İçme Sularından Nitrat Gideriminde İkincil Kirleticilerin Denitrifikasyona Etkisi. Tarih Kültür ve Sanat Araştırmaları Dergisi (Tüketim Toplumu ve Çevre Özel Sayısı) 1(4), 475-486.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. **Özgün Ekiz D.**, Çömlekcioglu U. *Streptococcus bovis* amilaz geninin klonlanması ve moleküler karakterizasyonu. 1. Ulusal Tarımsal Biyoteknoloji Kongresi, Samsun, Türkiye, 01.06.2016- 03.06.2016 (sözlü sunum).
2. **Özgün Ekiz D.**, Çömlekcioglu U. Ruminant dışkılarından izole edilen metagenomik DNA'dan enzim genlerinin taranması, klonlanması ve tanımlanması. 1. Ulusal Tarımsal Biyoteknoloji Kongresi, Samsun, Türkiye, 01.06.2016- 03.06.2016 (poster).
3. Çömlekcioglu U., **Özgün Ekiz D.**, Kenger İ. Rumen sıvısı ve ruminant dışkılarından *Clostridium* izolasyonu ve filogenetik analizi. 1. Ulusal Tarımsal Biyoteknoloji Kongresi, Samsun, Türkiye, 01.06.2016- 03.06.2016 (poster).
4. **Özgün D.**, Başak S., Çınar Ö. (2013). Evsel atıksulardaki bazı kimyasal maddelerin aktif çamur üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmesi. Gümüşhane Üniversitesi Uluslararası Katılımlı Çevre Sempozyumu. 94, Gümüşhane, Türkiye. 24.10.2013-26.10.2013 (sözlü sunum).
5. Başak S., **Özgün D.**, Çınar Ö. (2013). Naftalin sülfonatın alıcı ortala etkisi ve arıtımı. Aksaray Üniversitesi Baki Canik Su Medeniyeti Sempozyumu, 66, Aksaray, Türkiye. 07.10.2013-09.10.2013 (poster).
6. Başak S., **Özgün D.**, Çınar Ö. (2013). Zenobiyotiklerin toksikolojik etkilerinin QSAR ile belirlenmesi. Aksaray Üniversitesi Baki Canik Su Medeniyeti Sempozyumu, 83, Aksaray, Türkiye. 07.10.2013-09.10.2013 (poster).

7. **Özgün D.**, Başak S., Çınar Ö. 2013. Çimento ve betonun çevreye etkisi. Aksaray Üniversitesi Baki Canik Su Medeniyeti Sempozyumu, 94, Aksaray, Türkiye. 07.10.2013-09.10.2013 (poster).
8. **Ozgun D.**, Başak S., Çınar Ö. (2012). Atıksularda Bulunan Bazı Temel Farmasötiklerin İnsan ve Çevreye Etkileri. 1. Ulusal Sağlık Kuruluşları Çevre Yönetimi Sempozyumu, İstanbul, Türkiye. 29.11.2012-30.11.2012 (sözlü sunum).
9. Akman D., Özdemir Ş., Cırık K., Başak S., **Özgün D.**, Kılıç A., Çınar Ö. (2012). Nitrifikasyon Prosesinin Farklı Reaksiyon Süreleri Altında İncelenmesi. Tüketim Toplumu ve Çevre Sempozyumu 2012. 16-17 Kasım. Karabük.

