T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANAEROBİK GUT FUNGUSLARININ İZOLASYONU, UZUN SÜRELİ MUHAFAZALARI, YAĞ ASİDİ VE KONJUGE LİNOLEİK ASİT ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TUĞÇE TURGUT

DOKTORA TEZİ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2023

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANAEROBİK GUT FUNGUSLARININ İZOLASYONU, UZUN SÜRELİ MUHAFAZALARI, YAĞ ASİDİ VE KONJUGE LİNOLEİK ASİT ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TUĞÇE TURGUT

DOKTORA TEZİ

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2023

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.

Tuğçe TURGUT

Bu çalışma KSÜ Bilimsel Araştırma Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir.
BAP Proje No: 2021/6-17D

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ANAEROBİK GUT FUNGUSLARININ İZOLASYONU, UZUN SÜRELİ MUHAFAZALARI, YAĞ ASİDİ VE KONJUGE LİNOLEİK ASİT ÜRETİM POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI
(DOKTORA TEZİ)

TUĞÇE TURGUT

ÖZET

Anaerobik gut fungusları (AGF) ve anaerobik rumen bakterileri ruminant, ruminant olmayan ve tek mideli hayvanların sindirim sistemlerinde yaşayan zorunlu anaerobik fibrolitik mikroorganizmalardır. Bu organizmalar herbivorların sindirim kanalının tüm bölgeleri ile dışkılarından izole edilebilirler. Bu çalışmada ruminant dışkılarından izole edilen ve *Feramyces sp* GMLF 30, *Neocallimastix frontalis* GMLF 66, *Caecomyces sp* GMLF 77, *Feramyces sp* GMLF 90, *Neocallimastix sp* GMLF 92, *Feramyces sp* GMLF 113 ve *Piromyces sp* GMLF 202 olarak adlandırılan 7 adet anaerobik gut fungusunun saflaştırması ve kısmi moleküler tanımlaması başarıyla gerçekleştirilmiştir. Ayrıca anaerobik gut funguslarının uzun süreli muhafazasında başarı oranının artırılmasına yönelik olarak farklı yöntemler araştırılmıştır. Buna göre roll tüp agar ve eğik agar içerisinde kültüre alınan AGF farklı sıcaklıklarda ve bunların kombinasyonunda çalışılmıştır. En etkin aktifleşme oranı eğik agar ile %15 gliserol kullanıldığında doğrudan -196 ^{o}C'de muhafaza işleminde elde edilmiştir. İzole edilen AGF ile bazı rumen bakterilerinin saf kültür ve kokültür olarak yetiştirildiklerinde sentezledikleri yağ asidi kompozisyonları belirlenmiştir. AGF'ler tarafından formasyonu gerçekleştirilen palmitik asit, stearik asit, oleik asit, behenik asit, linoleik asit ve konjuge linoleik asit miktarlarının diğer yağ asitlerine oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. En yüksek konjuge linoleik asit üretimi saf kültürlerde *Piromyces sp* 202 izolatında ölçülürken, kokültür denemelerinde en yüksek konjuge linoleik asit üretimi ise *Ruminococus albu*s SY3 ile *Butrivibrio fibrisolvens* bakterileri tarafından gerçekleştirilmiştir (bakteri x bakteri kokültür). AGF kokültür denemelerinde ise en yüksek konjuge linoleik asit formasyonu *Butrivibrio fibrisolvens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77 (bakteri x AGF kokültür) izolatında elde edilmiştir. En yüksek konjuge linoleik asit formasyonu *Caecomyces sp* GMLF77 ile *Neocallimastix* sp GMLF92 (AGF x AGF kokültür) izolatlarının kokültüründe elde edilmiştir. AGF tarafından formasyonu gerçekleştirilen yağ asitlerinin bazı patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkileri belirlenmesi tezin diğer bir araştırma konusunu oluşturmuştur. Ayrıca AGF tarafından formasyonu gerçekleştirilen yağ asitlerinin *Listeria monocytogenes* DSM215675, *Listeria monocytogenes* DSM219094, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC11778, *Escherichia coli* ATC24922, *Salmonella enterica* üzerine muhtemel antimikrobiyal etkileri incelenmiş ve sadece *E.coli* üzerinde yağ asitlerinin antimikrobiyal etkisi gözlemlenmemiştir. Son aşamada ise linoleat izomeraz enzimini kodlayan gen bölgesi için NCBI da yer alan oligonükleotid dizileri kullanılarak primer tasarımı gerçekleştirilmiştir. Bu primerler kullanılarak laboratuvarımız kültür koleksiyonun da yer alan 9 fungal izolat (GMLF 7, GMLF 10, GMLF 20, GMLF 22, GMLF 23, GMLF 25, GMFL 28, GEMLF 33 ve GMLF 45) için PZR ile bu enzimi kodlayan gen bölgesinin varlığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: AGF, rumen, linoleik asit, konjuge linoleik asit, yağ asitleri, anaerobik rumen bakteri, saklama şartları

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
ZootekniAna Bilim Dalı, Ocak/2023

Birinci Danışman: Prof. Dr. Emin ÖZKÖSE
Sayfa sayısı: 215

INVESTIGATION OF FATTY ACID AND CONJUGE LINOLEIC ACID PRODUCTION OF ANAEROBIC GUT FUNGİ

(Ph. D. THESIS)

TUĞÇE TURGUT

ABSTRACT

Anaerobic gut fungi (AGF) and anaerobic rumen bacteria are obligate anaerobic and fibrolytic microorganisms living in the digestive tracts of ruminant, non-ruminant and monogastric animals. They could be isolated from all parts of the digestive tract and faeces of these herbivores. In this study, 7 fungi isolated (from faeces), purified and partialy characterised using molecular tools and designated as *Feramyces sp* GMLF 30, *Neocallimastix frontalis* GMLF 66, *Caecomyces s*p GMLF 77, *Feramyces sp* GMLF 90, *Neocallimastix sp* GMLF 92, *Feramyces sp* GMLF 113 and *Piromyces sp* GMLF 202. In addition, different methods have been investigated to increase the survival rate of anaerobic gut fungi during long-term preservation. Accordingly, AGF cultured in roll tube agar and inclined agar was studied at different temperatures and their combination. The most effective survival rate was observed when the AGF were stored at -196 ^{o}C directly when using 15% glycerol with inclined agar. When isolated AGF and some rumen bacteria were grown as pure culture and coculture, their fatty acid compositions were also determined and in this context, palmitic acid, stearic acid, oleic acid, behenic acid, linoleic acid and conjugated linoleic acid amounts formed by AGFs were higher than other fatty acids. While the highest production of conjugated linoleic acid was measured in pure cultures of *Piromyces* sp 202, the highest production of conjugated linoleic acid in coculture experiments was performed by the bacteria *Ruminococus albus* SY3 and *Butrivibrio fibrisolvens* (bacteria x bacteria coculture). In the AGF coculture experiments, the highest conjugated linoleic acid formation was obtained in *Butrivibrio fibrisolvens* JW11 and *Caecomyces sp* GMLF 77 isolates (bacteria x AGF coculture). The highest formation of conjugated linoleic acid was obtained in coculture of *Caecomyces sp* GMLF77 and *Neocallimastix sp* GMLF92 isolates (AGF x AGF coculture). Possible antimicrobial effects of fatty acids formed by AGF against *L. monocytogenes* DSM215675, *L. monocytogenes* DSM219094, *St. aureus* ATCC 29213, *B. cereus* ATCC11778, *E. coli* ATC24922, *Sal. enterica* were also investigated. Results showed that only *E. coli* was not effected from that fatty acids. In the last step, primer designing was performed for the gene region encoding the linoleate isomerase enzyme, using the oligonucleotide sequences in NCBI. Using these primers, the presence of the gene region encoding this enzyme by PCR for 9 fungal isolates (GMLF 7, GMLF 10, GMLF 20, GMLF 22, GMLF 23, GMLF 25, GMFL 28, GEMLF 33 and GMLF 45 - all deposited in our culture collection) were determined.

Key Words: AGF, rumen, Conjugated linoleic acid, linoleic acid, fatty acids

Kahramanmaras Sutcu Imam University
Institute in Science
Department of Animal Science, January / 2023

Supervisor: Prof. Dr. Emin ÖZKÖSE
Page number: 215

TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesi, çalışmanın yürütülmesi ve yazım aşamasında beni yönlendiren danışman hocam sayın Prof. Dr. Emin ÖZKÖSE'ye, değerli hocalarım Prof. Dr. M. Sait EKİNCİ, Prof. Dr. İsmail AKYOL, Doç. Dr. Yekta GEZGİNÇ 'e; tüm analizler sırasında destek ve yardımını esirgemeyen değerli iş arkadaşlarım Arş. Gör. Hazel Dilşad TATAR ve Arş. Gör. Sermet AYMAN'a, Bölümümüz doktora öğrencisi Halit YÜCEL'e, laboratuvar aşamalarında bana yardımcı olan Bölümümüz Yüksek Lisans öğrencileri Ayşe Nur TANIŞ, Nibal HAMAM, Kübra EKİNCİ 'ye; Bölümümüz öğrencileri Kemal GÜRLER, Aziz BOLAT ve Hülya AKÇAM'a tezin yürütülmesi süresince desteğini eksik etmeyen Emine Didem ELMAS'a ve eğitimim süresince desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen başta babam Ali TURGUT ve annem Hatice TURGUT olmak üzere aileme sonsuz teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca bana desteğini esirgemeyen fikirleri ile yol gösteren dayım Seyhan GÜRDAL' a teşekkürü bir borç bilirim.

Tuğçe TURGUT

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**

ABSTRACT ..... **ii**

TEŞEKKÜR ..... **iii**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **ix**

EK ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xix**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Ruminant Hayvanlar 1

1.2. Ruminantların Sindirim Sistemi 3

1.3. Rumen ve Mikrobiyal Ekosistemi 5

1.3.1. Rumen Mikroorganizmaları 6

1.3.1.1. Rumen Bakterileri 8

1.3.1.2. Rumen Bakterileriyofajları 11

1.3.1.3. Rumen Protozoanları 11

1.3.1.4. Rumen Arkea Grubu 13

1.3.1.5. Anaerobik Gut Fungusları 14

1.3.1.5.1 Anaerobik Gut Funguslarının Taksonomisi 18

1.3.1.5.2 Anaerobik Gut Funguslarının Yaşam Döngüleri 19

1.4. Moleküler Sistematik 22

1.5. Mikroorganizmaların Muhafazası 22

1.6. Yağlar 24

1.6.1. Yağların Genel Özellikleri Ve Fonksiyonları 25

1.6.2. Yağların Sınıflandırılması 25

1.6.3. Yağ Asitleri 25

1.6.3.1. Doymuş Yağ Asitleri 26

1.6.3.2. Doymamış Yağ Asitleri 26

1.6.4. Uçucu Yağ Asitleri 29

1.6.5. Trans Yağ Asitleri 29

1.7. Mikrobiyal Yağ Asitleri 29

1.7.1. Konjuge Linoleik Asit, Yapısı ve Biyosentezi 32

1.7.1.1. KLA'nın Dokularda Sentezi 32
1.7.1.2. Rumende KLA'nın Biyosentezi 33
1.8. Konjuge Linoleik Asit (KLA) Sentez Enzimleri 34
1.9. Gıdalarda KLA 35
1.10. KLA'nın İnsan Sağlığındaki Yeri ve Önemi 35
1.11. Tezin Amacı ve Kapsamı 37
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 40
3. MATERYAL VE METOT 44
3.1. Materyal 44
3.1.1. Kimyasallar 44
3.1.2. Cihazlar 44
3.1.3. Kullanılan Mikroorganizmalar 44
3.1.3.1. Anaerobik Gut Fungusları 44
3.1.4. Anaerobik Gut Bakterileri ve Laktik Asit Bakterileri 45
3.2. Metot 46
3.2.1. Anaerobik Bazal Mediumun Hazırlanması 46
3.2.2. Rumen Sıvısının Elde Edilmesi 48
3.2.3. Dışkıdan Fungus İzolasyonu Saflaştırma ve Aktifleştirilmesi 48
3.2.4. Kültür Koleksiyonundan Anaerobik Rumen Bakterilerinin Geliştirilmesi 51
3.2.5. Patojen Bakterilerin Geliştirilmesi 52
3.2.6. Alt Kültür Çalışmaları 52
3.2.7. Anaerobik Besi Yerindeki Mikrobiyal Kontaminasyonunun Engellenmesi 53
3.2.8. Anaerobik Gut Funguslarında (AGF) DNA izolasyonu 53
3.2.9. Anaerobik Gut Funguslarının Morfolojik Tanımlamaları 54
3.2.10. ITS (International Transcript Space) Bölgesi Primer Tasarlanması 54
3.2.11. Linoleat İzomeraz Gen Bölgesinin Belirlenmesi 55
3.2.12. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 57
3.2.13. DNA Dizi Analizi 59
3.2.14. Filogenetik Sınıflandırma 61
3.2.15. Uzun Süreli Muhafaza Deneme Deseni 61
3.2.16. Yağ Asidi Analizi 62

3.2.17. Lipid Ekstraksiyonu 63
3.2.18. Gaz Kromotografi (GC) Çalışmaları 63
3.2.19. Konjuge Linoleik Asit (KLA) standardının Gaz Kromotografi (GC) okumaları için Hazırlanması 66
3.3. Yağ Asitlerinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi 67
3.3.1. Linoleik Asit ve Konjuge Linoleik asitin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi 67
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 68
4.1. Dışkıdan İzole Edilen, Saflaştırılan AGF'lerin, Morfolojik Tanımlamaları ve Muhafazaları 68
4.1.1. Anaerobik Gut Funguslarından Kromozomal DNA İzolasyonu ve Moleküler Tanımlaması 74
4.1.2. İzolatların ITS Gen Bölgesinin Tanımlanması 74
4.1.3. İzolatların DNA Dizi Analizileri 75
4.1.3.1. *Feramyces sp*. GMLF 30 75
4.1.3.2. *Neocallimastix sp* GMLF 66 77
4.1.3.3. *Caecomyces sp* GMLF 77 79
4.1.3.4. *Feramyces sp* GMLF 90 81
4.1.3.5. *Neocallimastix sp* GMLF 92 82
4.1.3.6. *Feramyces sp.* GMLF 113 84
4.1.4. AGF İzolatlarının Filogenetik Yerlerinin Belirlenmesi 85
4.2. AGF'lerin Uzun Süreli Muhafaza Yöntemine Göre Gelişim Oranları 94
4.3. Anaerobik Gut Fungusları ve Anaerobik Gut Bakterilerinin Yağ Asiti Kompozisyonlarının Belirlenmesi 102
4.3.1. Gaz Kromotografi İle Mikrobiyal Yağ Asidi Kompozisyonunun Analizi 102
4.3.2. *Butrivibrio fibrisolvens* JW11 Suşuna Ait Yağ Asiti Kompozisyonları 103
4.3.3. *Ruminococcus albus* SY3 Suşuna Ait Yağ Asidi Kompozisyonları 106
4.3.4. *Orpinomyces sp* GMLF 19 İzolatına Ait Yağ Asidi Kompozisyonu 108
4.3.5. *Feramyces sp* GMLF 30 İzolatına Ait Yağ Asidi Kompozisyonu 110
4.3.6. *Caecomyces sp* GMLF 77 Yağ Analizi Sonucu 113
4.3.7. *Feramyces sp* GMLF 92 İzolatına Ait Yağ Asidi Kompozisyonu 115
4.3.8. *Piromyces sp* GMLF 202 İzolatına Ait Yağ Analizi Sonucu 118

4.3.9. *Ruminococus albu*s SY3 ve *Feramyces sp* GMLF 30 Kokültür Gelişimlerine Ait Yağ Asiti Kompozisyonları 121
4.3.10. *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 ve *Caecomyces s*p GMLF 77 Kokültür Gelişimlerine Ait Yağ Asidi Kompozisyonu 123
4.3.11. *Ruminococcus albus* SY3 Caecomyces sp. GMLF 77 Kokültür Gelişimlerine Ait Yağ Asidi Kompozisyonları 125
4.3.12. *Butrivibriyo fibrisolven*s JW11 ve *Ruminococcus albu*s SY3 Kokültürüne Ait Yağ Asidi Kompozisyonu 128
4.3.13. *Feramyces sp*. GMLF 30 ve *Caecomyces s*p GMLF 77 Kokültür Gelişimlerinin Yağ Analizi Sonucu 130
4.3.14. *Feramyces sp* GMLF 30 ve *Neocallimastix s*p GMLF 92 Kokültür Gelişimlerinin Yağ Analizi Sonucu 133
4.3.15. *Caecomyces sp.* GMLF 77 ve *Neocallimastix sp* Fungus GMLF 92 Kokültür Gelişimlerinin Yağ Analizi Sonucu 135
4.4. Ticari Linoleik Asitin Patojen Bakteriler Üzerine Antimikrobiyal Etkisi 138
4.4.1. Linoleik Asitin *Staphylococcus aeureus* ATCC29213 üzerine Antimikrobiyal Etkisi 139
4.4.2. Linoleik Asitin *Salmonella enterica* üzerine antimikrobiyal etkisi 140
4.4.3. Linoleik Asitin *Listeria monocytogenes* DSM215675 üzerine antimikrobiyal Etkisi 141
4.4.4. Linoleik Asitin *Listeria monocytogenes* DSM219094 üzerine antimikrobiyal Etkisi 142
4.4.5. Linoleik Asitin *Bacillus cereus* ATCC11778 üzerine antimikrobiyal etkisi 143
4.4.6. Linoleik Asitin *Escherichia coli* ATCC25922 üzerine antimikrobiyal etkisi 144
4.4.7. Ticari Konjuge Linoleik Asitin Antimikrobiyal Etkisi 145
4.4.7.1. Konjuge Linoleik Asitin *Staphylococcus aeureus* ATCC29213 üzerine Antimikrobiyal Etkisi 146
4.4.7.2. Konjuge Linoleik Asitin *Salmonella enterica* üzerine antimikrobiyal etkisi. 146
4.4.7.3. Konjuge Linoleik Asitin *Listeria monocytogenes* DSM219094 üzerine antimikrobiyal Etkisi 147

4.4.7.4. Konjuge Linoleik Asitin *Listeria monocytogenes* DSM215675 üzerine antimikrobiyal Etkisi 148
4.4.7.5. Konjuge Linoleik Asitin *Bacillus cereus* ATCC11778 üzerine antimikrobiyal Etkisi 149
4.4.7.6. Konjuge Linoleik Asitin *Escherichia coli* ATCC 25922 üzerine antimikrobiyal etkisi 150
4.4.7.7. Bakteri Ve AGF'lerden Elde Edilen Yağ Asiti Kompozisyonunun Antimikrobiyal Etkisi 151
4.5. Linoleat İzomeraz Gen Bölgesi Tespiti 158
4.5.1. Linoleate izomeraz Gen Bölgesinin Tanımlanması 161
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 163
KAYNAKLAR 168
EKLER 187
EK ŞEKİLLER ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ 214

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AGF	Anaerobik Gut Fungusu
°C:	Santigrat derece
g:	Gram
mL:	Mililitre
mmol:	Milimol
cm:	Santimetre
µg:	Mikrogram
µL:	Mikrolitre
% :	Yüzde
MeOH	Metil alkol
EtOH:	Etil alkol
DMF:	Dimetilformamid
DMSO:	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
RNA	Ribo nükleik asit
ITS	Internal Transcript Spacer
LSU	Large Subunit
SSU	Small Subunit
ETS	External Transcript Spacer
IGS	Intergenic Spacer
ppm	Parts per million
CTAB	Cetyle Trimetil Amonium Bromide
TBE	Trisma Borikasit EDTA
TE	Tris- HCl EDTA
EDTA	Ethylendiamin Tetra Acetic Acid
HCl	Hidroklorik asit
NaCl	Sodyum Klorür
dk	Dakika
ng	Nano Gram
NCBI	National Center of Biotechnology Information
dNTP	Deoksiribo Nükleozid Trifosfat

$MgCl_2$	Magnezyum Klorid
F	Forward
R	Revese
bç	Baz Çifti
BLAST	Basic Local Aligment Search Tool
N	Normal
PBS	Phosphate Buffered Saline
OD	Optical Density
FID	Flame Ionization Detection
BİGEM	Biyoteknoloji Genetik Mühendisliği
NJ	Neighbor Joining

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bazı ruminant hayvanlar 2
Şekil 1.2 Ruminant hayvanlarda sindirim sistemi düzeninin şematik gösterimi 4
Şekil 1.3 a. Elektron mikroskobu ile görüntülenmiş protozoanlara ait bir hücre yapısı (10μm) b. besin materyaline tutunmuş anaerobik gut fungusları (bu çalışmada) 6
Şekil 1.4. Rumen mikroorganizmalarının rumendeki rolleri 7
Şekil 1.5 Herbivorlar dışında sindirim sistemlerinde Anaerobik gut fungus bulunduran canlılar 15
Şekil 1.6 AGF'lerin mikroskop görüntüsü, a. Küresel rizoidal yapıya sahip funguslara ait mikroskop görüntüsü, b. Flamentli bir rizodial yapıya sahip fungus mikroskop görüntüsü 19
Şekil 1.7 Anaerobik gut funguslarında yaşam döngüsü, ... 21
Şekil 1.8 Ribozomal RNA operonu şeması 22
Şekil 1.9 Bütirik asit açık formülü 30
Şekil 1.10 Stearik asit açık formülü 30
Şekil 1.11 Oleik asit açık formülü 30
Şekil 1.12 Palmitik asit açık formülü 31
Şekil 1.13 Linoleik asit açık formülü 31
Şekil 1.14 Linoleik asitin rumen ve dokulardaki sentezi ve oluşan yağ asitleri 35
Şekil 3.1 Besi yeri yapımında kullanılan ekipmanlar 48
Şekil 3.2. Anaerobik gut fungusu izole edilmesi için kullanılan ruminant hayvanlara ait dışkı örnekleri. 49
Şekil 3.3 Dışkı örneklerinin besiyerlerinde seyreltilmesi 50
Şekil 3.4 Stok kültürden alınan suşların aktifleştirilmesi 51
Şekil 3.5 BİGEM sıvı azot stok kültür tankı 52
Şekil 3.6 NCBI veri tabanından alınan referans *Streptococcus salivarius* CCHSS3 suşuna ait linoleate izomeraz gen bölge erişim numarası 56
Şekil 3.7 NCBI veri tabanında taranmış *Lactobacillus paracasei* suşuna ait referans linoleat izomeraz gen bölgesi aminoasit dizilimi 56
Şekil 3.8 *Lactococcus lactis* linoleat izomeraz enziminden sorumlu gen bölgesinin amino asit dizilimi 57
Şekil 3.9 Polimeraz Zincir Reaksiyonuna ait cihaz protokolünde uygulanan sıcaklık ve sürelerinin şematize edilmesi 58
Şekil 3.10 Favorgen 100 bç DNA marker basamakları 59
Şekil 3.11 Uzun süreli saklama koşullarını belirlemek üzere planlanan deneme deseni. 62

Şekil 3.12 Yağ asidi metil esterlerinin reaksiyon zamanlarına (FAME 37 yağ asidi standart mix) ait kromatogram görüntüsü 65
Şekil 3.13 GC Yağ asiti metil ester standart karışımı içerisinde bulunan yağ asidi metil esterleri ve reaksiyon zamanları 66
Şekil 4.1 Roll tüp tekniği kullanılarak saflaştırılma yapılan tek koloniye ait hücreler gösterilmiştir 68
Şekil 4.2 *Neocallinastix frontalis.* GMLF 66 anaerobik fungusuna ait zoospor ve olgun bireye ait mikroskop görüntüsü 69
Şekil 4.3 *Caecomyces sp* GMLF 77 numaraya ait mikroskop görüntüsü 70
Şekil 4.4 Anaerobik gut funguslarına ait mikroskop görüntüleri 71
Şekil 4.5 Morfolojik olarak tanımlanan *Neocallimastix sp* GMFLF 92' e ait mikroskop görüntüsü 72
Şekil 4.6 Morfolojik olarak tanımlanan *Piromyces sp.* GMLF 202 anaerobik gut fungusuna ait hücre yapısının mikroskop görüntüsü 73
Şekil 4.7 İzolasyon sonucu elde edilen DNAlardan bazı örneklerin %0,7'lik agaroz jelde koşturulması örneği (M: 1 kb marker) 74
Şekil 4.8 ITS primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR analizi sonucu 75
Şekil 4.9 *Feramyces sp*. GMLF 30 numaralı izolata ait ITS bölgesinin NCBI veri tabanında taranması sonucu elde edilen benzerlik oranları ve benzerlik gösteren diğer mikroorganizmalar 76
Şekil 4.10 NCBI veri tabanında Morfolojik olarak tanımlanan *Feramyces sp.* GMLF 30 fungal izolat ile maksimum benzerlik gösteren *Feramyces sp* MV907584.1 numaralı izolata ait kısmi ITS dizilerinin karşılaştırılması 77
Şekil 4.11 *Neocallimastix frontalis* GMLF 66 suşu için ITS gen bölgesinin NCBI veri tabanında incelenmesi sonucu en yüksek benzerlik gösterdiği suşlar 78
Şekil 4.12 NCBI veri tabanında Morfolojik olarak tanımlanan *Neocallimastix frontalis* GMLF 66 izolatına ait DNA dizisinin maksimum benzerlik gösterdiği *Neocallimastix frontalis* KF312488.1 referans numaralı örneğin DNA dizilerinin karılaştırılması sonucu elde edilen farklılıklar 79
Şekil 4.13 *Caecomyces sp* GMLF 77'ye ait DNA dizilimi ile NCBI veri tabanında benzerlik gösteren DNA dizileri 80
Şekil 4.14 DNA dizi analizi sonucu elde edilen *Caecomyces sp*. GMLF 77 izolatına ait ITS bölgesi (Query) ile NCBI veri tabanında en yüksek benzerlik gösteren *Caecomyces sp* CFY JQ782554.1 GenBank numaralı DNA dizilimlerinin karşılaştırılması (Sbjct) 80

Şekil 4.15 NCBI veri tabanında *Feramyces sp* GMLF 90'a ait dizilime benzerlik gösteren diğer dizilimler ve bu dizilimlere ait numaraları 82
Şekil 4.16 *Feramyces sp* GMLF 90 izolatına ait ITS bölgesine en yüksek benzerlik gösteren referans izolata iat ITS bölgesinin BLAST yöntemi ile karşılaştırılması 82
Şekil 4.17 *Neocallimastix sp* GMLF 92 izolatının DNA diziliminin NCBI veri tabanında taranması sonucu elde edilen benzerlik oranları 83
Şekil 4.18 *Neocallimastix sp* GMLF 92 izolatına ait ITS bölgesinin en yakın benzerlik gösteren referans izolata ait ITS bölgesi ile karşılaştırması 83
Şekil 4.19 *Feramyces sp.* GMLF 113 izolatının NCBI veri tabanındaki benzerlik oranları 84
Şekil 4.20 *Feramyces sp.* GMLF 113 numaralı izolatına ait DNA dizisine (Query) maksimum benzerlik gösteren referans izolata ait DNA dizisi ile karşılaştırılması (Sbjct) 85
Şekil 4.21 *Feramyces sp.* GMLF 30 fungal izolatına ait ITS DNA dizisinin diğer diziler ile olan akrabalık derecelerinin Filogenetik ağaç dendogramları üzerinde gösterilmesi 86
Şekil 4.22 *Neocallimastix* GMLF 66 fungal izolatının ITS DNA dizisi ile benzerlik gösteren diğer diziler arasındaki akrabalık derecelerinin Filogenetik ağaç görseli ile dendogramları üzerinde gösterilmesi 88
Şekil 4.23. Kullanılan Fungal izolatlarından *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatına ait ITS DNA dizileri ile diğer diziler ile arasındaki akrabalık derecelerinin Filogenetik ağaç görseli ve dendogramları üzerinde gösterilmesi 89
Şekil 4.24 Kullanılan Fungal izolatlardan *Feramyces s*p. GMLF 90 izolatına ait ITS DNA dizileri ile benzer izolatlar arasındaki akrabalık derecelerinin Filogenetik ağaç görseli ile dendogramları üzerinde gösterilmesi 90
Şekil 4.25 Kullanılan Fungal izolatlardan *Neocallimastix sp* GMLF 92 izolatına ait ITS DNA dizileri ile diğer cinsler arasındaki akrabalık derecelerinin Filogenetik ağaç görseli ile dendogramları üzerinde gösterilmesi 91
Şekil 4.26 *Feramyces sp* GMLF 113 izolatının ITS DNA dizileri ile diğer benzer izolatlar ile arasındaki akrabalık derecelerinin Filogenetik ağaç görseli ile dendogramları üzerinde gösterilmesi 92
Şekil 4.27 Kullanılan Fungal izolatların ITS DNA dizileri ile diğer cinsler arasındaki akrabalık derecelerinin Filogenetik ağaç görseli ile dendogramları üzerinde gösterilmesi. 93
Şekil 4.28 Nutrient Broth Agar besi yerinde disk metodu Linoleik asitin antimikrobiyal etkisinin *S.aeureus* ATCC29213 üzerine etkisinin belirlenmesi 140

Şekil 4.29 Nutrient Broth Agar besi yerinde disk metodu Linoleik asitin antimikrobiyal etkisinin *S.enterica* üzerine etkisinin belirlenmesi 141
Şekil 4.30 *Listeria monocytogenes* DSM215675 için farklı konsantrasyonlarda Linoleik asitin (LA) antibakteriyel etkisi..... 142
Şekil 4.31 *Listeria monocytogenes* DSM219094 için farklı konsantrasyonlarda Linoleik asitin (LA) antibakteriyel etkisi (..... 143
Şekil 4. 4.32 *B.cereus* ATCC11778 için farklı konsantrasyonlarda Linoleik asitin (LA) antibakteriyel etkisi..... 144
Şekil 4.33 *E.coli* ATCC25922 için farklı konsantrasyonlarda Linoleik asitin (LA) antibakteriyel etkisi (..... 145
Şekil 4.34 *S. aeureus* ATCC29213 suşu üzerin KLA antimikrobiyal etki alanlarının gösterilmesi 146
Şekil 4.35 *S. enterica* suşu üzerin KLA antimikrobiyal etki alanlarının gösterilmesi 147
Şekil 4.36 *Listeria monocytogenes* DSM219094 suşu üzerin KLA antimikrobiyal etki alanlarının gösterilmesi..... 148
Şekil 4.37 *Listeria monocytogenes* DSM215675 suşu üzerin KLA antimikrobiyal etki alanlarının gösterilmesi..... 149
Şekil 4.38 *B.cereus* ATCC11778 suşu üzerin KLA antimikrobiyal etki alanlarının gösterilmesi 150
Şekil 4.39 *E.coli* ATCC24922 suşu üzerin KLA antimikrobiyal etki alanlarının gösterilmesi 151
Şekil 4.40 Fungus-Fungus gelişim kombinasyonları sonucunda elde edilen yağ asiti metilester karışımlarının patojen *E.coli* ATCC29922 suşu üzerindeki antimikrobiyal etkilerini belirleyen bölge alanları (..... 152
Şekil 4.41 Yağ asiti metil esterlerin *Listeria monocytogenes* DSM215675 üzerindeki antimikrobiyal etki alanları 153
Şekil 4.42 *S.aeureus* üzerine antimikrobiyal etki..... 154
Şekil 4.43 *S.enterica* üzerine antimikrobiyal etki 155
Şekil 4.44 *Listeria monocytogenes* DSM219094 üzerine antimikrobiyal etki 156
Şekil 4.45 Mikrobiyal yağ asiti kompozisyonlarının *B.cereus* üzerinde antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi..... 157
Şekil 4.46 *Neocallimastix californiae* tüm genom nükleotid dizisinin NCBI veri tabanındaki kaydı..... 159

Şekil 4.47 Linoleat izomeraz gen bölgelerine ait amino asit (aa) dizilimleri 160
Şekil 4.48 Linoleat izomeraz gen bölgesine göre gerçekleştirilen PZR sonuçları..... 162

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Anaerobik gut funguslarına ait cins ve türlerin izolasyon kaynağınna göre listelenmesi 16
Çizelge 1.2 Anaerobik Gut Fugnus cinslerine ait morfolojik özelliklerine göre listelenmesi 17
Çizelge 1.3 Doymuş yağ asitlerinin karbon içeriği ve sistematik adı 26
Çizelge 1.4 Doymamış yağ asitlerinin karbon içeriği ve sistematik isimleri 27
Çizelge 1.5 Süt içerisinde bulunan mikrobiyal kaynaklı yağ asitleri ve yüzdeleri (..... 28
Çizelge 3.1 Kullanılan funguslara ait stok kodları, hangi cinse ait oldukları ve izole edildikleri dışkıların ait olduğu hayvanlar 45
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan bakterileri listesi 46
Çizelge 3.3 Anaerobik besi yeri içerisinde yer alan kimyasallar ve miktarları 47
Çizelge 3.4 Antibiyotik karışımını oluşturan antibiyotikler ile konsantrasyonları 53
Çizelge 3.5 ITS bölgesi primerleri PZR çalışmalarda kullanılan primerler 54
Çizelge 3.6 Linoleate izomeraz gen bölgesi için tasarlanan ileri ve geri primer nükleotid dizilimleri ve aynı bölgeye ait kesme enzimi eklenmiş ileri ve geri primer nükleotid dizilimi 55
Çizelge 3.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu için gereken kimyasallar ve miktarları 58
Çizelge 3.9 Agaroz jel tampon çözeltisi 59
Çizelge 3.10 DNA dizi analizi ilk aşama PZR protokolü 60
Çizelge 3.11 DNA dizi analizi ikinci aşama PZR protokolü 60
Çizelge 3.12 GC cihazı için cihaz koşulları 64
Çizelge 4.1 Bu tez çalışması kapsamında putatif olarak morfolojik verilere göre izolasyonu, saflaştırılması ve tanımlanması yapılan AGF'ler 73
Çizelge 4.2 Eğik agar yöntemi kullanılarak 1 haftalık süre boyunca muhafaza edildikten sonra aktifleştirilen GMLF 77 ve GMLF 18 'ye ait enerji kaynağı olarak glikoz bulunan besi yerlerindeki yaşamsal faaliyetlerinin gösterilmesi. 94
Çizelge 4.3 Eğik agar yöntemi kullanılarak 2 haftalık süre boyunca muhafaza edildikten sonra aktifleştirilen GMLF 77 ve GMLF 18 'ye ait enerji kaynağı olarak glikoz bulunan besi yerlerindeki yaşamsal faaliyetlerinin gösterilmesi). 95
Çizelge 4.4 Eğik agar yöntemi kullanılarak 3 haftalık süre boyunca muhafaza edildikten sonra aktifleştirilen GMLF 77 ve GMLF 18 'ye ait enerji kaynağı olarak glikoz bulunan besi yerlerindeki yaşamsal faaliyetlerinin gösterilmesi 95

Çizelge 4.5 Eğik agar yöntemi kullanılarak 4 haftalık süre boyunca muhafaza edildikten sonra aktifleştirilen GMLF 77 ve GMLF 18 'ye ait enerji kaynağı olarak glikoz bulunan besi yerlerindeki yaşamsal faaliyetlerinin gösterilmesi. 96
Çizelge 4.6 Eğik agar yöntemi kullanılarak 3 aylık süre boyunca muhafaza edildikten sonra aktifleştirilen GMLF 77 ve GMLF 18 'ye ait enerji kaynağı olarak glikoz bulunan besi yerlerindeki yaşamsal faaliyetlerinin gösterilmesi 96
Çizelge 4.7 Eğik agar yöntemi kullanılarak 6 aylık süre boyunca muhafaza edildikten sonra aktifleştirilen GMLF 77 ve GMLF 18 'ye ait enerji kaynağı olarak glikoz bulunan besi yerlerindeki yaşamsal faaliyetlerinin gösterilmesi 97
Çizelge 4.8 Roll tüp agar yöntemi kullanılarak1 hafta boyunca muhafaza edilen GMLF 77 ve GMLF 18 izolatlarına ait aktifleşme tablosu 97
Çizelge 4.9 Roll tüp agar yöntemi kullanılarak 2 hafta boyunca muhafaza edilen GMLF 77 ve GMLF 18 izolatlarına ait aktifleşme tablosu 97
Çizelge 4.10 Roll tüp agar yöntemi kullanılarak 3 hafta boyunca muhafaza edilen GMLF 77 ve GMLF 18 izolatlarına ait aktifleşme tablosu 98
Çizelge 4.11. Roll tüp agar yöntemi kullanılarak 4 hafta boyunca muhafaza edilen GMLF 77 ve GMLF 18 izolatlarına ait aktifleşme tablosu 98
Çizelge 4.12 Roll tüp agar yöntemi kullanılarak 3 ay boyunca muhafaza edilen GMLF 77 ve GMLF 18 izolatlarına ait aktifleşme tablosu. 99
Çizelge 4.13 Roll tüp agar yöntemi kullanılarak 6 ay boyunca muhafaza edilen GMLF 77 ve GMLF 18 izolatlarına ait aktifleşme tablosu 99
Çizelge 4.14. Gaz kromotografi FAME metodu ile elde edilebilen 37 yağ asidi metil esterleri ve alıkonma süreleri 102
Çizelge 4.15 *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 suşu için gerçekleştirilen GC yağ asidi analizi sonucu elde edilen yağ asidi kompozisyonunda bulunan birkaç yağ asiti 105
Çizelge 4.16 *Ruminococcus albus SY3* suşuna ait yağ asiti kompozisyonuna ait bazı yağ asitleri ve yüzdelik oranları 108
Çizelge 4.17 *Orpinomyces sp* GMLF 19 izolatına ait farklı koşullarda gelişimleri sonucu yağ asiti kompozisyonları içerisindeki bazı yağ asitleri ve yüzdelik alanları 110
Çizelge 4.18 *Feramyces sp*. GMLF 30 izolata ait yağ asiti kompozisyonları içerisindeki bazı yağ asitlerine ait yüzdelik miktarlar 112
Çizelge 4.19 *Caecomyces sp* GMLF 77 fungusuna ait yağ kompozisyonu içerisindeki bazı yağ asitleri ve yüzdelik miktarları 115

Çizelge 4.20 *Feramyces sp* GMLF 92 fungal izolata ait yağ asiti kombinasyona ait bazı yağ asitleri ve yüzdelik alanları. 117
Çizelge 4.21 *Piromyces sp* GMLF 202 numaralı izolata ait yağ asiti kompozisyonları içerisindeki bazı yağ asitlerinin miktarlarına ait yüzdelik alanlar 120
Çizelge 4.22 *Ruminococcus albus* SY3 ve *Feramyces sp.* GMLF 30'a ait yağ kompozisyonları içerisndeki bazı yağ asitlerinin yüzdelik miktarlar 122
Çizelge 4.23 *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77 suşlarına ait kokültürlü gelişimleri sonucu elde edilen yağ asiti kompozisyonları içerisindeki bazı yağ asitlerine ait alan yüzdeleri. 125
Çizelge 4.24 *R.albus* SY3 *Caecomyces sp* GMLF 77 Kokültür Gelişimlerinin Yağ Analizi sonucu elde edilen yağ asitlerinden bazılarına ait farklı gelişim zamanlarındaki yüzdelik alanları. 127
Çizelge 4.25 *B.fibrisolvens* ve *R.albus* SY3 Kokültür Gelişimlerine Ait Yağ asiti kompozisyonundaki bazı yağ asitlerinin yüzdelik alanları 130
Çizelge 4.26 Morfolojik olarak tanımlanan *Feramyces sp*. GMLF 30 ve *Caecomyces sp* GMLF 77 fungal izolatlarının kokültür gelişimlerine ait yağ asiti kompozisyonları. 132
Çizelge 4.27 *Feramyces sp* GMLF 30 ve *Neocallimasitx sp* GMLF 92 fungal izolatlarının kokültür gelişimleri sonucu elde edilen yağ asiti kompozisyonları içerisindeki bazı yağ asitleri ve alan yüzdeleri 135
Çizelge 4.28 *Caecomyces sp* GMLF 77 ve *Neocallimastix sp* GMLF 92 fungal izolatlarının kokültür gelişimleri sonunda elde edilen yağ asitleri kompozisyonları içerisindeki bazı yağ asitlerine ait alan yüzdeler. 138

EK ŞEKİLLER DİZİNİ

Ek Şekil 1. *Ruminococcus albus* SY3 ve *Caecomyces sp* GMLF77 besiyerine 500µl linoleik asit ilave edilerek 72 saat kombinasyonlu gelişimi sonucunda ortaya çıkan yağ asiti kompozisyonlarına ait en yüksek pikler 188

Ek Şekil 2. *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11ile *Caecomyces sp* GMLF 77 kombinasyonlu gelişimlerinde linoleik asit ilavesiz 36 saat gelişimi sonucu elde edilen en yüksek yağ asiti pikleri 190

Ek Şekil 3 *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11ile *Caecomyces sp* GMLF 77 kombinasyonlu gelişimlerinde linoleik asit ilavesiz 72 saat gelişimi sonucu elde edilen en yüksek yağ asiti pikler 192

Ek Şekil 4. *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 suşu ile *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatının besiyerleri içerisine 1000 µl Linoleik asit ilave edilerek 36 saat kombinasyonlu gelişimleri sonucunda elde edilen en yüksek yağ asiti pikleri..... 193

Ek Şekil 5 *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 suşu ile *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatının besiyerleri içerisine 1000 µl Linoleik asit ilave edilerek 72 saat kombinasyonlu gelişimleri sonucunda elde edilen yağ asitlerine ait pikler..... 195

Ek Şekil 6 *Ruminocoocus albus* SY3 suşu ile *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 suşunun birlikte gelişimlerinde besiyerine 1000 µl Linoleik asit eklenerek 0 saatlik inkübasyon sonucuna göre yağ asiti kompozisyonlarını gösteren en yüksek pikler..... 197

Ek Şekil 7 *Butrivibrio fibrisovens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77'nin linoleik asit ilave edilmeden 36 saatlik inkübasyon süresi boyunca kokültür gelişimleri sonucu elde edilen en yüksek yağ asiti pikleri 198

Ek Şekil 24 *Butrivibrio fibrisovens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77'nin linoleik asit ilave edilmeden 72saatlik kokültür gelişimleri sonucu elde edilen en yüksek yağ asiti pikleri 200

Ek Şekil 9 *Butrivibrio fibrisovens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77'nin 500 µl linoleik asit ilave edilerek 72 saatlik kokültür gelişimleri sonucu elde edilen en yüksek yağ asiti pikleri 201

Ek Şekil 10 *Butrivibrio fibrisovens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77'nin 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 36 saatlik kokültür gelişimleri sonucu elde edilen en yüksek yağ asiti pikleri..... 203

Ek Şekil 11 *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatına ait linoleik asit ilave edilmeden 72 saat inkübasyon sonunda elde edilen yağ asiti pikleri 204
Ek Şekil 12 *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatının 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 0 saat inkübasyon sonrasında elde edilen yağ asitlerine ait en yüksek pikler 206
Ek Şekil 13 *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatının 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 72 saat inkübasyon sonrasında elde edilen yağ asitlerine ait en yüksek pikler 207
Ek Şekil 14 *Caecomyces sp* GMLF 77 ve *Neocallimastix sp* GMLF 92 izolatlarının 500 µl linoleik asit ilave edilerek 36 saat inkübasyonları sonucunda elde edilen yağ asitlerine ait en yüksek pikler 208
Ek Şekil 15 *Ruminococcus albus SY3* suşuna ait 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 0 saat inkübasyon sonrası yağ asitlerine ait pikler 210
Ek Şekil 16 *Ruminococcus albus SY3* suşuna ait 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 36 saat inkübasyon sonrası yağ asitlerine ait pikler 211

EK ÇİZELGELER DİZİNİ

Ek Çizelge 1 *Ruminococcus albus* SY3 ve *Caecomyces sp* GMLF77 500µl linoleik asit ilave edilerek 72 saat kombinasyonlu gelişimi sonucunda ortaya çıkan yağ asiti kompozisyonları 189

Ek Çizelge 2 *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11ile *Caecomyces sp* GMLF 77 kombinasyonlu gelişimlerinde linoleik asit ilavesiz 36 saat gelişimi sonucu elde edilen en yağ kompozisyonu içerisindeki yağ asitleri..... 191

Ek Çizelge 3 *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11ile *Caecomyces sp* GMLF 77 kombinasyonlu gelişimlerinde linoleik asit ilavesiz 72 saat gelişimi sonucu elde edilen en yağ kompozisyonu içerisindeki yağ asitleri..... 193

Ek Çizelge 4 *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 suşu ile *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatının besiyerleri içerisine 1000 µl Linoleik asit ilave edilerek 36 saat kombinasyonlu gelişimleri sonucunda elde edilen yağ asiti kompozisyonu 194

Ek Çizelge 5. *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 suşu ile *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatının besiyerleri içerisine 1000 µl Linoleik asit ilave edilerek 72 saat kombinasyonlu gelişimleri sonucunda elde edilen yağ asiti kompozisyonu 196

Ek Çizelge 6 *Ruminocoocus albus* SY3 suşu ile *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 suşunun birlikte gelişimlerinde besiyerine 1000 µl Linoleik asit eklenerek 0 saatlik inkübasyon sonucuna göre yağ asiti kompozisyonlarını gösteren en yüksek pikler..... 198

Ek Çizelge 7 *Butrivibrio fibrisovens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77'nin linoleik asit ilave edilmeden 36 saatlik kokültür gelişimleri sonucu elde edilen yağ asiti kompozisyonları 199

Ek Çizelge 8 *Butrivibrio fibrisovens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77'nin linoleik asit ilave edilmeden 72 saatlik kokültür gelişimleri sonucu elde edilen en yüksek yağ asiti kompozisyonu 201

Ek Çizelge 9 *Butrivibrio fibrisovens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77'nin 500 µl linoleik asit ilave edilerek 72 saatlik kokültür gelişimleri sonucu elde edilen en yüksek yağ asiti kompozisyonu 202

Ek Çizelge 10 *Butrivibrio fibrisovens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77'nin 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 36 saatlik kokültür gelişimleri sonucu elde edilen en yüksek yağ asiti pikleri..... 204

Ek Çizelge 11 *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatına ait linoleik asit ilave edilmeden 72 saat inkübasyon sonucu elde edilen yağ asiti kompozisyonu 205

Ek Çizelge 12 *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatının 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 0 saat inkübasyon sonrasında elde edilen yağ asitleri 206
Ek Çizelge 13 *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatının 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 72 saat inkübasyon sonrasında elde edilen yağ asitleri 208
Ek Çizelge 14 *Caecomyces sp* GMLF 77 ve *Neocallimastix sp* GMLF 92 izolatlarının 500 µl linoleik asit ilave edilerek 36 saat inkübasyonları sonucunda elde edilen yağ asitleri . 209
Ek Çizelge 15 *Ruminococcus albus SY3* suşuna ait 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 0 saat inkübasyon sonrası yağ asitleri..... 211
Ek Çizelge 16 *Ruminococcus albus SY3* suşuna ait 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 36 saat inkübasyon sonrası yağ asitleri..... 212

1. GİRİŞ

Tarım ve hayvancılık tüm ülkelerde önemli bir konumdadır. Ekonomik açıdan ülkelerin kalkınabilme temellerinin en önemli parametrelerinden birini de tarım ve hayvancılığın oluşturduğu söylenebilir. Artan dünya nüfusu ile bu alanlar oldukça hayati önem arz etmektedir (Meral ve ark., 2013). Nüfus atışı ile gıda ihtiyacının artması bu alanlarda araştırma yapılması gereğini doğurmuştur. Geçmişten günümüze tarım ve hayvancılıkla yakından ilgili olan ülkemiz bu alandaki çalışmalara önem verilmektedir. Tarım ve hayvancılık alanlarındaki gelişmeler artık sadece tarımda değil sanayi ile birlikte de kullanılmaya başlanmıştır (Meral ve ark., 2013). Özellikle töropotik maddeler, hormonlar ve enzim teknolojisi tarımsal biyoteknolojide her geçen gün önemini artırmaktadır. Bunların en önemli gen kaynağı veyahut üretim noktalarından birini de çiftlik hayvanları oluşturmaktadır (Ekinci ve ark., 2005). Çiftlik hayvanlarının önemli bir kısmını oluşturan ruminantlar sahip oldukları mikrobiyal popülasyon açısından ele alındığında biyoteknolojik çalışmaların önemli bir konusunu oluşturmaktadır.

1.1. Ruminant Hayvanlar

Ruminant hayvanlar (Şekil 1.1) ve insanlar arasındaki ilişki tarih öncesi dönemlerdeki av-avcı ilişkisine kadar dayanmaktadır (Russell ve Rychlik 2001). Ruminant kelimesinin anlamı Latince bir kelime olan ‘ruminare’ kelimesinden gelmektedir. Bu kelimenin anlamı çiğnemek ve geviş getirmek anlamına gelmektedir (Collins ve ark. 1986). Bir başka söylemle dört odacıklı bir mideye sahip ve Ruminantia olarak sınıflandırılan, çift tırnaklı, gerçek geviş getiren hayvanlara ruminant denir (Dosbon ve Dosbon, 1986). Ruminant hayvanlar genel olarak diğer hayvanlardan sindirim sistemleri bakımından ayrılmaktadır (Dosbon ve Dosbon, 1986). Ergin bir ruminant hayvanın midesi oransal açıdan diğer bölümlerden oldukça büyüktür. Ruminant hayvanların ağız yapıları da diğer memeli hayvanların ağız yapılarına göre farklıdır. Üst çenelerinde dişleri yoktur ve çoğu ruminant hayvanda köpek dişleri bulunmamaktadır. Bu nedenle yem materyallerini dilleri yardımı ile alırlar. Yem materyalini aldıktan sonra ruminantlar tek seferde sadece çenelerinin tek bir tarafını kullanabilmektedirler böylece çiğneme hareketleri ile yem materyalinde bulunan liflerin parçalanması sağlanmaktadır (Patterson, 1992). Ruminant hayvanların sindirim sistemleri diğer memeli hayvanlardan farklı olduğu gibi ruminant hayvanlar arasında da bu hayvanların sindirim sistemleri

oransal ve işlevsel olarak birbirinden farklıdır. Örneğin ergin bir koyunun rumen kapasitesi yaşına ve durumuna bağlı olarak değişmekle birlikte 15-30 lt arasındadır. Bu oran yetişkin bir sığır rumeninde yaşam koşullarına bağlı olarak 150-200 lt bulmaktadır.



Şekil 1.1. Bazı ruminant hayvanlar (a.Sığır, b.Keçi, c.Koyun)

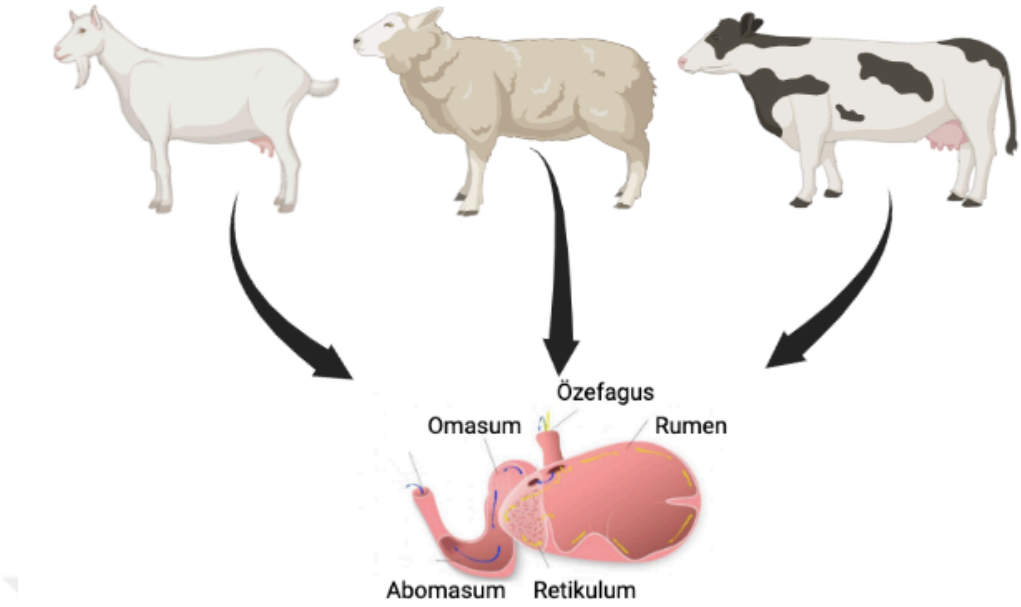
Ruminant hayvanlar karbonhidratlar, proteinler, lipitler, organik bileşikler ve mineraller içeren karmaşık yem materyallerini tüketmektedirler. Herbivolar ve diğer omurgalı hayvanların çoğunluğu bu yem materyalinin temel bileşenleri olan selüloz ve hemiselülozu yüksek oranda parçalayabilme yeteneğine sahip değillerdir. Bunun yerine

herbivorlar protozoan, bakteri ve funguslar ile simbiyotik bir ilişki içerisinde olup bu materyalleri tamamen parçalayabilmeyi böylelikle sağlamaktadırlar (Atanasova-Pancevska , Kungulovski 2017).

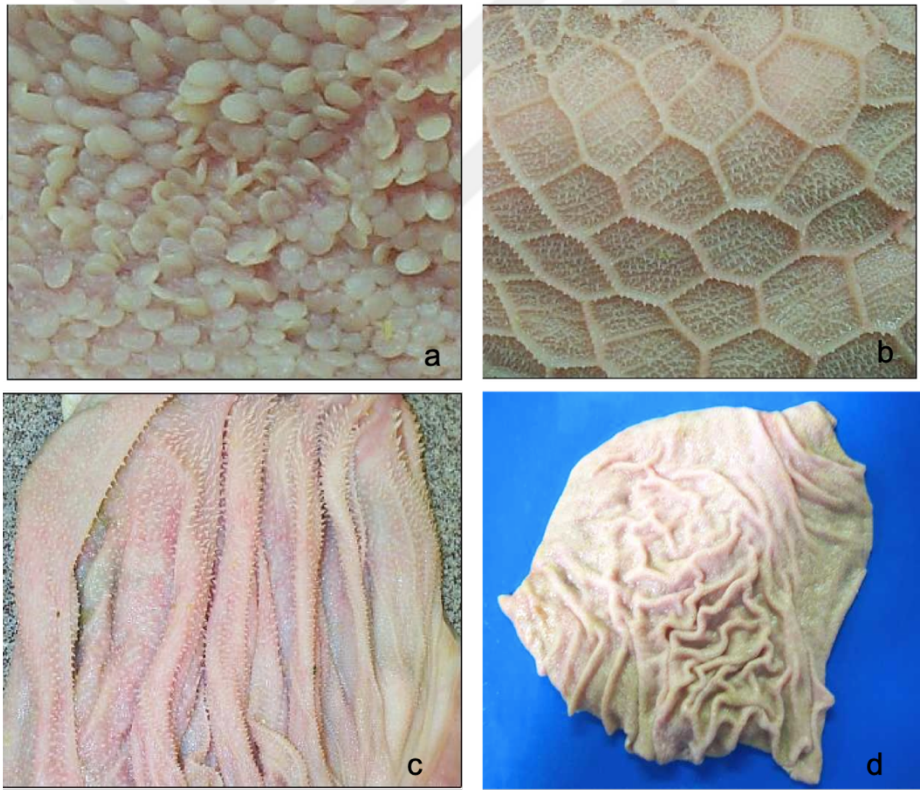
1.2. Ruminantların Sindirim Sistemi

Ruminant sindirim sistemi ruminant olmayan hayvanlar ve monogastrik (tek mideli) hayvanlara göre daha özelleşmiştir. Ruminant hayvanların mideleri dört ana bölümden oluşan tek bir mide gibi görünmektedir. Bu dört bölüm rumen (işkembe), retikulum (börkenek), omasum (kırkbayır) ve abomasumdan (şirden) oluşmaktadır. Şekil 1.2'de Ruminant hayvanlardaki sindirim sistemini (mide) oluşturan bölümlerin yerleşim düzeni gösterilmektedir. Şekil 1.3'de ise ruminant sindirim sistemi organlarının görünüşleri gösterilmiştir. Omasum (kırkbayır) yüzeyi papillalarla çevrili üst üste katlanmış yaprak gibi görünmektedir. Retikulum (börkenek) iç yüzeyi bal peteği görünümündedir ve her bir yüzeyde sindirime yardımcı papillalar bulunmaktadır. Rumen iç duvarı ise tamamen papillalar ile çevirilidir. Bu durum rumen ve retikulumun iç yüzey alanının genişlemesine olanak verir. Böylece hem yemlerin parçalanabilmesi için gerekli olan yüzey alanı genişliği sağlanmış olur hem de rumen mikroorganizmaları için özellikle rumenden ince bağırsağa geçiş yapan yemlerle birlikte gitmelerini engelleyen bir durak olur.

Rumen dört bölüm içerisinde en geniş alana sahip bölümü oluşturmaktadır. Ancak rumenin kapasitesi hayvanın yaşına göre değişiklik gösterir ve yeni doğan ruminant hayvanlarda henüz gelişmemiştir. Retikulum ise rumen ile birlikte ruminoretikulum olarak da isimlendirilmektedir. Retikulum medyan düzlemin sol tarafındaki diyaframa dayanır ve kısa bir boyun ile omasuma bağlanır. Retikulorumen kıvrım, rumen ve retikulumu iki bölmeye ayıran doku kütlesidir. Retikulorumen kıvrımının ana fonksiyonları, yem materyalinin mide sıvısına karıştırılmasını, partiküllerin ayrılmasını ve geviş getirme sırasında sıvının mide ağzına ulaşmasını önlemektir. Omasum üçüncü bölmedir ve elipsoidal kas yapısıdır. Omasumun iç yüzeyinde çok sayıda mukozal kıvrım vardır. Abomasum ise gerçek mide olarak tanımlanabilmektedir (Hobson ve Wallace, 1982)



Şekil 1.2 Ruminant hayvanlarda sindirim sistemi düzeninin şematik gösterimi



Şekil 1.3 Ruminant sindirim sistemini oluşturan bölümlerin görünüşü (a. Rumen iç duvarına ait papillalar, b. Retikulum iç yüzeyi , bal peteği görünümü ve papillalar, c. Omasum iç yüzeyi katmanları ve d. abomasum (http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/herbivores/rumen_anat.html)

Rumen içinde, çeşitli boyutlarda ve şekillerde çok sayıda papilla vardır. Bu papillalar rumen emici yüzeyini önemli ölçüde artırmaktadır. Omasumun içinde de çok sayıda kıvrım vardır. Abomasum ise gerçek bir glandüler epitelyuma sahiptir. Bu epitel, pepsinojen, HCl, gastrin ve histamin hormonlarını salgılamaktadır (Frandson ve ark., 2009). Rumende sindirim ilk olarak enzimler ile (selülaz, hemiselülaz, proteaz ve esterazlar) retikulorumende başlar, abomasumda hidroliz devam eder ve ince bağırsakta yıkıma kadar devam etmektedir. Daha sonra kalın bağırsak ve sekumda yem materyalinin fermantasyonu son bulmaktadır. Bu fermantasyon sonucunda karbonhidratların yaklaşık %75'i enerji ve uçucu yağ asitlerine dönüşmektedir .

1.3. Rumen ve Mikrobiyal Ekosistemi

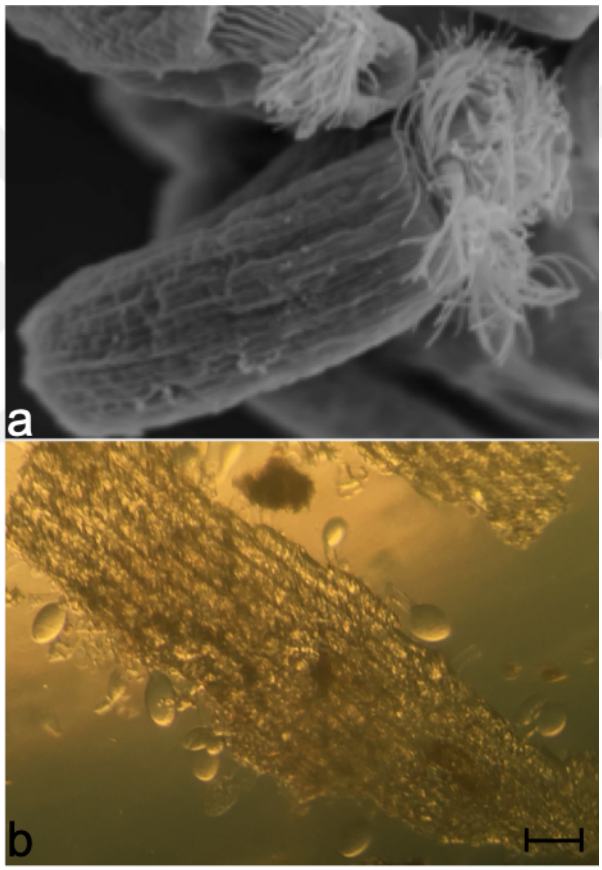
Rumende mikroorganizmalar hem yerleşik durumda hem de sindirim sistemi ile hareket eden mikrobiyal ekosisteme sahiptir (Kamra, 2005). Rumen içerisinde birçok mikroorganizma bulunduran özel bir ortam olurken aynı zamanda büyük bir fermantasyon küveti olarak da düşünülebilmektedir. Rumen dış ortama açıktır ve rumen içine ve dışına sürekli bir yem materyali akışı vardır (Clarke ve ark., 1977). Sağlıklı geviş getiren hayvanlarda mikrobiyal kontaminasyon rumene yemin alınması, su ve hava yoluyla giriş yapmaktadır (Atanasova-Pancevska ve Kungulovski 2017). Aynı zamanda rumen iç ortamı redoks potansiyeli düşük, zorunlu anaerobik bir ortam olup, rumen iç sıcaklığı normal beslenen bir hayvan için 38-40^{o}C arasında değişmektedir (Church 1977). Rumen için en önemli kriterlerden bir tanesi olan rumen içi pH derecesi ise 6.5 ile 7.0 arasında değişmektedir (Dehority 1993).

Doğadaki en karışık mikrobiyal ekosistemlerden birine sahip olan rumende başlıca bakteriler, funguslar, protozoanlar, mikoplazma ve arkea grubu yer almaktadır (Kamra 2005). Rumen sıvısı içerisinde bakteriler (10^{10} – 10^{11} cfu/ml), kamçılı protozoanlar (10^{4} – 10^{6} cfu/ml), anaerobik gut funguslar (10^{3} – 10^{5} tfu/ml) bulunurlar (Hobson, 1969). Bu mikroorganizmalar zorunlu anaerob şeklinde yaşamaktadırlar.

Rumendeki mikroorganizmalar mikrobiyal popülasyon dengesi, pH ve enzim aktivite yetenekleri ile ruminantlara yarar sağlamaktadırlar. Rumen mikroorganizmaları ürettikleri enzimler sayesinde yem materyalinin parçalanmasında etkin rol oynayarak hayvanların yemden yararlanmalarına katkıda bulunurlar. Aynı zamanda ürettikleri yağ asitleri et ve süt kalitesine de katkıda bulunmaktadırlar.

1.3.1. Rumen Mikroorganizmaları

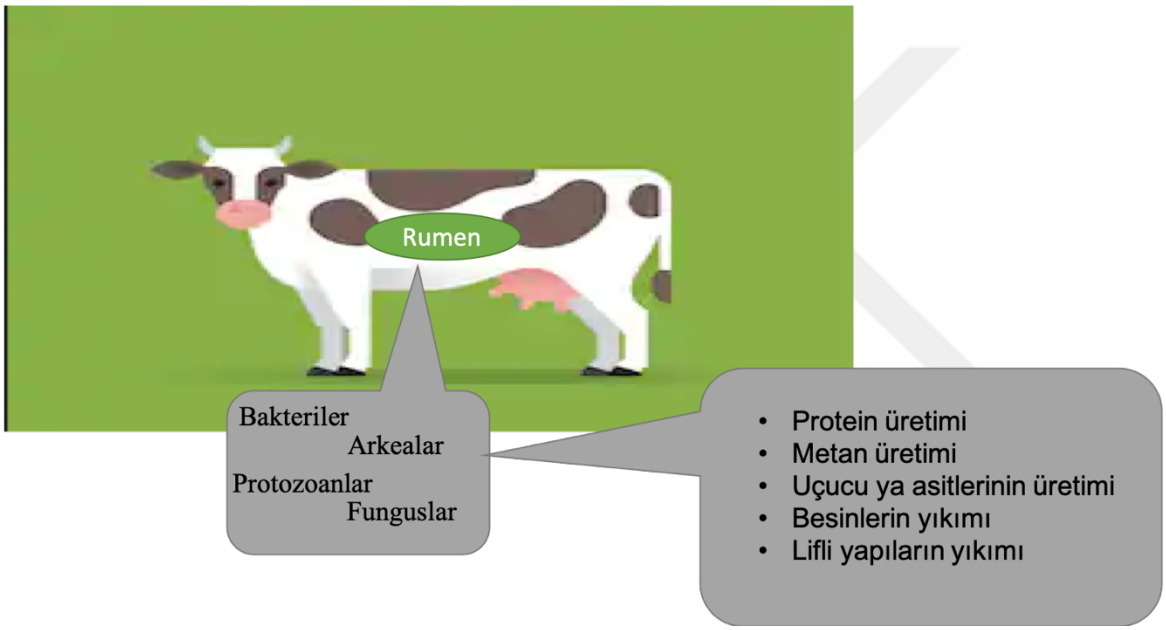
Rumen mikrobiyal ekosistemi hızlı bir hidrolizin olduğu ve bu yolla bitki biyokütlesinin parçalanarak konakçı hayvana enerji, protein ve diğer besinlerin sağlandığı doğal bir ortamdır. Yeni doğmuş ruminantların sindirim sistemleri mikroorganizmalar bakımından oldukça steril bir ortamdır ancak doğumdan itibaren neredeyse 48 saat içerisinde rumen içerisinde ilk olarak bakteriler kolonize olmaya başlamaktadırlar (Cheng ve ark., 1991). Yaklaşık 2-3 hafta sonra Rumen'de diğer mikroorganizma popülasyonları da kolonize olmaya başlamaktadır (Bryant ve ark., 1958).



Şekil 1.3 a. Elektron mikroskobu ile görüntülenmiş protozoanlara ait bir hücre yapısı (10µm) (Park ve ark., 2018), b. besin materyaline tutunmuş anaerobik gut fungusları (bu çalışmada)

Rumen mikroorganizmalarının rumende gerçekleştirdiği ve etkin oldukları roller Şekil 1.4'de gösterilmiştir. Rumen mikroorganizmaları bulundukları konakçı hayvana birçok yönden katkı sağlamaktadırlar. Rumen'de bulunan mikroorganizmalar hem kendi aralarında simbiyotik yaşam içerisinde olurken hem de bulundukları konakçı ile bir

simbiyotik yaşam içerisindedirler. Örneğin bu mikrobiyom içerisinde konakçı hayvanın beslendiği besin materyaline göre laktik asit bakterilerin artması sonucu üretilen laktik asitin hayvanda oluşturabileceği negatif etkilere karşı rumen protozoanları bu laktik asiti kullanarak asidosisi engellenmektedir (Chen, 1997; Cerilla ve Martinez , 2003). Yine rumen protozoanlarının bakır zehirlenmesine karşı da bir koruma oluşturdukları bilinmektedir. Selüloz sindiriminin oldukça büyük bir kısmı da yine protozoanlar tarafından sindirilmektedir. Protozoanların da Konjuge linoleik asit (KLA) döngüsünde rol oynadığı düşünülmektedir. Buna ek olarak rumen protozoanlarının doymamış yağ asitlerini hidrolize ettikleri ve doymuş yağ asitlerine dönüştürdükleri bilinmektedir (Yokoyama ve Johnson 1988).



Şekil 1.4. Rumen mikroorganizmalarının rumendeki rolleri

Ruminant yemleri genel olarak çoklu doymamış yağ asitlerinden oluşmaktadır. Ancak bu yağ asitleri ruminantların sindirim sisteminde bulunan mikroorganizma popülasyonu için toksik etki gösterebilmektedir (Harfoot ve Hazlewood 1997). Hem ruminantlar hem de rumen mikrobiyal ekosistemi bu toksik etkiyi hidroliz ve biyohidrojenasyon mekanizması ile karşı koyarak kendileri için kullanılabilir forma dönüştürebilmektedirler (Kemp ve Lander 1984).

Anaerobik funguslar mikrobiyal ekosistem içerisinde yemler üzerinde fiziksel olarak bir yıkım gerçekleştirebilen en önemli mikroorganizma grubudur (Borneman ve ark., 1989). Yine aynı şekilde rumen bakterileri yüksek enzim aktiviteleri sayesinde yemlerin yıkımında enzimatik olarak etkilidirler. Üretilen yan ürünlerin bu mikrobiyal

florada bulunan diğer mikroorganizmaların gelişimleri üzerinde olumsuz etkileri olabilmektedir. Ancak yine bu sistem bu negatif etkileri de kendi içerisinde sınırlandırılmaktadır. Bazı bakteriler için antimikrobiyal etki gösteren ancak rumende başka mikroorganizma popülasyonları tarafından üretilen bir ürün funguslar tarafından ya da rumende bulunan diğer bakteriler tarafından kullanılmakta ve böylece olası negatif mikrobiyal etkiler minimuma indirilmektedir. Bu şekilde zararlı etkisi varken mikroorganizmalar tarafından kullanılarak ortaya çıkan başka yararlı ürünler oluşabilmektedir. Linoleik asit bu ürünlere örnek olarak verilebilir. Çünkü linoleik asit bazı laktik asit bakterilerinin gelişimleri üzerine olumsuz etki gösteren bir yağ asiti çeşiti olarak bilinmektedir. Linoleik asitin toksik etkisinin indirgenebilmesini bir rumen bakterisi olan *Butrivibrio fibrobacter* biyohidrojenasyon ile stearik asite kadar yıkımı ile sağlamaktadır. Bu yıkım sırasında açığa çıkan konjuge linoleik asit ise konakçı hayvan için faydalı bir başka yan üründür. Bu sayede KLA konakçı hayvanın etine ve meme bezlerinden de süte geçer böylece insan sağlığı için de önemli olan bir yağ asiti gıdalara kazandırılmış olmaktadır. Günümüze kadar birçok çalışma da bu mikrobiyal ekosistem içerisindeki mikroorganizmalar tarafından üretilen ürünlerin insan sağlığı için önemli olduğu belirtilmektedir (Parodi 2004).

1.3.1.1. Rumen Bakterileri

Rumen mikroorganizmalarının en önemli gruplarından birini bakteriler oluşturmaktadır. Bakteri populasyonu neredeyse toplam biyokütlenin yarısını oluşturacak miktarda olabilmektedir (Alemu 2006). Bakteriyel popülasyon 10^{10}-10^{11} cfu/ml değerlere kadar ulaşabilmektedir (Trinci ve ark.,1994). Bu bakterilerin 200'e yakın türü olup 30 tanesi kültüre alınabilmiştir (Fraser 2006). *Catabacter, Entererhobdus, Prevotella, Bacterioides, Eubacterium, Butrivibrio, Coprococcus, Firmicutes ,Proteobacteria, Ruminococcus, Olsenella, Succiniclusticum* ve *Sporabacter* yaygın bilinen cinsler arasındadır (Jewell ve ark. 2015).

Morfolojik olarak rumen bakterileri incelendiğinde çoğunlukla gram pozitif (+) kok ve çubuk şeklinde bulunmaktadırlar (Panayotova-Pencheva, 2011). Çoğunluğu zorunlu anaerobik bakteri olup rumen içerisinde az da olsa moleküler oksijeni kullanan fakültatif anaerobik bakteriler de bulunmaktadır (Brown ve Khan 2002). Optimum gelişim gösterdikleri pH aralığı 6 ile 6.9 arasında değişmektedir. Genellikle 39 ^{o}C en iyi gelişim gösterdikleri sıcaklık değeri olarak belirtilmiştir (Orwa ve ark., 2009).

Ruminantların doğumundan sonraki ilk hafta boyunca sindirim sistemlerinde öncelikli olarak *Escherichia coli, Clostridium* ve *Streptococcus* baskın olarak yer alan mikroorganizmaları oluştururlar. Daha sonraki 2-3 haftalık periyotta ise laktik asit üretiminin başlaması ile rumende bulunan bakteriler laktik asiti parçalarlar (Ziolecki ve Briggs 1961). Rumen bakterileri çoğunlukla zorunlu anaerob olup, fakültatif anaeroblar da bulunmaktadır (Krause ve Russell, 1996). Büyük bakteri filumları içerisinde *Bacteroidates*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* ve *Spirochaetes* yer almaktadır (Firkins ve ark. 2006). Rumen bakterilerinin bir başka sınıflandırılma yöntemleri arasında, kullandıkları karbon kaynakları, fermantasyon ürünlerine ve oksijene duyarlılıklarına göre yapılan sınıflandırma yer almaktadır (Yokoyama ve Johnson 1988). Rumen bakterilerinin rumen de birçok işlevleri vardır. Kaba yemle beslenen hayvanlardaki rumen bakterileri genellikle gram negatif ve zorunlu anaerobiktirler (Hungate 1966).

Rumende fibrolitik bakteriler olarak başlıca *Ruminococcus flavefaciens, Ruminococcus albus, Fibrobacter succinogenes, Prevotella ruminicola, Prevotella bryantii* türleri kaydedilmiştir (Singh ve ark., 2014). Bu bakteri türleri rumen içerisinde gerek enzimatik aktivite gerekse uçucu yağ asiti üretimi bakımından oldukça önemli role sahiptirler. Bu türler içerisinde fibrolitik aktivitesi en yüksek *Ruminococcus flavefaciens* olarak belirlenmiştir. *Ruminoccocus* cinsine ait bu tür bu cinse ait olan diğer tür olan *R. albustan* ayıran özelliği sellobiyozlu besi yerinde geliştirilen kültürlerde sarı pigmentin gözlemlenmesidir. Kültür yaşına bağlı olarak gram (+) olan bu tür gram (-) olarak da gözlemlenebilmektedir. Bu cinse ait ikinci tür olan *Ruminococcus albus* ise popülasyon yoğunluğu bakımından *R. flavefaciens* 'ten oldukça üstündür. Selülolitik, ksilanolitik ve amilolitik bir mikroorganizma olması sebebiyle bitki hücre duvarının yıkımında oldukça etkilidir (Jindou ve ark., 2006).

Rumen selülolitik bakterileri kaba yemlerin en önemli bileşeni olan selülozu parçalayabilmekte ve konakçı hayvan tarafından yemden yararlanmayı arttırabilmektedirler (Chesson ve ark., 1982; Yokoyama ve Johnson 1988). Bu bakteriler fermantasyon son ürünü olarak asetat, format, suksinat, CO_2, H_2 ve etanol üretmektedirler (Hungate 1966). Rumen içerisinde yaygın olarak bulunan önemli bir diğer bakteri cinsi de *Fibrobacter*'lerdir. Bu cins içerisindeki *Fibrobacter succinogenes* rumendeki en yaygın selülolitik bakterilerden bir tanesidir (Gylswyk ve Toorn, 1986; Varel ve Dehority, 1989). Ayrıca selülolitik bakteriler arasında *Fibrobacter succinogenes* antibiyotik direnci en yüksek bakteridir (Stewart ve Duncan,1985).

Rumende bulunan bir başka bakteri grubu ise amilolitik bakterilerdir. Bu bakteriler selülolitik bakterilere göre daha asidik bir ortam tercih etmektedirler (pH 5.5-6.5). Amilolitik bakterilerin son ürünleri ise asetat ve propiyonattır (Owens ve Goetsch 1988; Russell ve Rychlik 2001). Ruminant hayvanların yem materyalleri içerisindeki nişasta miktarının artması ile birlikte rumende bulunan amilolitik bakterilerin sayısıda hızla artmaktadır. Bu aktiviteye sahip olduğu bilinen rumen bakterileri içerisinde *Bacteroides amylophilus, Butyrivibrio fibrisolvens, Streptococcus bovis, Prevotella ruminocola, Eubacterium ruminantium, Ruminobacter amylophilus* ve *Succinimonas amylolytica* türleri bulunmaktadır (McAllister ve ark., 1990).

Lipolitik bakteriler ise trigiliserit ve fosfolipitleri hidrolize ederek gliserol ve yağ asitlerini ortaya çıkarmaktadırlar (Yokoyama ve Johnson 1988). Lipolitik bakteriler lipaz enzimi üretmektedirler ve bu enzimler biyoteknolojik uygulamalar ile organik kimya alanında tercih edilmektedirler (Gupta ve ark., 2004). Gram negatif bakterilerden *Pseudomanas* cinsi bakteriler lipolitik olarak bilinmekle birlikte gram pozitif bakteriler içerisinde ki *Bacillus* ve *Staphylococcus* cinsi bakterilerde lipolitik sayılmaktadır (Yokoyama ve Johnson 1988).

Rumende hemiselülotik, proteolitik etkiye sahip birçok anaerobik rumen bakterisi de bulunmaktadır. Bu bakteri cinslerinden biri *Prevotella* bireyleridir. Rumende baskın olan bakteri gruplarındandır. Anaerobik, gram negatif (-), çubuk ya da kok şeklinde gözlemlenmektedirler. Rumendeki görevleri nişasta ve hücre duvarındaki polisakkaritleri, ksilen ve pektini parçalamaktır. En önemli rolleri ise protein ve peptid bağlarını parçalamadadır (Pittman ve Bryant, 1964). Bu tür bakteriler rumen mikroorganizmalarının içinde yüksek dipeptidil peptidaz aktivitesi göstermektedirler. Bu sayede rumen içeriğindeki oligopeptidleri yıkımlama özelliği elde ederler (Wallence ve McKain, 1989). *Prevotella* türlerinde fermantasyon ürünleri asetat, suksinat ve propiyonat olarak gözlemlenmektedir (Wallnofer ve Baldwin, 1967).

Butrivibriyo fibrisolvens JW11 suşu *B.fibrisolvens/Pseudobutryvibrio* takımında yer alan ve linoleik asitten konjuge linoleik asit üretebilen rumen bakterilerini oluşturmaktadır (Paillard ve ark., 2007). *Butrivibriyo fibrisolvens* gram pozitif (+), çoğu türü proteolitik bakterilerdir (Stewart ve ark.,1997). Biyohidrojenazyonda yüksek aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Paillard ve ark.,2006). Gelişimleri LA miktarından etkilensede KLA üretimi meydana gelmektedir (Lin ve ark. 2005).

1.3.1.2. Rumen Bakteriyofajları

Genel olarak, doğal ortamlardaki bakterilerden yaklaşık on kat daha fazla bakteriyofaj olduğu kabul edilmektedir (Whitman ve ark. 1998). Rumende bakteriler gibi bakteriofajlar da bulunmaktadır. Bu nedenle, bakteri sayısı ve çeşitliliği, rumen ekosistemindeki bakteriyofajları ve çeşitliliğini yöneten, daha sonra bakteriyel çeşitliliği ve sayıları etkileyen önemli bir faktör olarak görülmektedir. Bu avcı-av ilişkisi, her iki grubun hayatta kaldığı ve rumendeki karmaşık biyokütleyi fermente etmeye devam ettiği iyi bir denge söz konusudur. Bakteriyofajlar, bakterilerin evrimini yönlendiren ve bağırsaktaki bakteriyel topluluk yapısının ince dengesini koruyan kritik bir faktör olarak kabul edilmektedir (Breitbart ve ark.2003). Ancak yine de bu bilgiler doğrultusunda bakteriyofajların varlığının bilinmesine rağmen rumen içerisindeki fonksiyonları ve besinlerin fermantasyonu içerisinde ki rolleri tam olarak bilinmemektedir (Breitbart ve ark.2003).

1.3.1.3. Rumen Protozoanları

Protozoanlar ilk defa 19. yy başlarında keşfedilmesine rağmen ağırlıklı olarak 1920 yıllarında incelenmeye başlanmıştır (Kamra 2005). İlk olarak Awerinzew ve Mutafowa (1924) tarafından izole edilmişlerdir. Izotrichidae, Paraisotrichidae, Blepharocorythidae ve Buetschliidae adlı protozoa familyalarından dördü, başlangıçta bilimsel literatürde “Holotrichs” olarak adlandırılan Trichostomata altında sınıflandırılmıştır (Dehority 1993). Geri kalan siliyatlı protozoanlar, Smith ve ark.'na (1985) göre Ophryoscolecidae familyasında sınıflandırılmış ve daha önce "oligotrichs" ve daha sonra "entodiniomorphs" olarak adlandırılmışlardır. *Entodinium* cinsi Dehority tarafından (1974) izole edilmiştir. Yine aynı cinse ait *E. dubardi, E. quadricuspis, Eudiplodinium impalae* türleride Dehority (1974) tarafından tanımlanmış protozoanlardır. Daha sonra *Entodinium anteronucleatum*, *Entodinium bicarnutum, Enoploplastron confuluens* ve *Epidinium gigas* izole edilmiştir (Imai ve ark. 2004). *Entodinium* cinsine ait bireyler yaygın olarak bulunmakla birlikte ilerleyen zamanlarda *E.simplex, E.ovinum, E. longinucleatum, E. exiguum, E. parvum, E. nanellum, E. dilobum türleri* ile diğer bir cinse ait birey olan *Diolodinirum anisacanthum* protozoan ailesine eklenmiştir (Ichimura ve ark. 2004). *Epidinium courdonatum*, *Istricha intestinalis* ve *Entodinium coundonatum* tanımlanan protozoan bireyleridir (Sundset ve ark. 2009).

Rumen sıvısı incelendiğinde 1 ml sıvı içerisinde bulunan protozoan miktarının 10^5-10^6 arasında olduğu görülmektedir. Bu değer göz önüne alındığında protozoanların rumendeki mikrobiyal popülasyonun yaklaşık yarısını oluşturduğu görülmektedir (Regensbogenova ve ark., 2004). Rumen sıcaklığına bağlı olarak 38-40 ^{0}C' de optimum gelişim göstermekle beraber rumen sıcaklığının uzun süre 40 ^{0}C'nin üzerinde seyrettiği koşullarda canlılıklarını sürdürememektedirler (Dehority 2004).

Ruminant hayvanların doğumundan 2-3 haftalık süre sonrasında rumen içerisinde görülmeye başlamaktadırlar (Fonty ve ark., 1987; Stewart ve ark., 1988). Biyokütlenin yüzde ellisinden fazlasını protozoanlar oluşturmaktadır ancak rumendeki rolleri henüz yeterince bilinmemektedir (Williams ve ark., 2020). Birinci grup olarak kamçılılar (*Mastigophora*) ve ikinci grup olarak ise siliyatlar (*Ciliophora)* bulunmaktadır (Nagaraja ve ark., 1992). Rumen protozoanları yüksek fibrolitik aktiviteleri ile bilinmesine karşın göreceli az sayıda protozoal enzim tanımlanabilmiştir (Park ve ark.,2018). Protozoan, rumende bulunan milyarlarca diğer mikroorganizma ile sinerjik olarak hücre enerjisi için bitki materyalini fermente edebilir. Protozoan besin fermentasyonu sonucunda ana ürün olarak asetat, butirat, propionat, H_2, CO_2 ve laktat üretmektedirler (Hungate 1966). Rumen protozoanları toplam fibril yıkımın %25-30 'nun gerçekleşmesine katkı sağlamaktadır (William ve Coleman, 1997). Protozoanlar bakterileri ve diğer mikroorganizmaları da besin maddesi olarak kullanabilmektedirler. Bu yüzden rumen ekosistemi içerisinde bakteri sayısının da kontrol edilmesinde etkilidirler (Coleman ve Hall 1969). Genel olarak protozoanlar proteolitik özelliktedirler ve protein kaynağı olarak rumenin en önemli mikrobiyal protein kaynağı olan bakteriyel biyokütleyi kullanırlar (Franzolin ve Dehority, 1996). Diğer birçok ruminal popülasyon gibi protozoanlar da gut sisteminde konakçı olarak simbiyotik yaşam sürdürdükleri konakçı hayvan tarafından tüketilen yem miktarı ve çeşitliliğinden etkilenmektedirler (Kreikemeier ve ark., 1990). Rumen fermantasyonun da oldukça etkili olan protozoanlar içerisindeki *Epidinium* ve *Polyplastron* grupları rumendeki lifli materyal ve selülozu %25-30 arasında sindirebilmektedirler (Williams ve Coleman 1997). Diğer protozoan grupları ise selülozdan ziyade nişasta ve pektin gibi karbonhidratları parçalayabilmektedirler (Kamra 2005).

Rumende fazla miktarda kolay sindirilebilir karbonhidratların bulunması rumen protozoanlarının bu karbonhidratları kısa sürede fermente edip depolamasını ve uzaklaştırmasına neden olmaktadır böylece rumen pH değerlerinde hızlı değişimlerin

oluşması engellenmiş olur aksi takdirde amilolitik bakterilerin faaliyetlerinin artışı ile asidosiz meydana gelmektedir. Bu sayede rumen protozoanları konakçı olduğu hayvana yarar sağlamaktadır (Chin, 1997; Cerilla ve Martinez 2003). Hayvan ile mikroorganizma arasında kurulan ilişkide protozoanlar için optimal koşullar sağlanırken protozoanlarda konakçı olan hayvanların sindiremediği selüloz, hemiselüloz gibi polisakkaritleri parçalayarak uçucu yağ asitlerine dönüştürmektedirler. Ruminant hayvanlar günlük enerji gereksinimlerinin %80 kadarını uçucu yağ asitlerinden sağlaması nedeni ile protozoanların ruminantlar ile olan ilişkileri önemlidir (Merchen, 2002). Ayrıca canlıların ihtiyaç duydukları B ve K vitaminlerinin de sentezinde rol oynamaktadırlar (Yokoyama ve Johnsoan 1993). Ruminantların yem materyali içerisinde destekleyici yağlar yaklaşık olarak %4-7 arasındadır (Nagajara ve ark. 1997). Diyetteki bu yağ ve yağ asitleri rumen protozoanları tarafından hızlıca hidrolize edilmektedir (Harfoot 1978).

1.3.1.4. Rumen Arkea Grubu

Arkealar bulunduğu farklı habitatlara göre farklı metabolizma gösterirler, ancak rumende bulunanları zorunlu anaerobik metanojenlerdir (DeLong ve ark.,2001). Rumen sıvısı içerisinde serbest halde ya da rumen duvarında asılı olarak bulunmaktadırlar. Bulundukları bölgeye göre farklı büyüme oranları göstermektedirler (Chagan ve ark.1999). Kültüre alınan ve tanımlanabilen 28 cins 113 tür metanojen sınıflandırılmıştır (Garitty vve ark., 2007). Bu cinslerin şaşırtıcı bir şekilde önemli bir miktarı rumen içeriğinden izole edilmiş olup *Methanobacterium formicicum* (Oppermann ve ark.., 1957), *Methanobacterium bryantii, Methanobrevibacter ruminantum* (Smith ve ark.,1958), *Methanobrevibacter millerae* (Rea ve ark., 2007*), Methanobrevibacter olleyae, Methanomicrobium mobile, Methanonculileus olentangyi* (Rea ve ark., 2007; Regensbogenova ve ark., 2004; Joblin ve ark., 2005) rumen içeriğinden izole edilmiştir.

Arkealar birçok farklı metabolizmaya sahip ve birçok habitatta bulunabilen mikroorganizmalardır ancak rumende zorunlu anaerob metanojenik mikroorganizmalar olarak bulunurlar. Günümüze kadar ruminant hayvanların sindirim sistemlerinden izole edilen arkea grubu içerisinde yer alan 5 cinse bağlı 7 tür metanojen bulunmaktadır (Jarvis ve ark.,2000). Bu mikroorganizmalar rumende bulunan O_2 ve CO_2 yi kullanarak metan üretmektedirler. Bu dönüşüm rumen fermantasyonunda önemli rol oynamaktadır (Hoffman 1989).Rumende metanojenlerin miktarı ve yoğunluğu hayvanın yaşı, bulunduğu bölge ve diyet içeriğine göre değişiklik göstermektedir. Örneğin bazı metanojenlere genç

ruminantlarda rastlanırken bazılarına ise yetişkin ruminantlarda rastlamak mümkündür (Friedman ve ark. 2017).

1.3.1.5. Anaerobik Gut Fungusları

Orpin'in anaerobik gut fungusları (AGF) keşfine kadar belirlenen (tanımlanan) ve evrensel olarak kabul edilen fungusların hepsinin aerobik ve mitokondri içerdiği düşünülmekteydi (Orpin 1975). Ancak bu keşiften sonra anaerobik funguslar zorunlu anaerobik ve mitokondri yerine hidrojenozom içeren tek fungal alem olarak kabul edilmiştir (Yarllet ve ark., 1986).Kitin tabakası, çoklu yaşam fazlarının bulunması, karbonhidrat yıkımını sağlayan enzimlerinin olması funguslara ait yaygın özellikleri barındırdıklarını göstermektedir (Benoit, 2017).AGF koyun, sığır ve keçilerin sindirim kanallarında ve ayrıca diğer birçok evcilleştirilmiş geviş getiren hayvanlar ile ruminant olmayan otçullarda ayrıca çok çeşitli yabani otçul memelilerde bulunur (Atanasova-Pancevska ve Kungulovski, 2017). AGF, rumendeki mikrobiyomun ayrılmaz bir parçasıdır, ancak rolleri ve çeşitliliği hakkında çok az bilgi mevcuttur. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile anaerobik gut funguslarının sadece herbivorların sindirim sistemlerinde değil aynı zamanda bazı eklem bacaklılardan termitler, bazı sürüngenler ve balina sindirim sistemlerinde de (Şekil 1.5) var oldukları gösterilmiştir (Lee ve ark.,2015). Anaerobik gut fungusları temel olarak mide de lifli bitki parçacıklarının fazla olduğu sıvı fazında serbest yüzme zoosporları olarak bulunurlar (Atanasova-Pancevska ve Kungulovski 2017). Rumen mikrobiyal ekosisteminin bir parçası olan Neocallimastigamycota ailesi yani anaerobik gut fungusları etkili şekilde selüloz, hemiselüloz ve pektini ham bitki kütlelerinden parçalayabilmektedir. Günümüze kadar tanımlanabilen anaerobik gut funguslarının cins ve türlerine ait bireyler ve izolasyon kaynakları Çizelge 1.1.'de gösterilmiştir. Bu çizelgeye bakıldığında anaerobik gut fungusları üzerine olan çalışmalara ilginin arttığı ve daha sık çalışılması sebebiyle son yıllarda birçok cinsin bulunduğu gözlemlenmektedir. Anaerobik gut funguslarının morfolojik çalışmalara ile belirlenen özellikleri Çizelge 1.2' de belirtilmiştir.



Şekil 1.5 Herbivorlar dışında sindirim sistemlerinde Anaerobik gut fungus bulunduran canlılar (A. Termitler, B. Yeşil İguana)(https://www.wikiwand.com/tr/Termit, https://www.piqsels.com/tr/public-domain-photo-ohpyc 2020)

Çizelge 1.1 Anaerobik gut funguslarına ait cins ve türlerin izolasyon kaynağınna göre listelenmesi

Cins adı	Tür adı	İzolasyon kaynağı	Referans kaynağı
Neocallimastix	frontalis patriciarum variabilis hurleyensis califoniane	Koyun Koyun Sığır Koyun	Heath ve ark. (1983) Orpin ve Munn (1986) Ho ve ark. (1993) Webb ve ark. (1991) Malley ve ark. (2013)
Orpinomyces	joyonii intercalaris	Koyun Sığır	Breton ve ark. (1989) Ho ve ark. (1994)
Anaeromyces	mucronatus elegans robustus	Koyun Sığır	Breton ve ark.(1990) Ho ve ark. (1993) O' Malley ve ark. (2013)
Piromyces	comminis mae dumbanicus rhizinflatus minutus spiralis cryptodigmaticus citronii finnis	Koyun At Fil Eşek Geyik Keçi Moleküler verilere göre At At	Gold ve ark. (1988) Li ve ark. (1990) Li ve ark. (1990) Breton ve ark. (1991) Ho ve ark.(1993c) Ho ve ark. (1993b) Fliegerova ve Kirk (2012) Gaillard-Martinie ve ark. (1995) O' Malley ve ark. (2016)
Caecomyces	communis equi sympodialis	Koyun At Sığır	Gold ve ark. (1988) Gold ve ark. (1988) Chen ve ark. (2007)
Cyllamyces	aberensis	Sığır	Ozkose ve ark. (2001)
Buwchfawromyces	eastonii	Manda	Callaghan ve ark (2015
Oontonomyces	anksri	Deve	Dagar ve ark. (2015)
Feramyces	austini	Koyun ve Geyik	Hanafy ve ark. (2017)
Pecoramyces	ruminantium	Sığır ve Koyun	Hanafy ve ark. (2016)
Agriosomyces	longus	Geyik	Vikam ve ark. (2019)
Capellomyces	foraminis elongatus	Keçi Keçi	Pranshant ve ark.(2019)
Aklioshbomyces	papillarum	Keçi	Vikam ve ark. (2019)
Joblinomyces	apicalis	Keçi ve Koyun	Tony ve ark. (2019)
Ghazallomyces	constrictus	Keçi	Hanafy ve ark. (2019)
Tahromyces	munnarensis	Keçi	Griffith ve ark. (2019)
Liebetanzomyces	polymorphus	Keçi	Akshay ve ark. (2018)
Khoyollomyces	ramosus	Zebra ve At	Sumit ve ark.(2019)
Aestipascuomyces	dubliciliberans	Alpaka	Hanafy ve ark. (2020)
Paucimyces	polynucleatus	Kara antilop	Hanafy ve ark. (2021)

Çizelge 1.2 Anaerobik Gut Fugnus cinslerine ait morfolojik özelliklerine göre listelenmesi

Cins adı	Morfoloji (zoospor, tallus ve rizomiselyum)	Hücre Özellikleri	Referans kaynağı
Neocallimastix	Çok kamçılı, Monosentrik ve Filamentli	Dallanmış keseboynu,belirgin zoospor kesesi	Heath ve ark. (1983)
Orpinomyces	Çok kamçılı, Polisentrik ve Filamentli	Geniş dallanmış rizodial yapı,geniş hifalar	Breton ve ark. (1989)
Anaeromyces	Tek kamçılı, Polisentrik ve Flamentli	Şişkin çıkıntılı zoospor kesesi Dallanmamış Keseboynu,dallanmış hifa,	Breton ve ark.(1990)
Piromyces	Tek kamçılı, Monosentrik ve Küresel	Kamçı sayısı 4 veya 4'den az, Endojenus ve Ekzojenus zoospor kesesi,erginlerde belirgin boğumlar	Breton ve ark. (1989)
Caecomyces	Tek kamçılı, Monosentrik ve Küresel	Kamçı sayısı 4 veya 4'den az,dallanmamış vejetatif rizoidal yapı,spiral ya da oval	Gold ve ark. (1988)
Cyllamyces	Tek kamçılı, Polisentrik ve Küresel	Kamçı sayısı< 3,çoklu zoospor kesesi,dallamış kese boynu,	Ozkose ve ark. (2001)
Buwchfawromyces	Tek kamçılı, Monosentrik ve Filamentli	İkili ve geniş dallanmış rizodial yapı, görünür boğumlar,Nükleik materyal Zoospor kesesinde	Callaghan ve ark (2015)
Oontonomyces	Tek kamçılı, Monosentrik ve Filamentli	Şişkin olmayan zoospor kesesi,uzun kese boynu	Dagar ve ark. (2015)
Feramyces	Çok kamçılı, Monosentrik ve Filamentli	Oldukça büyük dallanmış rizodial yapı, düzensiz hifa yapısı, Endojenus ve Ekzojenus zoospor kesesi	Hanafy ve ark. (2018)
Pecaramyces	Tek kamçılı, Monosentrik ve Filamentli	Tek kamçılı, Endojenus ve Ekzojenus zoospor kesesi,dallanmamış keseboynu,	Hanafy ve ark. (2017)
Agriosomyces	Tek kamçılı, Monosentrik ve Filamentli	Monosentrik ve Filamentli Şişkin zoospor kesesi ve şişkin keseboynu	Hanafy ve ark. (2020)
Capellomyces	Tek kamçılı, Monosentrik ve Filamentli	Endojenus ve ekzojenus zoospor kesesi, dallanmamış kese boynu	Hanafy ve ark. (2020)
Aklioshbomyces	Tek kamçılı, Monosentrik, Filamentli	Kamçı sayısı< 4 Endojenus ve Ekzojenus zoospor kesesi, baloncuk şeklinde zoospor ve dalanmış keseboynu	Hanafy ve ark. (2020)
Joblinomyces	Tek kamçılı, Monosentrik, Filamentli	Tek kamçılı, Endojenus ve Ekzojenus zoospor kesesi,ince yapıda kese boynu	Hanafy ve ark. (2020)
Ghazallomyces	Çok kamçılı, Monosentrik ve Filamentli	Endojenus ve Ekzojenus zoospor kesesi,geniş dallanmış rizodial yapı,dallamamış spor kesesi	Hanafy ve ark. (2020)
Tahromyces	Tek kamçılı, Monosentrik, Filamentli	Tek kamçılı, Endojenus ve Ekzojenus zoospor kesesi,küüçük şişkin zoosporkesesi	Hanafy ve ark. (2020)
Liebetanzomyces	Tek kamçılı, Monosentrik, Filamentli	Endojenus ve Ekzojenus zoospor kesesi, değişken rioidal yapı	Joshi ve ark. (2018)
Khoyollomyces	Tek kamçılı, Monosentrik, Filamentli	Endojenus ve Ekzojenus zoospor kesesi,geniş rizodial yapı,2-4 adet spor kesesi	Hanafy ve ark. (2020)
Aestipascuomyces	Çok kamçılı,Monosentrik, Filamentli	Çok dallanmış rizodial yapı,Endojenus zoospor kesesi	Stabel ve Hanafy (2020)
Paucimyces	Tek kamçılı, Polisentrik, Filamentli	Çoklu zoospor kesesi, dallanmış rizodial yapı	Hanafy ve ark. (2021)

1.3.1.5.1 Anaerobik Gut Funguslarının Taksonomisi

Bütün chytridler kamçılı zoosporlar oluşturmaktadırlar. AGF keşfinden önce, yalnızca tek kamçılı oldukları düşünülmüştür ancak AGF hem tek kamçılı hem de çok kamçılı takson içerebilmektedirler (Bar, 1980,1988). Tek kamçılı türlerde zoosporlar ağırlıklı olarak tek kamçı bulunur ancak bazı zoosporlarda iki ile dört kamçı oluşabilmektedir. Çok kamçılı türlerin aktif zoosporları daima dörtten fazla kamçıya sahiptir ancak serbest bırakıldıklarında harekete başlamadan önce kamçılar genellikle birlikte kümelenir ve yüzeysel incelemede tek olarak görülebilir (Lowe ve ark., 1987a). Kamçılar kist oluşumu sırasında hücre tarafından uzaklaştırılır ve genellikle geriye zoospor üzerinde besin materyaline tutunabileceği ve rizodial yapıyı oluşturabileceği tek bir kamçı kalmaktadır. Zoosporların büyüklüğü, sadece bazı türlerin izolatları arasında değil aynı zamanda tek bir izolatın zoosporları arasında da değişmektedir. Tek kamçılı zoosporlar genelde küçük, yaklaşık 4-11 µm ve 7-22 µm çapındadırlar. Zoospor boyutunda doğru ölçümler yapmak zordur, çünkü sabitlenmemiş, ölü zoosporlar şişme eğilimi göstermektedirler (Koch, 1968).Orpin (1976) AGF'leri Cryridiomycetes fungal sınıfına dahil etmiştir ancak Hibbett ve ark. (2007) sınıflarını ayırarak Neocallimastigomycota olarak değiştirmiştir. Neocallimastigomycota tek bir takım (Neocallimastigales) ve tek familyadan (Neocallimastigaceae) oluşmaktadır. Sistematik çalışmalar sonucu anaerobik fungusların taksonomisi aşağıda gösterildiği gibidir.

Alem: Fungi

Şube: *Neocallimstigomycota*

Sınıf: *Neocallimastigamycetes*

Takım: *Neocallimastigales*

Familya: Neocallimastigaceae

Cins: *Neocallimastix , Oprinomyces*,…

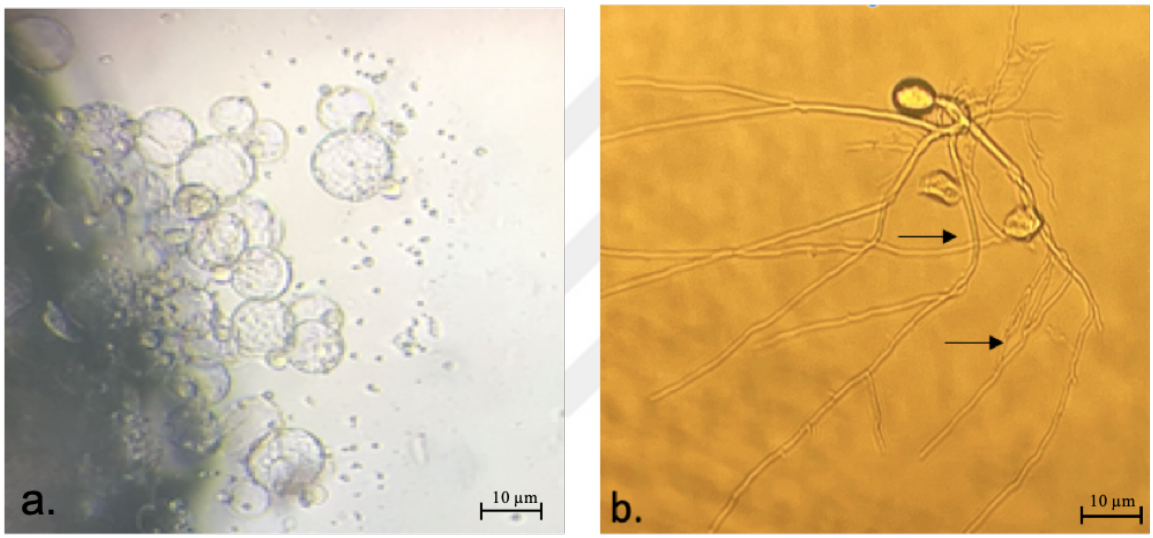
Tür: *frontalis, communis*,…

Neocallimastigamycote familyası *Neocallimastix, Piromyces, Orpinomyces, Anaeromyces, Caecomyces, Cyllamyces, Buwchfawromyces, Oontomyces, Ppecoramyces*, *Feramyces*, *Liebetanzomyces*, *Ghazallomyces, Aklioshbomyces, Agriosomyces Capellomyces, Joblinomyces, Khoyollomyces*, *Tahromyces, Paucimyces*, *Aestipascuomyces* dahil olmak üzere 20 cinsten oluşmaktadır (Çizelge 1.1)

Tanımlaması yapılan 20 cinsten *Neocallimastix, Piromyces, Buwchfawromyces, Oontomyces, ecaramyces, Caecomyces, Agriosomyces, Aklioshbomyces, Capellomyces,*

Joblinomyces, Ghazallomyces, Khoyollomyces, Tahromyces, Liebetanzomyces, ve Feramyces monosentrik *Orpinomyces, Anaeromyces, Cyllamyces* ise polisentrik gelişim göstermektedir. Ayrıca *Neocallimastix, Piromyces, Orpinomyces, Buwchfawromyces, Oontomyces, Pecaramyces, Anaeromyces, Ghazallomyces, Aklioshbomyces, Agriosomyces, Capellomyces, Joblinomyces, Khoyollomyces, Tahromyces, Liebetanzomyces* flamentli riozidal gelişim gösterirken *Caecomyces* ve *Cyllamyces* flamentli riozidal yapılar yerine küresel rizoidlere sahiptir (Şekil 1.6).

Ancak yukarıda belirtilen cinslere ek olarak son zamanlarda yapılan filogenetik çalışmalar (ITS,18S) ile en az 34 anaerobik fungal cinsin ve 274 türün var olduğu da öngörülmektedir (Paul ve ark., 2018).



Şekil 1.6 Şekil 1.6 AGF'lerin mikroskop görüntüsü, a. Küresel rizoidal yapıya sahip funguslara ait mikroskop görüntüsü, b. Flamentli bir rizodial yapıya sahip fungus mikroskop görüntüsü

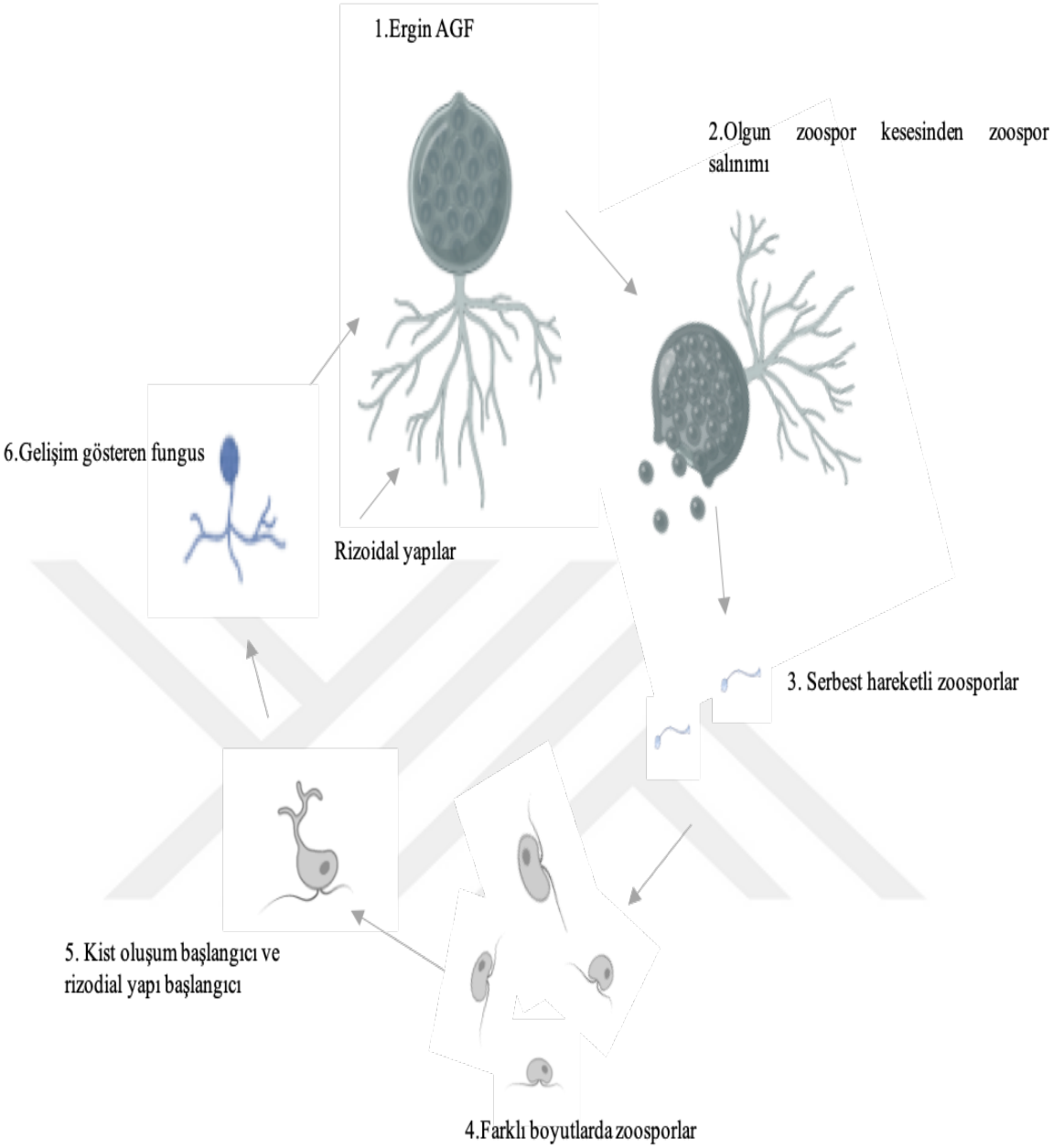
1.3.1.5.2 Anaerobik Gut Funguslarının Yaşam Döngüleri

AGF hareketli zoospor ve hareketsiz vejetatif evre şekillerinde gelişim göstermektedirler. Kamçılı zoosporları olgunlaşmış spor keselerinden salınır ve kemotatik harketler ile besin kaynağına doğru hareket etmektedirler (Orpin ve Bountiff, 1978). Zoosporları birkaç saat hareketli halde olabildikleri halde salınımlarından 30 dakika sonrasına kadar besin materyaline ulaşmış olmaktadırlar (Lowe ve ark.1987a). Besin maddelerine kemotatik davranış biçimleri ile ulaşan zoosporlar daha sonra besin materyallerine tutunarak kamçılarını kaybetmektedirler. Besin maddesine tutunarak hareketli formlarını kaybeden anaerobik gut fungusları bir kist formu oluşturmaktadırlar.

Bu oluşum sırasında rizomiselyumları ya da küresel rizodial yapılarını oluşturmaya başlamaktadırlar (Lowe ve ark.1987a) (Şekil 1.7).

Anaerobik funguslar genel olarak polisentrik ve monosentrik olmak üzere iki şekilde bir üreme şekli göstermektedirler (Dehority 2003). AGF'lerin bilinen cinsleri arasında çoğu birey Monosentrik yaşam döngüsüne sahiptir. Bu formda talluslar çimlenmenin başladığı yer olarak bilinen endojen yapılar halinde gelişmektedirler. Zoosporlar kist oluşumunu gerçekleştirdiğinden itibaren tallus başına tek bir zoospor kesesi oluşturabilen funguslar Monosentrik gelişime sahiptirler. Ancak bazı Monosentrik cinslerde (*Piromyces spp*.) tallus ekzojenus yapılar halinde gelişim göstermektedirler ki böylece iki taraflı zoospor çimlenme başlangıcı oluşmaktadır. Çekirdeğin zoospor kistin dışında gelişim gösterdiği yapılara ekzojen gelişim denilmektedir (Barr ve ark., 1989).

Polisentrik cinslerde çoğunlukla ekzojen tallus gelişimi görülmektedir. Çekirdek bir tallus üzerinde birden fazla sporkesesi oluşturabilmektedir. Genetik materyalleri tallus üzerinde herhangi bir noktadan yeni birey meydana getirebilmektedir (Lowe, 1987). Monosentrik yaşam döngüsü için döngü yem materyalinin sindirilebilirlik derecesine göre 12-36 saat arasında, polisentrik yaşam döngüsüne sahip funguslarda ise teorik olarak sonsuz saatte tamamlanmaktadır (Lowe, 1987). Küresel rizodial yapıdaki AGF'ler için, çekirdek vejetatif formdaki talluslarda, ve ekzojen gelişim görülmektedir. Tallus gelişiminin polisentrik olduğu birey sayısı sınırlıdır. Küresel rizodial yapı bir ya da birden fazla sporkesesi veya dallanmış spor kesesi oluşturabilmektedirler (Özköse ve ark., 2001).
Hareketli zoospor formdan vejetatif forma geçmeleri sırasında yem materyalini oluşturan bitki dış yüzeyine nufüz edebilme özellikleri ile düşük miktarda da olsa fiziksel bir parçalanmayı da gerçekleştirebilmektedirler. Bu özellikleri ile de diğer rumen mikroorganizmalarından ayrılmaktadırlar (Lowe ve ark. 1987; McSweeney ve ark. 1994). Polisentrik cinslerin genel özelliği bu cinslerin üreme merkezlerinin birden fazla olmasıdır. Zoospor üretimleri ya da nükleik materyalin bulunması sadece sporkesesi değil aynı zamanda kese boynu ve miselleri de kapsamaktadır. Polisentrik türlerde (*Orpinomyces* ve *Anaeromyces gibi*) zoosporlar spor kesesinden salınımı yoktur bu nedenle rizodial yapılar arasından germ tüp içerisine dağılmış olarak yaşam sürdürebilir ve gelişim gösterebilirler Zoospor kistin gelişmede başka bir fonksiyonu yoktur ancak kist duvarları kalıcı olabilmektedir ve germ tüpü diğer filamentli funguslara benzer şekilde bir miselyum (rhizomycelium) içine uzar ve dallanmaktadır



Şekil 1.7 Anaerobik gut funguslarında yaşam döngüsü, 1: spor kesesi oluşmuş, rizodial gelişim tamamlanmış ergin birey, 2: Zoospor kesesi olgunlaşıp zoosporların oluştuğu zoospor kesesi, 3: Zoosporların spor kesesinden salınımı, 4: Zoosporların ergin forma dönüşüm aşaması rizodial yapıların başlaması

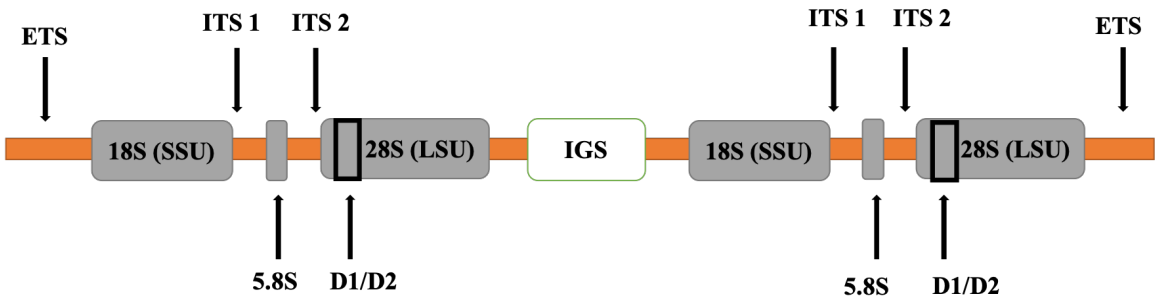
Herbivor türü farketmeksizin AGF yaşam döngüllerinde uyku modu sözkonusudur. AGF'lerin zorunlu anaerob olmalarına rağmen oksijene maruz kalan dışkı örneklerinden izole edilebilmeleri onların uyku modundaki formlarını anlatmaktadır. Bu faz halen tam olarak aydınlatılamamıştır (Milne ve ark.1989; McGranaghan ve ark. 1999, Griffith ve ark., 2009). Melaninleşme ile zoospor kesesinin oksijene karşı dirençli forma dönüştüğü bu nedenle de dışkı örneklerinden izole edilebildiği düşünülsede (Wubah ve

ark., 1991) daha sonraki yapılan çalışmalarda yaşlanmış fungal yapıların melanin içermediği belirlenmiştir (Richardson ve ark. 1993).

1.4. Moleküler Sistematik

Filogenetik ilişkinin belirlenebilmesi amacıyla ITS bölgesinin tamamı ya da LSU gen bölgesinin bir kısmı kullanılmaktadır. ITS1 DNA dizisi AGF için en geniş alana sahip filogenetik sınıflandırma olarak kabul edilmektedir (Griffith ve ark., 2010). Yaygın olarak 18S RNA ya da ITS 2 gen bölgeleri kullanılmamaktadır çünkü bu bölgelerin ITS 1 bölgesine göre daha az filogenetik bilgi içerdiği düşünülmektedir (Griffith ve ark., 2010). Ancak son çalışmalarda ITS 1 bölgesinin filogenetik çalışmalarda dizilimin sabit olmaması nedeni ile sorun oluşturduğu ve bu nedenle de 28S rRNA alt ünitesi (LSU) ITS 1 bölgesi yerine tercih edilmeye başlanmıştır. Her ne kadar LSU bölgesi önerilsede hala ITS 1 bölgeleri filogenetik analizlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Ribozomun büyük alt ünitesinde yer alan D1/D2 bölgesi de ITS1 bölgesi ile benzerik göstermektedir (Wang ve ark., 2017).

Tanımlama yapılan bu gen bölgeleri 'External Transcrip Spacer' bölgesi ile başlayıp 18S (SSU) Küçük alt ünite, ITS1, 5.8S, 28S (LSU) büyük alt ünite ve bu bölüm içerisindeki D1/D2 bölgeleri, Intergenic spacer şeklinde dizilmiş bir alanı kapsamaktadır (Şekil 1.8).



Şekil 1.8 Ribozomal RNA operonu şeması (SSU:Small Subunit, LSU :Large Subunit, ITS Internal Transcript Spacer 1 ve 2 , ETS: External Transcript Spacer, IGS: Intergenic Spacer)

1.5. Mikroorganizmaların Muhafazası

Mikoplazma, bakteriler, arkea, protozoanlar ve funguslar gibi mikroorganizmaların izolasyon ve saflaştırılma aşamalarından sonraki en önemli husus uzun süreli canlılıkları koruma amaçlı muhafaza edilmeleridir. Herhangi bir mutasyona ve genetik varyasyona

uğramadan mikroorganizmaların saf kültür şeklinde ve temel niteliklerini kaybetmeden korunmaları önemli bir konudur. Kültürlerin saf olarak özelliklerini koruyabilmeleri ve daha uzun süreli canlılıklarını koruyabilmeleri açısından muhafaza koşullarının iyileştirilmesi önem arz etmektedir. Günümüzde kültürlerin güvenli bir şekilde muhafaza edilebilmeleri için kısa süreli ve uzun süreli saklama yöntemleri kullanılmaktadır. Kısa süreli saklama uygulamaları en yaygın ve en basit yöntem olan döngüsel alt kültüre alma, sıvı parafin altında saklama ve damıtılmış su içerisinde saklama şeklinde sıralanabilir (Ekinci ve ark., 2006; Öztürk ve ark. 2015). Bu yöntemlerin göreceli kolay uygulanabilir ve ekonomik olmasına karşın, süreklilik gerektirmesi ve kontaminasyon riski altında bulunması gibi nedenlerle önemli dezavantajları da bulunmaktadır (Öztürk ve ark. 2015). Diğer taraftan hücrelerin dondurulması ve kristalize hücre içi sıvının vakum altında sübliminasyon ile ortamdan uzaklaştırılması (liyofilizasyon) (Morgan ve ark. 2005) ve düşük sıcaklıklarda (karyoprezervasyon) korunma yöntemleri ise son yıllarda en yaygın olarak kullanılan uzun süreli mikroorganizma muhafaza yöntemini oluşturmaktadır (Abdelwahed ve ark. 2002; Çömlekçioğlu ve ark., 2008; Clark ve Stensvold, 2016). Özellikle liyofilizasyon olarak adlandırılan dondurarak kurutma, temel anlamda prokaryotik mikroorganizmaların geniş kültür koleksiyonlarını depolamak, taşımak ve uzun süreli muhafaza etmek için tercih edilen yöntemdir (Morgan ve ark. 2005).

Mikroorganizmaların hücre yapılarının saklama koşullarından etkilenmemesi için koruyucu kimyasallar kullanılmaktadır. Bu kimyasallar içerisinde yaygın olarak kullanılmakta olan gliserol, dimetilsülfoksit (DMSO) ve polietilen glikol (PEG) gibi kriyoprotektanlar hücre içerisine de girerek donma zararına karşı hücre bütünlüğünü hem içerden hem de dışardan korurken, sakkaroz, glikoz, sorbitol, mannitol, dekstran ve nişasta gibi maddeler koruyuculuklarını sadece hücre dışından sergilemektedirler (Korbutt ve ark. 1997). Bu koruyucu kimyasallar içerisinde AGF'ların ökaryotik hücre yapılarının korunması amacıyla en yağın olarak kullanılanları ise gliserol ve dimetil sülfoksittir (DMSO) (Yarlett ve ark., 1986; Rich ve ark. 1994).

Geniş. yelpazeli endüstriyel öneme sahip enzimatik sistemleri (Akyol ve ark.,2009) nedeni ile yoğun olarak kullanılan bu mikroorganizmaların uzun süreli muhafaza edilmeleri konusu her geçen gün önemini biraz daha artırmaktadır (Chetverikova 2009; Solomon ve ark., 2016).

AGF *in vitro* şartlarda kullanılan besi yerindeki karbon kaynağının yapısına bağlı olarak (glikoz, ksiloz gibi suda eriyebilir hazır enerji kaynakları kullanıldığında daha kısa olmak üzere) 8-32 saat süren bir hayat döngüsüne sahiptir (Lowe et al., 1987, Ozkose ve

ark.2001). AG Funguslarının *in vitro* şartlarda uzun süreli kültüre alınabilmeleri için 2-5 günlük süreler içerisinde yeni besi yerlerine aktarılmaları gerekir. Bu işlem yapılmadığı durumlarda karbon kaynağının azalması, metabolik faaliyet sonucu açığa çıkan gazlar nedeniyle ortam basıncının yükselmesi ve en önemlisi pH seviyesinin düşmesi gibi nedenlerle fungusların yaşam kıstasları önemli ölçüde kısıtlanmaktadır (Milne et al., 1989). Diğer taraftan bazı monosentrik üreme sistemine sahip fungal izolatların 7 aya kadar enerji kaynağı olarak sisal içeren bazal besi yerlerinde 39 ^{o}C de alt kültüre alınmadan yaşamlarını sürdürebildikleri rapor edilmiştir (Joblin 1981). Benzer şekilde polisentrik üreme sistemine sahip *Anaeromyces* sp EO12 suşunun yaklaşık 2 ay kadar benzer şartlarda canlılığını koruyabildiği bilinmektedir (Brookman ve ark., 2000, Ozkose, 2001). Anaerobik fungal cinsler içerisinde yer alan ve küresel rizodial yapıya sahip *Cyllamyces sp*. ve *Caecomyces spp* ye ait bireyler diğerlerine göre düşük sıcaklıkta muhafaza sonrası canlandırılmalarında/aktifleştirilmelerinde düşük canlılık oranlarına sahiptirler (Ozkose, 2001; Negpal ve ark. 2012). Bu cinslerin kültür koleksiyonlarındaki canlılık oranlarını arttırmak amaçlı sınırlı sayıda yapılan çalışmalarda -70°C'de en iyi saklama yöntemi %10 gliserol ile saklama olarak önerilmektedir. Bunu %10 dimetil sülfoksit (DMSO) ve %10 etilen glikol, takip etmektedir. Ancak bütün bu çalışmalarda da bu cinsler yine diğer cinsler arasındaki canlılık oranının altında kalmakta ve yine diğerlerine oranla daha kısa zaman diliminde canlı kalabilmektedirler (Negpal ve ark. 2012). *Neocallimastix patriciarum'un*, kriyoprotektan olarak %5 dimetilsülfoksit içeren sıvı ortamda başarıyla muhafaza edilebildiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Orpin ve Bountiff, 1978). Bu cinse ait muhafaza çalışmalarına -80 °C 'de uzun süreli muhafaza yöntemide eklenmiş, ancak sadece sıvı azot ile uzun süreli muhafazada başarı elde edilebildiği gözlemlenmiştir. (Yarlett ve ark., 1986b).

1.6. Yağlar

Genel olarak suda çözünemeyen ancak eter, benzen, kloroform gibi organik çözücülerde çözünebilen farklı yapılı bileşikler yağ (lipit) adı altında toplanmaktadır (Özdemir ve Denkbaş, 2003). Yağların fiziksel ve kimyasal özellikleri içerdikleri yağ asitlerinin kompozisyonuna bağlıdır. Gliserol ve yağ asitlerinden oluşurlar. Gliseroller hemen her yağda aynı olurken yağ asitleri yağlar arasında farklılık göstermektedir (Karaca ve Aytaç, 2007).Yağlar sadece enerji kaynağı olmayıp aynı zamanda yağda çözünen

vitaminler sayesinde vitamin içermeleri proteinlerle birleşip lipoproteinleri oluşturmaları gibi özelliklerinden dolayı oldukça önemlidirler (Olcay ve ark., 2012).

1.6.1. Yağların Genel Özellikleri Ve Fonksiyonları

Lipitler yapılarında C,H,O, elementlerini ancak bazıları ise azot, fosfor ve kükürt elementlerini bulundurmaktadırlar. Katabolize edildiklerinde karbon hidratlara göre oldukça fazla enerji verirler ancak katabolize edilebilmeleri için de protein ve karbonhidratlara göre fazla oksijene ihtiyaç duyulmaktadır. Suda çözünemezler, enerji kaynağı olarak kullanılabilirler, yağ asitlerinin kaynaklarıdırlar ve vitaminlerin taşıyıcılığı ile işlevlerini arttırıcıdırlar (Kara 2009).

Rumen mikroorganizmaları olumlu etkilerini kısa zincirli yağ asitleri gibi metabolitler ile göstermektedir. Butirat, asetat ve propiyonat gibi kısa zincirli yağ asitleri hayvanlar tarafından sindirilemeyen karbonhidratların bakteriler tarafından fermantasyonu ile üretilmektedir. Böylece hayvanlar bu yağ asitlerini enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir (Stanley ve ark., 2014).

1.6.2. Yağların Sınıflandırılması

Yağlar, basit yağlar, bileşik yağlar, yağ türevleri olmak üzere üç grup altında sınıflandırılır. Basit yağlar, yalnızca karbon, hidrojen ve oksijenden meydana gelen yapılardır. Basit liptlere örnek olarak gliseridler, mumlar, streol esterleri gösterilebilir. Bileşik (konjuge) yağlar, yapılarında karbon, hidrojen ve oksijen dışında azot, fosfat ve kükürt bulunduran lipitlerin fosforik asit, karbonhidrat ve protein gibi moleküllerle bir araya gelerek oluşturdukları yapılardır. Bileşik lipitler lipoproteinler ve sakkarolipitleri kapsamaktadır. Yağ türevleri grubuna ise yağ asitleri yağda eriyen renk maddeleri, yağda eriyen vitaminler, karbonhidratlar girmektedir. Bu grup steroller, lipovitaminler, hidrokarbonlar ve antioksidanları kapsamaktadır (Tvrzicka ve ark.,2011).

1.6.3. Yağ Asitleri

Yapısında hidroksil grubu (-COOH) taşıyan düz bir hidrokarbon zincirinde çift karbon içeren yapılardır. Yağ asitleri trigliseridlerin temelini oluşturmaktadır. Bu zamana kadar tanımlanmış 200 den fazla yağ asiti bulunmaktadır (Covington ve ark.,2004). Yağ asitlerinin karbon sayıları 2-34 arasında farklılık göstermektedir ve yağ asidi içerisinde bulunan karbon sayılarına göre eğer karbon sayısı 6'dan az ise kısa zincirli yağ asitleri, 6-10 arasında karbon bulunuyorsa orta zincirli 1 ve daha fazla ise uzun zincirli yağ asitleri

olarak adlandırılırlar. Yağ asitleri, molekülün bir ucunda bir metil grubu (diğer adıyla omega) ve diğer ucunda bir karboksil grubuna sahip karbon zincirleridir. Tüm yağ asitleri metabolizmada önemli rol oynamaktadırlar. Yağ asitlerinin fiziksel, kimyasal ve beslenme özellikleri, molekülündeki karbon atomu sayısı, doymuşluk derecesi, karbon atomları arasındaki çift bağ sayısı ve karbon atomlarına bağlı hidrojenlerin pozisyonu ile belirlenmektedir (Çakmakçı ve ark., 2012).

1.6.3.1. Doymuş Yağ Asitleri

Karbon-karbon atomları arasında tek bir kovalent bağdan oluşan ve oda sıcaklığında genel olarak katı halde olan yağ asitlerine doymuş yağ asitleri denir. Bir diğer isimleri ise satüre yağ asitleridir. Bu yağ asitlerince zengin olan yağlara ise doymuş yağlar denilmektedir. Doymuş yağ asitlerinin karbon bağlarının hepsi hidrojen ile doyurulmuş haldedir ve bu yüzden oldukça kararlı bir yapıya sahiptirler. Genellikle çift karbon atomu içermektedirler. Karbon sayılarına ve sistematik adlarına göre doymuş yağ asitleri Çizelge 1.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.3 Doymuş yağ asitlerinin karbon içeriği ve sistematik adı

Doymuş Yağ Asidi	Karbon Sayısı	Sistematik Adı
Bütirik Asit	4	n- Bütoni
Kaproik Asit	6	n- Hekzanoik
Kaprilik Asit	8	n- Oktanoik
Kaprik Asit	10	n- Dekanoik
Laurik Asit	12	n-Dodekanoik
Miristik Asit	14	n-Tetradekanoik
Palmitik Asit	16	n-Hegzadekanoik
Stearik Asit	18	n-Oktadekanoik
Arasidik Asit	20	n-Eikosanoik
Behenik Asit	22	n-Dokosanik
Lignoserik Asit	24	n-Tetrakosanoik

1.6.3.2. Doymamış Yağ Asitleri

Karbon zincirinde çeşitli konumlarda karbon- karbon arasında bir veya birden fazla kovalent çift bağ içeren yağ asitlerine doymamış yağ asitleri bu yağ asitlerince zengin yağlara ise doymamış yağlar denilmektedir. Yapılarındaki çift bağlar nedeni ile doymamış yağlar doymuş yağlara göre daha reaktiftirler. Genel olarak doymamış yağ

asitleri insan vücudu için gereksinim duyulan zorunlu yağ asitleridir. Oda sıcaklığında genel olarak sıvıdırlar ve çoğu bitkisel kaynaklı yağlardır (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4 Doymamış yağ asitlerinin karbon içeriği ve sistematik isimleri

Doymamış Yağ Asidi	Karbon Sayısı	Sistematik Adı
Palmitoleik	16	Cis-9-Hekzadekenoik
Oleik	18	Cis-9-Oktadekenoik
Linoleik	18	Cis-9,12-oktadekadienoik
α-Linolenik	18	Cis-9,12,15-Oktadekatrienoik
Araşidonik	20	Cis-5,8,11,14-eicosatetraenoik
Nevronik	24	Cis-15,16-tetrakozenoik asit
Vaksenik asit	18	trans- cis11,12-oktadekenoik
Linolenik asit	18	9,12,15-oktatekatrienoik asit
Miristoleik asit	14	Cis9-10- tetradekenoik asit
Kaproleik asit	10	9-desenoik asit
Lauroleik asit	12	9-dodesenoik asit
Eurisik asit	22	Cis-13,14-dokozenoik asit

Oleik asit, vaksenik asit, palmitoleik asit, linolenik asit, linoleik asit ve araşidonik asit rumen mikroorganizmaları tarafından üretilmektedir ve rumen içeriğinde bulunan yağ asitleridir. Yağ asitlerinin hayvansal gıdalarda bulunuğu bilinmektedir. Bu gıdalarda bulunan Lactobaciller, lactocoocuslar ve streptococuslar başta olmak üzere yağ asiti üretebilme yetenekleine sahiptirler (Sieber ve ark.,2004). Bazı gıdalara ait yağ asitleri kompozisyonları Çizelge 1.5. ‘de gösterilmiştir.

Çizelge 1.5 Süt içerisinde bulunan mikrobiyal kaynaklı yağ asitleri ve yüzdeleri (Anitaş ve ark., 2019;Şengül ve ark.,2011; Sumarmono ve ark.,2015)

Sütteki Yağ asitleri	% Yağ Asidi İçeriği
Palmitik Asit	32
Oleik Asit	23
Stearik Asit	13
Linoleik Asit	3.5
Araşidonik Asit	0.8
Peynir	% Yağ Asidi İçeriği
Palmitik Asit	24
Oleik Asit	9.5
Stearik Asit	-
Linoleik Asit	0.2
Araşidonik Asit	-
Yoğurt	% Yağ Asidi İçeriği
Palmitik Asit	16
Oleik Asit	21
Stearik Asit	11
Linoleik Asit	4
Araşidonik Asit	0.2

Doymamış yağ asitleri de kendi arasında tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. MUFA yapılarında bir çift bağ içeren yağ asitleridir. PUFA yağ asitleri ise yapılarında birden fazla çift bağ bulundurmaktadırlar. PUFA yağ asitleri hormon benzeri bileşiklerin yapısına katılırlar. Çoklu doymamış yağ asitleri omega -6 ve omega -3 olmak üzere kendi aralarında ikiye ayrılmaktadır. Çoklu doymamış yağ asitlerinden en önemlileri olan linoleik asit γ-linolenik asit, araşidonik asit omega-6 yağ asitleri içerisine girmektedir. Bilinen omega-3 yağ asitleri arasına ise α- linolenik asit ve metabolitleri girmektedir (Ascheris ve Willett 1997).Tekli doymamış yağ asitlerinin aynı zamanda yüksek yoğunluklu lipoproteini arttırıcı etkisi bulunmaktadır. Bu nedenle doymuş yağ asitlerinin mikroorganizmalar tarafından tüketimi azaltılırken tekli doymamış yağ asitlerinin tüketim miktarının arttırılması söz konusu olabilmektedir (Samur, 2006).

Çoklu doymamış yağ asitlerinin de tekli doymamış yağ asitleri gibi vücuda önemli katkıları vardır. Doymuş yağ asitleri ile tekli doymamış yağ asitleri insan ve hayvanlarda sentezlenebilmektedirler ancak çoklu doymamış yağlar sentezlenememektedirler bundan dolayı esansiyel yağ asitleri olarak adlandırılırlar (Mol, 2007).

1.6.4. Uçucu Yağ Asitleri

Rumen fermantasyonunun nihai ürünleri arasında uçucu yağ asitleri (çoğunlukla asetat, propiyonat ve bütirat) ve gazlar [CO_2 (% 65) ve CH_4 (% 27)] bulunur. Uçucu yağ asitleri hayvanın ana karbon ve enerji kaynağıdır. Bu fermantasyon işlemi, laktat, süksinat, format, H_2 ve NH_3 gibi birçok ara ürünle sonuçlanmaktadır (Hungate 1966; Clarke, 1977)

1.6.5. Trans Yağ Asitleri

Trans konfigürasyonunda en az bir çift bağ içeren doymamış yağ asitleridir. Trans yağ asitleri basitçe doğal halinde cis olarak bulunan yağ asitlerinin geometrik izomerleridir ve bu geometride bulunan dönüşüm sonucunda daha düz zincirli daha stabil konumda bir yağ asidi oluştururlar.

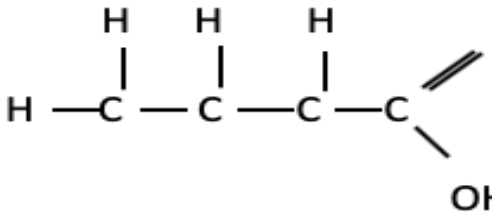
Trans asitler üç yolla oluşurlar. Bunlardan ilki biyokimyasal hidrojenasyon olarak adlandırılan reaksiyonlardır. Bu reaksiyon ruminant hayvanların rumenindeki mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilmektedir. Örneğin konjuge linoleik asit bu yol ile oluşmaktadır. Bir diğer yöntem yüksek sıcaklık uygulamalarıdır. Bu yöntemde fiziksel rafinasyon sırasında sıcaklık 240 derecenin üzerine çıkartılır ve bu sırada trans yağların oluşumu söz konusudur. Son yöntem ise kısmi hidrojenasyondur. Bu yöntemde katalizörler eşliğinde yağların hidrojen basıncı ve sıcaklıkla belirli bir iyot eşiğine kadar doyurulması işlemidir.

1.7. Mikrobiyal Yağ Asitleri

Mikroorganizmalar fermantasyon yolu ile karbonhidratları parçalayarak şekerler, proteinler, peptitler ve yağ asitleri gibi primer metabolitleri ve sekonder metabolitleri oluşturabilmektedirler (Ratledge,2004). Bu metabolitlerden kısa zincirli yağ asitlerinin büyük bir kısmını oluşturan asetat pek çok bakteri tarafından üretilmektedir (Raman ve ark. 2016). Laktik asit bakterileri linoleik asiti konjuge linoleik asite dönüştürerek sekonder metabolitleri oluşturmaktadır. Üretilen KLA, bir cis-9, trans-11-oktadecadienoik asit (18: 2) ve trans-9, trans-11-18: 2 karışımını içerir. Katalizör olarak kullanılan *Lactobacillus plantarum* AKU 1009 a, linoleik asitten KLA üretiminin optimize edilmiş koşullar altında 40 mg / ml'ye ulaşan miktarlarda olduğu gözlemlenmiştir (Owaga ve arkadaşları 2005). *L. curvatus* HLS ve *L.plantarum* HP1 en fazla KLA üretebilen mikroorganizmalar olarak belirlenmiştir (Yıldırım ve ark., 2017).

Bütirik asit, stearik asit, palmitik asit, linoleik asit, oleik asit ve konjuge linoleik asitler gibi doymuş ve doymamış yağ asitleri bakteri ve funguslar tarafından hem ana ürün hem de yan ürün olarak üretilmektedir.

Bütirik asit, 4 karbonlu, renksiz, karakteristik kokulu, yağsı bir karboksilik asittir (Lehninger ve ark. 1993, Widmer ve ark. 1996, Bilgin ve ark. 2014). Suda çözünebilir ve oda sıcaklığında uçucudur (Smith ve ark. 1998). Tereyağı asidi olarak da bilinen bütirik asit sütte doğal olarak bulunmaktadır (Şekil 1.9) (Bilgin ve ark. 2014).



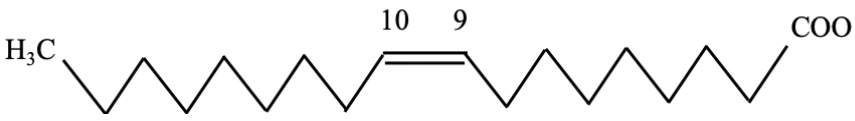
Şekil 1.9 Bütirik asit açık formülü

Stearik asit (Şekil 1.10) yapısında 18 karbon atomu bulundurur. Bu yağ asiti rumendeki biyohidrojenasyonun son ürünüdür.



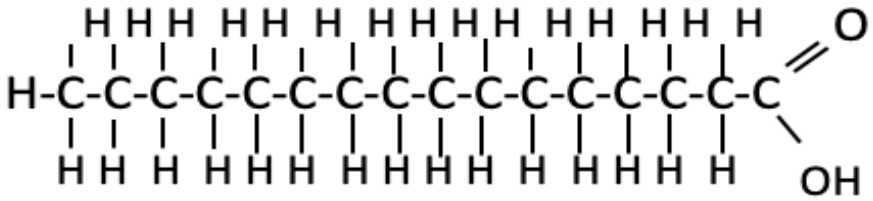
Şekil 1.10 Stearik asit açık formülü

Oleik asit, Şekil 1.11'de gösterildiği gibi 18 karbon atomundan oluşan ve bir çift bağ yapısına sahip 9-oktadekenoik asittir. Önemli bir doymamış yağ asitidir. Günümüzde yaygın olarak omega 9 yağ asiti olarak bilinmektedir.



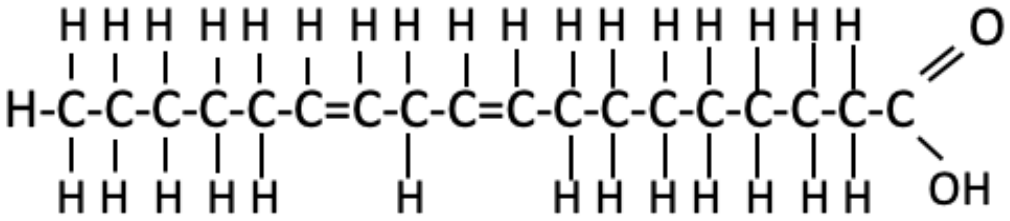
Şekil 1.11 Oleik asit açık formülü

Palmitoleik asit 16 karbon atomundan oluşan (Şekil 1.12) ve oleik asit gibi bir çift bağ sahip olan bir yağ asitidir. Ancak bağ yapısı 9-10 karbon atomları arasındadır. Zoomerik asit olarak da bilinir. Bitkisel ve hayvansal yağlarda oranı %1'in altındadır. Ancak balık yağlarında oranı%10'lar civarına çıkmaktadır.



Şekil 1.12 Palmitik asit açık formülü

Linoleik asit en önemli çoklu doymamış yağ asididir ve bütün bitkisel yağlarda bulunur. Bunların bir çoğunda majör bileşendir. Örneğin ayçiçeği, aspir, mısırözü, pamuk ve susam yağlarında miktarı %50'nin üzerindedir. Linoleik asit (Şekil 1.13), doğada cis şeklinde bulunmaktadır. İçerdiği karbon atomu sayısı 18 olup 2 çift bağ yapısına sahip 9-12 oktadekeanoik asittir. Yaygın olarak omega 6 yağ asiti olarak bilinmektedir.



Şekil 1.13 Linoleik asit açık formülü

Konjuge linoleik asit ilk olarak 1979 yılında Pariza tarafından yapılan bir araştırma da pişirilmiş sığır etindeki antikanserojenik etkisi sayesinde bulunmuştur (Pariza ve ark.,1979). Konjuge linoleik asit (KLA), yağ asidi zincirinde farklı karbon pozisyonlarında iki konjuge doymamış çift bağa sahip bir yağ asitidi olarak tanımlanmaktadır. Linoleik asidin pozisyonel ve geometrik izomerlerini temsil etmektedir. KLA ruminal biyohidrojenasyon sırasında mikrobiyal enzimlerle oluşmaktadır. Bu nedenle geviş getiren hayvanlardan elde edilen ürünler KLA'nın asıl kaynağıdır (Watkins ve ark., 2002). KLA tek bağlı bir ciste ayrılmış iki çift bağ içerir ve trans konfigürasyonu ise yaygın olarak 8 ve 13. karbonları arasında bulunmaktadır (Gaullier ve ark.,2002). KLA 28 farklı izomeri kapsamaktadır. KLA'nın iki yaygın izomeri trans10-cis12 ve cis9-trans11'dir ve cis9-trans11 izomerleri yaygın olarak rumenik asit olarak ifade edilmektedir (Gaullier ve ark.2002).

1.7.1. Konjuge Linoleik Asit, Yapısı ve Biyosentezi

KLA tek bir yağ asidini oluşturmamaktadır. Linoleik asitin konjuge dieonik izomeri olarak isimlendirilmektedir. Doğal olarak en yüksek miktarda bulunan konjuge linoleik asit izomeri cis-9, trans-11 izomeridir (Pariza ve ark.,2001). Doymamış yağ asitlerinin rumen mikroorganizmaları tarafından hidrojen eklenerek doymuş yağ asitlerine çevrilmesine biyohidrojenasyon adı verilir. Çoğunlukla rumende gerçekleşen bu reaksiyon bazen bağırsaklarda (sekumda) da meydana gelmektedir (Harfoot 1981).

KLA izomerleri son ürünü steraik asit olan iki metabolik yol ile sentezlenmektedir. İlk metabolik yolda c9,t11 izomeri rumende linoleik asitin stearik asite çevirilmesi sırasında *Butyrivibrio fibrosolvens* tarafından biyohidrojenasyon yöntemi ile gerçekleşir. Bir rumen bakterisi olan *Butyrivibrio fibrosolvens'* in sahip olduğu linoleat c12,t11 izomeraz serbest –COOH (karboksil) grubu varlığında ve uygun pH aralığında (7.2-8.2) maksimum aktivite göstererek 12. karbon atomunda bulunan çift bağı 11. karbona taşır ve c/c olarak bulunan konfigürasyon c/t olarak değişir. Bu aşamada c9,t11 izomeri ara ürün olarak sentezlenir ve bir kısmı dokulara taşınır (Yang ve ark., 2014). İkinci yol ise meme dokusunda vaksenik asitten konjuge linoleik asit oluşumudur. Dokulara iletilmeyen izomerler KLA redüktaz indirgenek trans vaksenik asit (t11-oktadesenoik asit C:18) oluşturulur ve bu bileşiğin de bir kısmı dokulara taşınır. Dokulara taşınmayan kısmı metabolik yolun son basamağında diğer bakteriler tarafından hidrojenize (doyurulmuş format) edilerek stearik asite dönüştürüldüğü düşünülmektedir (Yang ve ark., 2014). Her iki metabolik yol ile KLA izomerinin sentezi adipoz dokularda ve memeli salgı bezinde gerçekleşir. Emilim ile dokulara taşınan trans vaksenik asitten endojen delta desaturaz yardımı ile c9,t11 ve t10, oktadesenoik asitten de t10,c12 izomerleri desaturasyonla sentezlenir (Yang ve ark., 2014). Birinci metabolik yol sadece ruminantlarda gerçekleşirken ikinci metabolik yol ruminantlarda ve monogastriklerde gözlemlenir (Turuni ve ark. 2001).

1.7.1.1. KLA'nın Dokularda Sentezi

KLA metabolizması LA metabolizmasında KLA oluşumunun gerçekleştiği metabolik yoldur. KLA çift yönlü oluşabilen bir yağ asitidir. Hem LA'nın hidrojenasyonu ile vaksenik asit oluşumu sırasında açığa çıkar hem de vaksenik asitten meme dokularında tekrar linoleik asit oluşumu sırasında oluşabilmektedir. İnsan ve hayvan dokularında KLA delta-9 desatüraz, elongaz ve delta-5 desatüraz enzimleri yardımı ile trans vaksenik asitin desaturasyonu ile sentezlenmektedir. Ancak bu yıkım

sadece 9-cis,11 trans ve 10-trans,12 cis için geçerlidir (Banni 2002). Her bir izomer için farklı durumlar söz konusu olurken KLA mekanizması hala net olarak bilinmemektedir (Pariza 2004; Parodi 2004).

1.7.1.2. Rumende KLA'nın Biyosentezi

Biyohidrojenasyon süreci oldukça uzun süren ve rumende bakteriyel metabolik faaliyetlerin sonucu ortaya çıkan bir süreç olarak bilinmektedir. KLA'nın biyohidrojenasyonu rumende büyük oranda bakteriler tarafından ve çok az miktarda da protozoanlar tarafından gerçekleştirilir (Singh ve Hawke 1979). Biyohidrojenasyonda birçok selülolitik rumen bakterileri yer alıyor olsa da biyohidrojenasyonda en önemli rol *Butytivibtio fibrosolvens* tarafından gerçekleşir. Biyohidrojenasyon yem materyali üzerine bakterilerin tutunması veya serbest halde iken hücre dışı enzimlerin bakteriler tarafından salınması ile gerçekleşmektedir. Başlıca en önemli rumen bakterisi olan *Butytivibrio fibrisolvens*, *Clostridium* familyasına ait olup biyohidrojenasyonda KLA ve KLNA üretimini sağlamaktadır. Bakteriler linoleik asiti (LA) c9t11-KLA'ya dönüştürür ve sonra t11-C18: 1'e hidrojene edilir. c9t11-KLA oluşumu hidrojenasyon reaksiyonuna kıyasla son derece hızlıdır (Kepler ve ark., 1966). LNA'dan *B. fibrisolvens* tarafından oluşturulan birincil ara madde c9t11c15-KLNA'dır (Kepler ve Tove, 1967). Bu KLNA izomer ayrıca, en az bir trans-çift bağ ihtiva eden konjuge olmayan bir C18: 2 yağ asidine hidrojene edilir.

KLA izomerleri linoleik ve linolenik gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin rumende bulunan *B.fibrisonvens* bakterisi başta olmak üzere rumen bakterileri tarafından stearik aside biyohidrojenasyonu sırasında oluşmaktadır. Rumende meydana gelen indirgenme reaksiyonlarıyla, linoleik asit önce c-9, t-11 oktadekadienoik aside ondan sonra trans vaksenik aside (C18:1, t-11) ve daha sonra stearik aside dönüştürülmektedir. Alfa linolenik asit ise önce konjuge oktadekatrienoik (c-9, t-11, c-15) aside ikinci basamakta oktadekadienoik (t-9, c-15) aside, üçüncü basamakta trans vasenik (C18:1, t-11) aside daha sonrada stearik aside (C18:0) dönüşmektedir (Çelebi ve Kaya, 2008).

Hayvan yemleri ile alınan yağlar rumende, rumen bakterileri tarafından iki ana dönüşüm yoluna uğratılırlar. İlk olarak diğer dönüşüm yolu için gerekli olan ve mikrobiyal lipazlar tarafından katalizlenen ester bağları hidrolizlenir ve daha sonra ikinci basamak olarak yağ asitleri biyohidrojenasyona uğrar. Rumen içerisinde meydana gelen

indirgenme reaksiyonları aracılığı ile linoleik asit önce c-9,t-11 oktadekatrienoik aside daha sonrada stearik asite dönüşüm gerçekleşir.

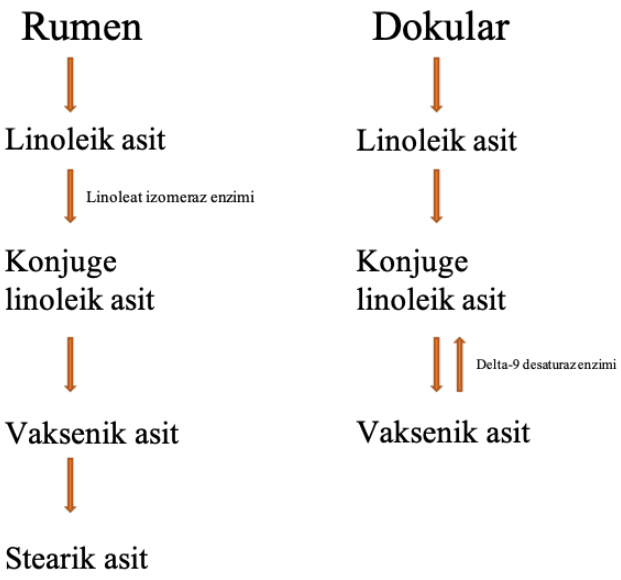
1.8. Konjuge Linoleik Asit (KLA) Sentez Enzimleri

Linoleik asitin konjuge linoleik asite çevrilmesi iki farklı yerde iki farklı enzim ile gerçekleşmektedir. Linoleik asitin rumende stearik asite dönüşümünde KLA ara ürününü linoleat izomeraz ve dokularda linoleik asitin vaksenik asite dönüşümünden sonra vaksenik asitten KLA oluşumunu Δ9-desaturaz enzimleri gerçekleştirmektedir (Yaqoob ve Tricon, 2006).

Linoleat izomeraz (EC 5.2.1.5), linoleik asitin konjuge forma dönüşmesinde rol alan enzimdir (Kepler, 1967). İlk olarak izomerizasyonu gerçekleştirerek linoleik asitin konformasyonunu değiştirmekte daha sonrada hidrojene doyurarak vaksenik asite son olarak stearik asite dönüşümü gerçekleştirmektedir (Hazlewood, 1988). Sırasıyla LA ve LNA'dan KLA ve KLNA üretme kabiliyeti, bu dönüştürmeyi *Butrivibrio*, *Lactobasiller*, *Propiyonibakteriler, Bifidobakteriler* ve *Klostridia* da dahil olmak üzere birçok bakteri türünde tespit edilmiştir. Bu linoleat izomeraz (LAI) aktivitesini ifade eden türler, sırasıyla LA ve LNA'dan c9t11-KLA ve c9t11c15-KLNA üreten bakteriler ve çoğunlukla LA'dan t10c12-CLA üretebilen bakteriler olmak üzere iki gruba ayrılabilir (Gorissen ve ark.,2015).

Linoleat izomeraz (LAI) protein dizileri GenBank'da mevcuttur. Bunlar, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium breve*, *Lactococcus lactis subsp*. *Lactis, Lactococcus acidophilus*, *L.plantarum*, *L.reuteri*, *Propionibacterium acnes* ve *Rhodoccus eritropolisi* bakterilerine ait LAI dizileri içermektedir.

Linoleik asitin ruminantların meme dokularında trans vaksenik asite desaturasyonu sırasında KLA ara ürününün oluşumundan sorumlu enzim delta 9 desaturaz olarak bilinmektedir (Yaqoob ve Tricon 2006). Linoleik asitin konjuge linoleik asit üretim mekanizmasına ait yolaklar Şekil 1.14'de gösterilmiştir. Buna göre linoleik asitin ve konjuge linoleik asitin çift yönlü reaksiyonlar ile üretilebildiği görülmektedir.



Şekil 1.14 Linoleik asitin rumen ve dokulardaki sentezi ve oluşan yağ asitleri

1.9. Gıdalarda KLA

İnsanlarda KLA sentezi sonucu elde edilen miktarlar oldukça düşük olduğundan dolayı dışardan ek besinler aracılığı ile alınmaktadır. KLA bakımından zengin gıdalar özellikle geviş getiren hayvanların vücut dokuları ve özellikle de yağ dokusu ile süt ve süt ürünlerinde bulunmaktadır. Ayrıca bu hayvanların sütlerinden elde edilen tereyağı, yoğurt, peynir ve dondurmada önemli miktarlarda KLA bulunmaktadır (Mir ve ark., 2004). Bu ürünlerdeki KLA miktarı hayvanların yemlerine bağlıdır. Örneğin KLA sütteki ve sığır etindeki KLA miktarı merada otlayan hayvanlarda daha fazla olabilirken taze yem alımı azaldığında bu miktar azalmaktadır (Kelly, 2001). KLA miktarı sadece hayvanın yemine değil aynı zamanda dokularında bulundurdukları delta-9 desatüraz enziminin aktivitesine de bağlıdır.

Süt yağı doymuş yağ asitleri bakımından zengin olması nedeni ile içerisinde KLA da bulundurmaktadır. Süt ürünlerini sık kullanan insanlarda koroner risk faktörlerinin gözlemlenmediği görülmektedir. Bu gıdalarda bulunan KLA ile ilişkilendirilmektedir (Baysal 2007).

1.10. KLA'nın İnsan Sağlığındaki Yeri ve Önemi

Yağlar insan sağlığı için oldukça temel ihtiyaç konumunda olduklarından besinlerde bulunması zorunlu hale gelmektedir (Jump ve ark. 1996). İnsanlar için yağ

kaynaklarını hem hayvansal (süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri) hem de bitkisel kaynaklar oluşturmaktadır (Gunstone 2001). Yağ asitleri insan vücudunda salgılanan steroid ve prostoglandin gibi moleküllerin tetikleyicisi konumundadır (Pariza ve ark. 2000). Bu moleküller insan vücudunda kan basıncını düzenleme başta olmak üzere bağışıklık sistemini kontrol etmeye kadar birçok yolakta rol oynamaktadırlar. Besin maddelerinde bulunan (özellikle geviş getiren hayvanların ürünlerinden elde edilen besin maddeleri) konjuge linoleik asit (KLA) de bu denli güçlü metabolik etkilere sahip bir yağ asidi olup önemli bir besin maddesidir.

Günümüze kadar konjuge linoleik asitin insan sağlığı üzerine olumlu etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir. İlk olarak 1985 yılında Pariza ve arkadaşları tarafından ızgara sığır etinin karsinojenik etkisi araştırılırken çalışmada ızgara sığır etindeki yağ asitlerinin prokarsinojenikten ziyade antikarsinojenik özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Daha sonraki hayvan modelli çalışmalarda da antiadipojenik (Park ve ark. 1997-99, Pariza ve ark. 2001), antikarsinojenik (Karmali ve ark. 1984, Ha ve ark. 1987, Ha ve ark. 1990, Ip ve ark. 1991, Liew ve ark. 1995, Belury ve ark. 1996, Ip ve ark. 1999, Bani ve ark. 1999, Belury 2002), antiaterojenik (Lee ve ark. 1994, Nicolosi ve ark. 1997, Moya ve ark. 1999, Kritchevsky ve ark. 2000, Gavino ve ark. 2000, Koba ve ark. 2002), antidiyabetik (Lee ve ark. 1994, Houseknecht ve ark. 1998, Ryder ve ark. 2001) ve antiinflamatuvar (Miller ve ark. 1994, Yu ve ark. 2002, Iwakiri ve ark. 2002, Yang ve Cook 2003, Harbige 2003) etkisinin olduğu, vücut yağını azaltıcı, bağışıklık sistemini güçlendirici, metabolik hızı artırıcı, kemik oluşumunu destekler özelliklerininde olduğu gösterilmiştir. KLA, kalp damar hastalıklarınıa karşıda insan sağlığı ile ilgili konular içerisinde yer almaktadır (Parodi 2004).

Antikanserojenik etkisi göz önüne alındığında yapılan çalışmalarda meme kanseri oluşumunu engellediği ve meme kanserinden korunmaya yardımcı olduğu gözlemlenmiştir. Hah ve arkadaşları (2006) KLA'nın kanser oluşumunu nasıl etkilediği konusunda kesin bir mekanizma yokken bazı teoriler ortaya koymuşlardır. Bu teorilerine göre antioksidanların nitrozlu bileşiklere benzer şekilde bazı kanserojen yapıların oluşumunu önlediği bir etkiye sahip olduklarını ve KLA nın da antioksidan özelliği sebebi ile böyle bir etkiye sahip olduklarını göstermişlerdir.

Diyabet üzerine etkilerine bakıldığında KLA leptin hormonunun plazmadaki miktarını azalttığı ve böylece diyabetin önlenmesine neden olduğu gösterilmektedir (Kong ve Pariza, 2001)Vücut yağını azaltma etkisine bakıldığında KLA yağ asitlerinin

lipolizini ve beta oksidasyonunu arttırarak apidoz dokularda yağ asitlerinin birikmesini azattığı böylece vücut yağ oranının azaldığı gözlemlenmektedir (Jenkins ve ark. 2016**)**

1.11. Tezin Amacı ve Kapsamı

Mevcut tez çalışması anaerobik gut funguslarının morfolojisi ve moleküler biyolojisi konusunda literatür bilgimizi genişletmeyi temel amaç olarak almıştır. Bu amaca ulaşmak için tez çalışması 5 ana bölüme ayrılmıştır;

1: tezin ilk aşamasında labnoratuarımız dışkı koleksiyonunda yer alan ve 14 yıl süreyle -20 ^{o}C de saklanmış olan ruminant dışkıları kullanılarak anaerobik fungus izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Böylece uzun süreli -20^{o}C de muhafaza edilmiş olan dışkılardan fungus izole edilip edilemeyeceğinin araştırılması, izole edilebilirse fungal biyoçeşitliliğin hangi düzeyde gerçekleşebileceği, bu fungusların saflaştırılması, morfolojik karakterlerine göre putatif tanımlanması, sonraki aşamada ise bu fungusların ITS bölgelerine göre moleküler tanımlanmalarının yapılması amaçlanmıştır. Aynı zamanda farklı suda eriyebilir ve suda erimeyen enerji kaynaklarının AGF lerin optimum yaşama düzeylerine olan olası etkileri de tezin bu kısmının araştırma konusu olmuştur. Bu bağlamda saf kültürler için optimum karbon kaynağı belirlenmek istenmiştir. Optimum gelişim şartlarının sağlanmasıyla kültüre alma aşamaları gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Moleküler verilere dayalı yapılan identifikasyon çalışmalarında hali hazırda GENBANK ta yer alan ITS bölgelerinin kullanılması da tez kapsamına alınmış, bu veriler kullanılarak AGF için filogenetik yapıların ortaya konulması amaçlanmıştır.

2: Mikroorganizmaların izole edilip saflaştırılma ve kültüre alınmaları kadar muhafazaları da önem taşımaktadır. AGF ların ilk kez geçerli tanımlanmalarından bu yana geçen sürede uzun süreli muhafazalarına yönelik bazı çalışmalar yapılmış olmasına karşın bu konuda henüz oturmuş bir prortokol literatürde önerilememiştir. Bu nedenle rumen protozoanlarında olduğu gibi (funguslarda başarı oranı göreceli bir miktar daha iyi olmasına karşın) AGF için de farklı yöntem ve metodolojilerin bu bağlamda araştırılması tezin ikinci ana arter çalışma konusunu oluşturmuştur. Anaerobik gut fungusları içerisinde yer alan küresel (bulbous body) rizodial sisteme sahip cinslerin ince yapılı misel oluşturan cinslere nazaran uzun süreli muhafazası sırasında canlılık oranlarının önemli ölçüde düştüğü bilinmektedir. Bu nedenle bu çalışma ile tez kapsamında izolasyonu ve saflaştırılması gerçekleştirilmiş olan ve küresel rizoidal sisteme sahip *Caecomyces* benzeri GMLF77 izolatı kullanılarak uzun süreli muhafaza koşullarının

optimize edilmesi temel hedef olarak belirlenmiştir. Bu amaca yönelik olarak farklı soğutma dereceleri, farklı karbon kaynaklarının olası etkileri roll tüp ve eğik agar besi yerlerinde kültüre alınmanın uzun süreli muhafaza sonunda canlılık oranlarına etkileri ve yeni metodolojilerin önerilmesi bu tez kapsamında amaçlanan noktalardan birisini oluşturmuştur.

3: Yağ asitlerinin gıdalarda buludukları gibi mikrobiyal kökenli olabildikleri de bilinmektedir. Mikroorganizmalar yağ asitlerini besin materyalini paçaladıkları sırada yan ürün veye son ürün olarak üretebilmektedirler. Rumen mikrobiyomu söz konusu olduğunda ise oldukça geniş bir yağ asiti kompozisyonunun olduğu bu konudaki ilk çalışmaların ışığı altında öngörülmektedir. Özellikle anaerobik rumen bakterilerinin yağ asiti formasyonundaki rolleri konusunda çok sayıda yayın olmasına karşın, bu konuda AGF için yapılmış olan çalışmalar sınırlıdır. Bu nedenle AGF'nın sentezlemiş oldukları yağ asiti kompozisyonunun belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu kompozisyon içerisinde gıdalarda da oldukça az miktarda olduğu bilinen ve genellikle hayvansal ürünlerde bulunduğu bilinen konjuge linoleik asit üretim miktarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Linoleik asitten konjuge linoleik asit üretim miktarı bakterilerde belirlenebilirken anaerobik gut funguslarında bu yolak bakteriler kadar bilinmemektedir. Böylece anaerobik gut funguslarında linoleik asitten konjuge linoleik asit üretimini sağlayan mekanizmalarının incelenmesi ile bu alandaki çalışmalara basamak oluşturmak amaçlanmıştır.

4: Mikrobiyal fermentasyonlar sonucu açığa çıkan primer ve sekonder metabolitler bulunmaktadır. Bu metabolitlerin ortaya çıkışı bazı mikroorganizmalar için yararlı olurken bazıları için istenmeyen ürünler olabilmektedirler. Buna bağlı olarak örneğin rumen bakterisi *Butrivibrio fibrisolvens* için toksik etkisi olduğu bilinen linoleik asitin biyohidrojenasyonu sonucu açığa çıkan konjuge linoleik asit patojen mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etki gösterebilmektedir. Bu çalışmada ise anaerobik gut funguslarının metabolik faaliyetleri sonucu açığa çıkan toplam yağ asitileri ile saf olarak kullanılan linoleik asit ve konjuge linoleik asitin antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak beş farklı patojen bakteri üzerinde bu yağ asitlerinin olası anti mikrobiyal özellikleri araştırılmıştır.

5: Tezin son çalışma alanı olan ve yağ asiti kompozisyonlarının oluşumunu temel noktadan etkileyen linoleat izomeraz enziminin moleküler düzeyde AGF tarafından sentezlenip sentezlenmediği konusu araştırılmak istenmiştir. Çünkü rumen bakterilerinde

bu konuda yapılmış olan çalışmalar mevcut ise de AGF tarafından bu enzimin sentezi konusundaki bilgilerimiz oldukça kısıtlıdır. Enzim bölgesinin belirlenmesi ve gözlemlenebilmesi ile bu enzimin etkinlik mekanizmalarının daha iyi anlaşılabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle NCBI da yer alan linoleat izomeraz enzimini kodlayan gen bölgelerinin oligonükleotid dizileri referans alınarak primer tasarımı yapılması ve bu şekilde laboratuvarımız kültür koleksiyonunda yer alan fanklı cinslere ait AGF izolatlarda bu genin varlığının PZR ile taranması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Theodorou ve ark. (1993), anaerobik gut funguslarının izolasyonu için daha önceki çalışmalarda kullanılan metotlarda değişiklikler yaparak izolasyonu gerçekleştirmiştir. Buna göre seyreltme yöntemini kullanmış ve 10 g dışkı örneğini 100 ml bazal besi yerinde CO_2 altında homojen hale getirmiş ve bu karışımdan 10 ml alıp enerji kaynağı olarak saman bulunduran besi yerlerine aktarmıştır. Daha sonra bu işlemleri 10^{-3} e kadar gerçekleştirmiş ve 3-10 gün süre arasında 39 C'de inkübasyonda takip etmiştir. Mikroskop altında canlılık tespit edilen tüplerden daha sonra alt kültür çalışmaları yapılmış ve roll tüp agar yöntemi ile saflaştırılmıştır.

Çömlekçioğlu ve ark. (2008), Türkiyenin çeşitli bölgelerinden toplanan ruminant hayvanlara ait 100 adet dışkı örneğini tarayarak anarobik gut fungusu izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışma ile 25 adet saf anaerobik gut fungusu izole edilerek kültür koleksiyonu oluşturulmuştur. Kültür koleksiyonuna ait bireylerin 16 adetini *Neocallimastix sp*, 3 adetini *Caecomyces sp* ve geriye kalanlarında polisentrik anaerobik gut fungus cinslerine ait olduğunu bildirmişlerdir.

Li ve Heath (1992) ITS 1 bölgesine göre yapılan moleküler tanımlamada *Anaeromyces sp, Neocallimastix sp, Orpinomyces sp* ve *Piromyces sp* izolatlarının *Anaeromyces sp*'den belirgin bir şekilde ayrıldığını ve bu cinslerin birbirinden farklı olduğunu bildirmişlerdir.

Collaghan ve ark. (2015), bufalo ve koyun dışkısından anaerobik gut fungusu izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Saflaştırma işleminden sonra izolatların moleküler tanımlaması LSU ve ITS bölgelerine göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre elde ettikleri izolatın uzak olarak *Anaeromyces* cinsine akrabalık gösterdiği belirlenmiştir.

Atanasova-Pancevska ve Kungolovski (2017) , ruminantlardan elde edilen anaerobik fungusların biyolojik çeşitliliği üzerine çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada Makedonya da bulunan yerel sığır, geyik, koyun ve keçi gibi ruminant hayvanların yanı sıra yabani mandalardan rumen içeriği ve dışkıları toplanmış ve anaerobik gut funguslarının biyoçeşitiliği araştırılmış ve hem Monosentrik hem polisentrik morfolojik özelliklere sahip fungusların varlığını gözlemlemişlerdir

Wang ve ark. (2017), ITS ve ITS1 bölgelerinin anaerobik gut fungusları için moleküler tanımlamada iyi bir markır olmadığını anaerobik gut funguslarınındaki farklılıkların tam olarak belirlenemediğini rapor etmiş ve yeni nesil tanımlama ve DNA dizileme metotları ile tanımlamaların yapılabileceğini bildirmişlerdir.

Joblin ve ark. (1981), anaerobik gut funguslarının uzun süreli muhafazası için yaptkları çalışmalarda enerji kaynağı olarak glikoz kullanılan sıvı besi yeri ve agarlı katı besi yeri kullanmış ve roll tüp agarlı besi yerinde alt kültüre almak gerekmeksizin 7 aya kadar canlılık elde edilebileceğini bildirmiştir. Ancak yine bu sonucun kullanılan izolattan izolata fark oluşturabileceğinide belirtmiştir. Bir başka yol olarak enerji kaynağının glikoz olarak kullanıldığı sıvı besi yerlerinde 2-3 günde bir alt kültür alınarak izolatların muhafaza edilebiliniceğini bildirmiştir.

Yarlett ve ark. (1986), anaerobik gut funguslarının muhafazasında kullanılan kriyoprotektanlardan dimetilsülfoksit (DMSO) kullanarak -80 C de 1 yıllık periyot için %40 canlılık elde edildiğini rapor etmiştir.

Sakura ve ark. (1995), AGF'lerin muhafazasında kullanılan diğer bir kriyoprotektan olan etilen glikolü DMSO yerine kullanmış ve aynı koşullarda DMSO kullanımına göre %80 daha iyi canlılık elde edilebildiğini göstermiştir.

Nagpal ve ark. (2012), mikrobiyal muhafaza için gerçekleştirdikleri çalışmada anaerobik gut funguslarında kriyoprotektan olarak hem DMSO hem de etilen glikol kullanarak 90 gün boyunca muhafaza edilen örneklerin %100 canlılık oranlarının olduğunu bildirmiştir.

Bauman ve arkadaşları (2001) delta 9 desaturaz enziminin cis- 9 trns-11 KLA üretimindeki etkinliği üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmaya göre endojen olarak sentezlenen KLA'nın sebzelerden elde edilen yağlar ilave edildiğinde delta 9 desaturaz varlığının azalmasına ve böylece KLA miktarının da azalmasına sebebiyet verdiğini göstermişlerdir.

Du ve arkadaşları (2002) broiler civciv yemlerine belirli miktarlarda KLA ilavesi ederek civcivlerin toplam vücut yağ oranını incelemişlerdir. Çalışmanın sonunda KLA nın civcivlerde toplm vücut yağını önemli derecede azalttığı sonucunu elde etmişlerdir.

Owaga ve arkadaşları (2005) laktik asit bakterilerinin konjuge yağ asiti üretimleri üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmada birçok laktik asit bakterisinin serbet linoleik asitten konjuge linoleik asit üretimini gerçekleştirdiğini göstermişlerdir. Sonuç olarak üretilen KLA, bir cis-9, trans-11-oktadecadienoik asit (18: 2) ve trans-9, trans-11-18: 2 karışımını içerir. katalizör olarak kullanılan *Lactobacillus plantarum* AKU 1009 a, linoleik asitten KLA üretiminin optimize edilmiş koşullar altında 40 mg / ml'ye ulaşan miktarlarda olduğu gözlemlenmiştir.

Maia M. R.ve ark. (2007)'da yaptıkları bu çalışmada çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA)' nın metabolizmasını ve PUFA'nın rumen ekosisteminde bulunan mikroorganizmaları üzerindeki etkileri araştırmışlardır. Çalışma da farklı rumen bakterileri

ve anaerobik fungus cinsi olan *Neocallimastix* üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Çalışmaya göre 26 adet ruminal bakteri türünün 11'i Linoleik asidi (LA; cis-9,cis-12–18:2) büyük ölçüde metabolize ettiği görülmüştür. En yaygın olarak üretilen vaksenik asit (trans-11–18:1) *Butyrivibrio fibrisolvens* tarafından üretildiğini gözlemlemişlerdir. Selülotik bakteriler 50 µg/ml PUFA varlığında gelişim göstermedikleri gözlenmiştir. *Neocallimastix frontalis*'in LA'dan KLA oluşturmadaki etkinliğinin *Butyrivibrio fibrisolvens* ile kıyasladığında çok daha düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca PUFA, *Neocallimastix frontalis'*in LA'dan az miktarda KLA üreten selülolitik ruminal fungusın büyümesini inhibe ettiği sonucuna varılmıştır

Hah ve arkadaşları (2006) KLA nın kanser oluşumunu nasıl etkilediği konusunda kesin bir mekanizma yokken bazı teoriler ortaya koymuşlardır. Hah ve arkadaşlarının bu teorilerine göre antioksidanların nitrozlu bileşiklere benzer şekilde bazı kanserojen yapıların oluşumunu önlediği bir etkiye sahip olduklarını ve KLA nın da antioksidan özelliği sebebi ile böyle bir etkiye sahip olduklarını göstermişlerdir.

Nam (2007), anaerobik gut fungusu *Orpinomyce*s sp'nin linoleik ve linolenik asit biyohidrojenasyon döngüsünü incelemişlerdir. Bu çalışmaya göre, *Orpinomyces* sp tarafından linoleik asit ve linolenik asitin steraik asit ve oleik asite çevirildiği belirlenmiştir. Aynı zamanda linoleik asitin biyohidrojenasyonu ile oluşan konjuge linoleik asittin de yine biyohidrojenasyon sırasında vaksenik asite kadar dönüştürüldüğünü ancak sterqaik asit ve vaksenik sitin dönüştürülemediğini göstermişlerdir.

Nam ve arkadaşları (2007a) rumen bakterileri ile rumen funguslarının biyohidrojenasyon ile linoleik asit üretimlerini karşılaştırmışlardır. Bu amaçla yaptıkları çalışmada rumen bakteri ve funguslarını in vitro şartlarda karıştırmışlardır. 100 dakika inkübasyon sonucunda son ürünün stearik asit olduğunu göstermişlerdir. Fungusların 24 saatlik inkübasyonu sonucunda biyohidrojenasyon ürünleri konusunda oldukça yavaş oldukları gözlemlenmiştir. Konjuge linoleik asit ve vaksenik asit miktarları orta derecede bulunuştur. DNA sekans dizileme de izole edilen funguslar arasında en hızlı oranlara sahip olan fungusun Orpinomyces cinsine ait olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak rumen funguslarının biyohidrojenasyonla konjugelinoleik asit üretebildikleri ancak rumen bakterilerine göre bu sistemin daha yavaş olduğunu göstermişlerdir.

Nam ve Garnsworthy (2007) 'ın yaptıkları bu çalışmada çözünür karbonhidratların (Glikoz, Sellobiyoz) pH'nın (6.0-6.5-7.0) ve rumen mikrobiyal büyüme faktörlerinin (VFA, vitaminler) linoleik asitin karışık rumen fungusu ile biyolojik olarak hidrojenlenmesi üzerindeki etkisini değerlendirmektedir. Çalışmalar sonucunda kültür

ortamına glikoz veya sellobiyoz eklenmesi biyohidrojenasyon düzeyini yavaşlatırken; VFA veya vitaminlerin eklenmesi KLA üretimini yada biyohidrojenasyon aktivitesini değiştirmemiştir.

Çömlekçioğlu ve arkadaşları (2011) anaerobik rumen fungusu *Caecomyces sp.* GMLF12'de linoleat izomeraz enziminin varlığı üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmaya göre Linoleat izomeraz enzimi linoleik asitin konjuge linoleik asite izomerizasyonunu sağlamaktadır. Farklı konsantrasyonlarda linoleik asit içeren besi ortamına inokule edilen *Caecomyces sp.* GMLF12 izolatının gelişmediği görülmüştür. Hücreler, linoleik asit ile muamele edilmiş ve belirli zaman aralıklarında enzimatik reaksiyon durdurularak konjuge linoleik asit düzeyleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. En yüksek konjuge linoleik asit düzeyi 45. dakika sonunda 8.22 μg/ml olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar *Caecomyces sp.* GMLF12'nin linoleat izomeraz enzimine sahip olduğu ve bu enzimin hücre yüzeyinde bulunduğunu göstermişlerdir

Lee ve arkadaşları (2013) pH faktörünün ruminal mikroorganizmaların linoleik asitten biyohidrojenasyonla konjuge linoleik asit üretimine olan etkisi üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmaya göre pH 5.5-6 değerleri arasında belirleyici izotoplar kullanılarak biyohidrojenasyondaki LNA belirlenmeye çalışılmıştır. Düşük pH değerlerinde cis-cis KLA üretiminin daha güçlü olduğu gözlemlenmiştir. 24 saatlik inkübasyon sırasında birkaç mono-, di- ve tri-enoik yağ asidi izomeri ile zenginleştirilen ortamlarda düşük pH larda KLA üretiminin azaldığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, düşük pH koşullarının biyohidrojenasyondaki izomerizasyon ve indirgeme adımlarını etkilediği veya kapasitesinde sınırlamaya neden olabileceği önerilmektedir.

Hristov ve arkadaşları (2015) süt sığırlarındaki rumen bakteri, arkea ve fungal çeşitliliğin laurik asit ve mistrik asit ile beslediklerindeki mikrobiyal ekosistemin nasıl değiştiği üzerine çalışmalar yapmışlardır. içerisinde mistrik asit laurik asit ve steraik asit bulunan besin maddeleri ile beslenen hayvanlardan belirli aralıklarda alınan rumen sıvıları üzerinden total DNA çalışmaları şeklinde yürütülmüştür.

Renes ve arkadaşları (2017), peynirden izole ettikleri 85 adet laktik asit bakterisinin KLA üretimleri üzerine çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmaya göre dört adet *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus casei* suşlarının KLA üretiminde oldukça etkili olduğunu bildirerek bu suşların KLA üretimlerini ve üretim miktarlarının belirlenmesi üzerine çalışmışlardır. Bu sonuçlara göre en yüksek KLA üretim miktarının MRS besi yerinde geliştirilen ve 48 saat inkübasyonda bırakılan suşlarda 19.26 mg/mL olarak belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve besi yerleri aksi belirtilmediği sürece Sigma (Almanya) ve Merck (Almanya)'den mevcutta üretilmiş olan ve en yüksek saflıkta olacak şekilde hazırlanmış kimyasallar temin edilmiştir. Moleküler çalışmalarda Taq DNA polimeraz (Thermo Fisher), Taq DNA tampon çözeltisi (Thermo Fisher), $MgCl_2$ (Thermo Fisher), dNTP karışımı (Thermo Fisher), ileri ve geri primerler (Molgentek), proteinaz K (Sigma) kullanılmıştır.

3.1.2. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar, santrifüj (JP Selecta), steril kabin (Nüve), otoklav (Nüve), su banyosu (JP Selecta), inkübatör (Nüve), hassas terazi (Vibra), ısıtmalı manyetik karıştırıcı (Velp), otomatik dispenser (Ismatec; MCP), vortex (Velp), mikroplaka okuyucu (Spectromax), hücre duvarı kırıcı (Dis-membranator) (RETSCH), pH metre (JP Selecta), inverted mikroskobu (Olympus), dijital fotoğraf makinesi (Canon), elektroforez tankı (ATTO Corporation), Transilliminatör (UVP), Mikro pipet seti (Eppendorf), Elektronik pipet (Isolab), Gaz kromatografi cihazı (Shimadzu 2025), termal cycler (Favorgen), ışık mikroskobu (Olympus), -80^0C (New Brunswick, U570), saf su cihazı (Millipore, Rio), soğutmalı santrifüj (J.P. Selecta), steril kabin (Nüve LN 120), kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Mikroorganizmalar

3.1.3.1. Anaerobik Gut Fungusları

Bu tez çalışmasında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümüne ait Biyoteknoloji ve Gen mühendisliği (BİGEM) laboratuvarı anaerobik kültür koleksiyonundan cins düzeyinde tanımlanan *Neocallimastix sp* GMLF 7, *Orpinomyces sp* GMLF 16, GMLF 18 ve GMLF 19, *Anaeromyces sp* GMLF 39 ve GMLF 40 referans mikroorganizma olarak kullanılmıştır. Aynı zamanda bu tez çalışması ile anaerobik kültür stoğuna kazandırılan ve bu çalışma kapsamında isimlendirilen morfolojik verilere göre *Feramyces sp* GMLF 30, *Piromyces sp.* GMLF 66, *Caecomyces sp* GMLF 77, *Feramyces sp*. GMLF 90, *Neocallimastix sp*. GMLF 92*, Feramyces sp*. GMLF 113 ve GMLF 202 numaralı fungus örnekleri incelenmiştir. Bütün analizlerde *Neocallimastix spp.,*

Piromyces spp., Anaeromyces spp., Orpinomyces spp., Caecomyces spp. cinslerine ait bireyler kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Kullanılan funguslara ait stok kodları, hangi cinse ait oldukları ve izole edildikleri dışkıların ait olduğu hayvanlar

İzolat Adları	Cins	Hayvan	Bölge/Kaynak
GMLF 7	Neocallimastix sp.	Sığır	BiGEM Kültür Koleksiyonu
GMLF 16	Orpinomyces sp.	Koyun	BİGEM Kültür Koleksiyonu
GMLF 18	Orpinomyces sp.	Sığır	BİGEM Kültür Koleksiyonu
GMLF19	Orpinomyces sp.	Sığır	BİGEM Kültür Koleksiyonu
GMLF 30	Feramyces spp. (Bu çalışmada)	Keçi	Gavur Gölü, Türkoğlu
GMLF 39	Anaeromyces sp.	Sığır	BİGEM Kültür Koleksiyonu
GMLF 66	Feramyces spp. (Bu çalışmada)	Keçi	Başkonuş yaylası
GMLF 77	Caecomyces sp.	Dağ keçisi	Gavur Gölü, Türkoğlu
GMLF 90	Feramyces spp. (Bu çalışmada)	Keçi	Gavur Gölü, Türkoğlu
GMLF 92	Neocallimastix sp.	Dağ keçisi	Göksun
GMLF 113	Feramyces spp. (Bu çalışmada)	Keçi	Göksun
GMLF202	Piromyces sp. (Bu çalışmada)	Keçi	Göllü Köyü, Dulkadiroğlu

3.1.4. Anaerobik Gut Bakterileri ve Laktik Asit Bakterileri

Anerobik gut fungusları ile anaerobik gut bakterileri arasındaki KLA üretim mekanizmalarının karşılaştırılması amacıyla yine BİGEM laboratuvarı kültür koleksiyonuna ait *Butyrivibrio fibrisolvens* JW11 ve *Ruminococcus albus* SY3 suşları kullanılmıştır (Çizelge 3.2). KLA gen bölgesinin primerlerinin tasarlamasında, linoleate izomeraz gen bölgesini taşıyan bakterilerin DNA dizilerinden faydalanılmıştır. Bu bakteriler ve referans numaraları *Lacticaseibacillus paracasi* AKU58526.1, *Streptococcus salivarius* CCB94037.1, *Lactococcus lactis* SPS11627.1 olan suşlar kullanılmıştır. Ayrıca antimikrobiyal etkilerin araştırılması amacı *Staphylococcus aureus ATCC29213, Listeria*

monocytogenes DSM215675, Escherichia coli ATCC25922, Bacillus cereus ATCC11778 ve *Listeria monocytogenes DSM219094* suşları kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan bakterileri listesi

Rumen Bakterileri
Butrivibrio fibrisolvens JW11
Ruminococcus albus SY3
KLA Gen Bölgesi Kullanılan Bakteriler
Lacticaseibacillus paracasei AKU58526.1
Streptococus slivarius CB94037.1
Lactococcus lactis SPS11627.1
Patojen Bakteriler
Staphylooccus aureus ATCC29213
Listeria monocytogenes DSM215675
Eschericia coli ATCC25922
Bacillus cereus ATCC11778
Listeria monocytogenes DMS 219094

3.2. Metot

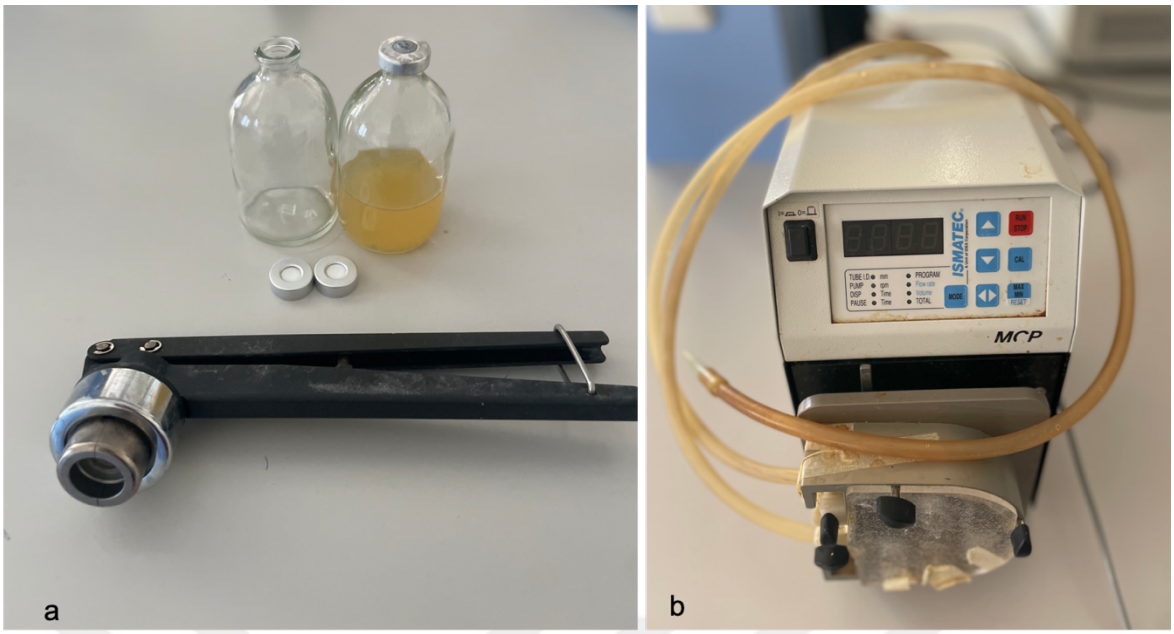
3.2.1. Anaerobik Bazal Mediumun Hazırlanması

Besi yeri için Orpin'in (1976) rumen mikroflorasını incelemek üzere hazırladığı anaerobik bakterilerin kültüre alma çalışmalarında sıklıkla kullanılan besi yerinin enerji kaynakları bakımından modifiye edilmiş şekilleri kullanılmıştır (Orpin 1976). Besi yerinde kullanılan tüm kimyasallar Çizelge 3.2'de gösterildiği gibi sırasıyla (Sistein-HCl hariç) genel çözücü olarark saf su, farklı minerallerin bulunduğu Mineral Solüsyon-1 (K_2HPO_4) ve Mineral Solüsyon-2 ($(NH_4)_2SO_4$, NaCl, $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2$, KH_2PO_4) besiyerinde kültüvasyon esnasında mikrobiyal biyokütlenin protein ihtiyacının tamamı maya özütünden karşılanamayacağı düşünülerek bu ihtiyacın karşılanması amacı ile pepton veya kasein, rumen ortamının sentetik olarak hazırlanması sebebiyle eksik olabilecek materyallerin karşılanması amacı ile rumen sıvısı erlen mayer içerisinde çözdürülmüştür. Bazal besi yeri ortamının asit düzenleyicisi olarak ortama $NaCO_3$ eklenmiştir. Moleküler O_2'nin giderilmesi ve oksijenin indirgenebilmesi amacı ile kullanılan L-Sistein-HCl kimyasal yapısı nedeni ile kaynama sıcaklığından önce eklendiğinde besiyeri içerisinde tepkimeye girerek köpürme ve taşmalara neden olması sebebi ile kaynama noktasına

ulaştıktan sonra yavaşça ilave edilmiştir. Karışma tamamlandıktan sonra karışım içerisine karbondioksit verilerek, karbondioksite doyurulmuş anaerobik ortam oluşturulmuştur. Çözeltinin içerisinde bulunan O_2'yi belirlemek amacı ile indikatör olarak resazurin eklenmiş, besi yerinin rengi oksijen varlığından dolayı kırmızıya dönmüştür. Resazurin besi yeri içerisinden oksijeni bağlamaya başladıktan ve karışımın rengi solgun sarı oluncaya kadar ısıtıcı üzerinde bekletildikten sonra Hungate tüplerine (16x125 mm) 8 ml ve serum şişelerine 45 ml (52x95 mm) sıvı olacak şekilde dağıtılmıştır. Hungate tüplerine besi yerleri konulurken tüpler içerisine de CO_2 verilerek oksijenden ari bir ortam sağlanıp hızlıca kapakları takılmıştır. Enerji kaynağı olarak % 0.5 (v/w) glikoz kullanılan besi yerleri glikozun karamelize olmasının engellenmesi amacı ile 110 °C'de 10 dakika 15 psi basınç altında ve enerji kaynağı olarak buğday samanı kullanılan sıvı besi yeri ise 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Çizelge 3.3 Anaerobik besi yeri içerisinde yer alan kimyasallar ve miktarları

Kullanılan Kimyasallar ve Formülleri		Sıvı Besi Ortamı (100 ml)	
Mineral Solusyon 1 [*]		15.0	ml
Mineral Solusyon 2 [**]		15.0	ml
Rumen Sıvısı		15.0	ml
$NaHCO_3$		0.60	gr
Maya Özütü		0.25	gr
Pepton/Kazein		1.00	gr
Resazurin (% 0.1)		1.00	ml
Sistein HCl		0.10	gr
Enerji Kaynağı		0.5	gr
Saf su		55.0	ml
[*] Mineral Solusyon 1:	K_2HPO_4	3.0	gr
	Saf su	1000	ml
[**]Mineral Solusyon 2:	KH_2PO_4	3.0	gr
	$(NH4)_2SO_4$	6.0	gr
	NaCl	6.0	gr
	$MgSO_4.7H_2O$	0.6	gr
	$CaCl_2$	0.6	gr
	Saf su	1000	ml



Şekil 3.1 Besi yeri yapımında kullanılan ekipmanlar (a: serum şişeleri, metal kapak ve klimper; b: besi yerinin eşit olarak dağıtılmasında kullanılan dağıtıcı (dispenser)).

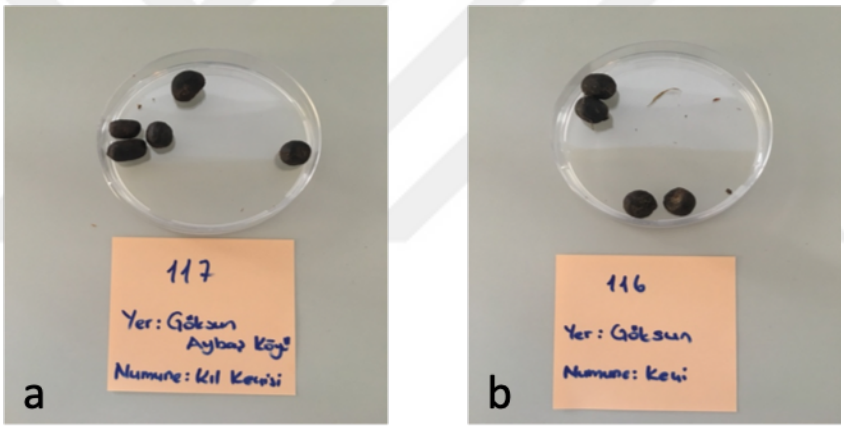
3.2.2. Rumen Sıvısının Elde Edilmesi

Kahramanmaraş ili kesimhanesinden hayvan kesimleri sırasında büyük baş hayvanlara ait rumenlerden, yem bulamacı ile karışmış olan rumen sıvısı tülbent yardımı ile sıkılıp süzülerek 10 L hacmindeki termoslara doldurulmuş, uygun koşullarda ve mümkün olan en kısa sürede (30-45 dakika) laboratuvar ortamına getirilmiştir. Kabaca süzülerek yem materyalinden ayrılan rumen sıvısı diğer partikül ve rumende bulunan mikroorganizmalardan ayrılması amacı ile 50 ml hacmindeki kapaklı falkon tüpleri içerisinde dağıtılarak 3500 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası katı partüküllerden ayrılan rumen sıvısı 2 kez daha aynı işlemle santrifüj edilmiş ve rumen sıvısı içerisinde hücrelere ve yem materyallerine ait partiküllerden ari berrak hale getirilmiştir. Santrifüj sonrası rumen sıvıları ya taze olarak kullanılmış ya da kapaklı temiz falkon tüplerine 50 ml konularak -20 °C de bir sonraki besi yeri çalışmaları için muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Dışkıdan Fungus İzolasyonu Saflaştırma ve Aktifleştirilmesi

Anaerobik gut fungus izolasyonu Theodorou ve ark. (1994)'nın seyreltme yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre kuru ağırlığı 5 g olan KSÜ Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümüne ait BİGEM koleksiyonunda bulunan Kahramanmaraş'ın Andırın ilçesi kırsalından toplanmış dağ keçisi dışkı örneği (Şekil 3.2) 45 ml bazal besiyeri içerisinde,

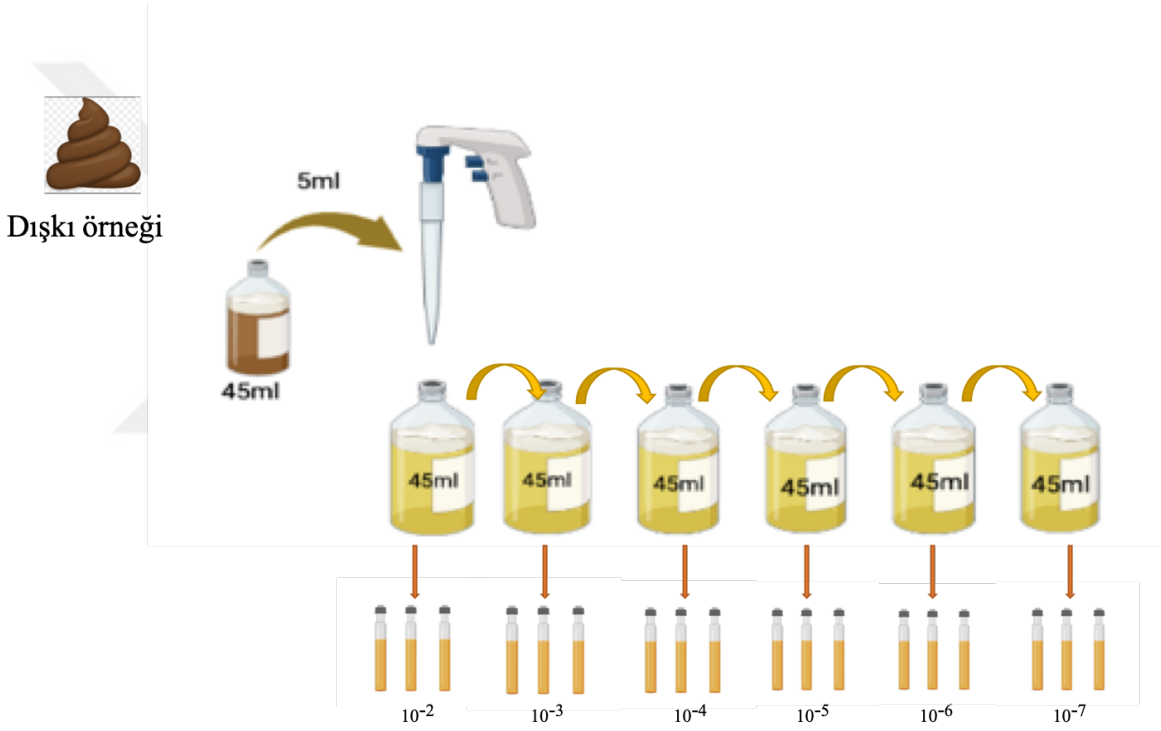
izolasyon aşamasında Orpin'nin (1976) anaerobik besi yerlerinde buğday samanı, glikoz, sükroz, ksiloz, dekstroz (5g/lt) ayrı ayrı enerji kaynağı olarak kullanılmış ve CO_2 akımı altında Hungate kültür tüplerine aktarılmış (Theodorou ve ark., 1994). Sonra ki aşamada 5 ml alınarak içinde Hungate tüplerine konmuştur. İlk seyreltilen örnekten 5 ml alınarak yeni 45 ml besi yeri içerisinde seyreltilmiş ve buğday samanı içeren Hungate tüplerine aktarılmıştır. Bu şekilde 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} 10^{-6} ve 10^{-7}ye kadar seyreltilerek (Şekil 3.3) enerji kaynağı olarak saman içeren Hungate tüplerine aktarılan dışkı örneği 3-10 gün süre ile 39 ^{o}C'de salınımsız inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Seyreltme işlemi sırasında 10^{-1} seyreltmesi çok yoğun ve besi yerinde canlılık tespitinin mikroskop altında görüntülenmesinde zorluk çekilmesi nedeni ile bir sonraki seyreltme değerinden başlanmıştır. Aynı zamanda her bir seyreltmeninde üçlü tekerrürü mevcut olacak şekilde Hungate tüplerine alınmıştır.



Şekil 3.2. Anaerobik gut fungusu izole edilmesi için kullanılan ruminant hayvanlara ait dışkı örnekleri.

Mikroskop altında yapılan incelemede fungal yaşam belirlenmiş olan tüpler tespit edilmiştir. Daha sonra Hungate (1976) tekniğine göre hazırlanmış agarlı anaerobik besi yeri sıcak su banyosunda eritilerek (85^{0}C) sıvı forma dönüştürülmüştür. Agar 45-50^{0}C 'ye kadar bekletilmiş ve enjektör yardımı ile mikroskop altında gelişme gözlemlenen tüplerden 0.5 ml'lik kültürler alınarak Hungate tüplerine ekilmiştir. Agar 40 ^{0}C'nin altında katılaşmaya başlamaktadır. Bu nedenle buz içerisinde hızlı bir şekilde tekrar katı formuna döndürülmek üzere Hungate tüpleri kulanılarak rolling yapılmıştır. Daha sonra tüpler 39 ^{0}C inkübatörde 24 saat kültüre alınmıştır. Koloni gözlenen tüpler anaerobik şartlar altında, tek koloni olacak şekilde öze yardımı ile alınarak 8 ml'lik karbon kaynağı glikoz içeren besi yerine ekilmiştir. Bu şekilde saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

İzolatların dondurulma ve tavlama işlemleri Çömlekçioğlu ve ark., (2008) tarafından rapor edilmiş olan metodoloji kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada örnekler sıvı azottan çıkartıldıktan sonra yavaş tavlama (buz içerisinde bekletilerek) şeklinde çözündürülmüştür. Daha sonra CO_2 akımı altında kriyoprotektan olarak kullanılan gliserol/DMSO enjektör yardımı ile alınmış ve fungal hücreler enerji kaynağı olarak buğday samanı, glikoz, sükroz, ksiloz, dekstroz bulunan anaerobik sıvı besi yerlerine aktarılmıştır. Olası mikrobiyal kontaminasyonu engellemek amacıyla kültür şartları ve inokülasyon prosedürlerinde antibiyotik kullanılarak gerekli önlemler alınmıştır (Brookman ve ark., 2000).

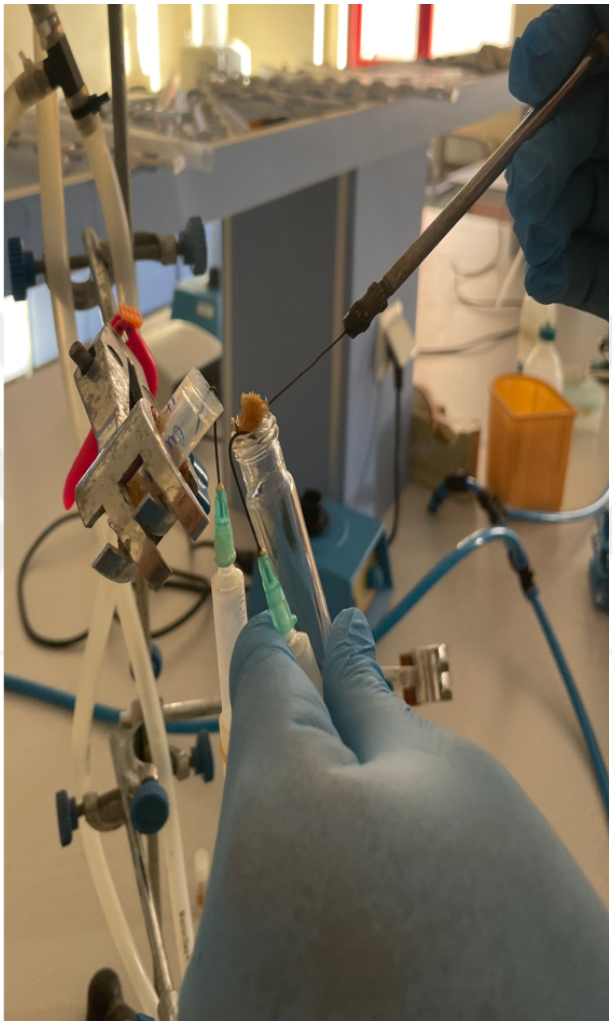


Şekil 3.3 Dışkı örneklerinin besiyerlerinde seyreltilmesi

Anaerobik fungus izolasyonunda kullanılan dışkılar 14 yılı aşkın süredir BİGEM laboratuvarında -20 ^{0}C'de beketilen örneklerdir. Her bir dışkı ya ait dışkı koleksiyon numaraları mevcuttur. Bu çalışmada 112, 114, 117, 116, 113, N11, N9 numaralı dışkı örnekleri kullanılmıştır. Dışkı koleksiyon numarası 112 dışkı örneği bölge Kahramanmaraş Gavur gölü mevkinde bulunan koyunlardan temin edilmiştir. Dışkı numaralarından 117 bölge olarak Kahramanmaraş Göksun ilçesi Aybaş köyünde bulunan kıl keçisinden temin edilmiştir. Yine dışkı koleksiyonlarından 114 ve 116 numara Kahramanmaaş Göksun ilçesinden yerli koyun ırklarından toplanmıştır. Son olarak N11 ve N9 numaralı dışkı

örnekleri Kahramanmaraş Dulkadiroğlu ilçesi Göllü köyü mevkinde bulunan yaylaya çıkarılmış hayvanların (keçi- koyun) dışkılarından temin edilmiştir.

Stok kültürden fungusların aktifleştirilmesi için kriyoviyal tüplerin içerisindeki gliserol karbondioksit altında enjektör yardımı ile alınmıştır. Daha sonra öze ile buğday samanı ile birlikte stok kültürle konulan mikrobiyal kütle alınarak enerji kaynağı olarak glikoz ve buğday samanı olan sıvı besi yerlerine aktarılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Stok kültürden alınan suşların aktifleştirilmesi

3.2.4. Kültür Koleksiyonundan Anaerobik Rumen Bakterilerinin Geliştirilmesi

BİGEM laboratuvarı ait kültür koleksiyonunda (-196^{o}C) bulunan *Butrivibrio fibrisolvens* JW11 ve *Ruminococcus albus* SY3 çıkartılmış ve buz içerisinde çözdürüldükten (yavaş çözdürme) sonra Orpin (1976) anaerobik besiyerlerinde karbon kaynağı olarak glikoz kullanılan sıvı besi yerlerine ekim yapılmıştır. Daha sonra tüpler 39^{o}C ‘de salınımsız inkübatöre yerleştirilmiş ve bakteriyel gelişmlerinin olup olmadığı mikroskobik yöntemlerle düzenli olarak kontrol edilmiştir.



Şekil 3.5 BİGEM sıvı azot (-196 ^{0}C) stok kültür tankı

3.2.5. Patojen Bakterilerin Geliştirilmesi

Ticari olarak temin edilen 6 patojen bakteri karbonhidrat ihtiyaçları doğrultusunda 5 ml sıvı Nutrient Broth (Merck) besi yerlerinde 35-36 ^{o}C' de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi 18-24 saat olarak belirlenmiştir.

3.2.6. Alt Kültür Çalışmaları

Popülasyon yoğunluğu arttıkça besi yerindeki pH ve gaz konsantrasyonları değiştiğinden ve bu durumun AGF'nin durağan kültürlerde yaşama hızını negatif etkilediğinden alt kültür çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Saflaştırılan kültürlerin gelişimleri gün aşırı mikroskop altında takip edilmiş ve gelişimlerine göre alt kültür çalışmaları yapılmıştır. Buna göre her örnek için farklı zamanlarda alt kültüre alma işlemi gerçekleştirilmiş olup en uzun süreli alt kültür çalışmaları 72 saati bulmuştur. Tüplerdeki popülasyon yoğunluğuna göre 24 saatte bir, 48 saatte bir ya da maksimum 72 saate bir kültürler üzerinde alt kültür çalışması yapılmıştır. İnkübasyon süresi 72 saatten sonra ki zaman dilimlerinde popülasyon yoğunluğunda azalma (ölüm) gerçekleştiğinden alt kültür çalışmalarının bu zaman dilimi içerisinde yapılmasına dikkat edilmiştir.

3.2.7. Anaerobik Besi Yerindeki Mikrobiyal Kontaminasyonunun Engellenmesi

Anaerobik besi yerine ekim yapılırken oluşabilecek kontaminasyon riskini minimuma indirgemek amacı ile laboratuvarda aseptik koşullarda çalışılmıştır. Fakat olası kontaminasyon ve özellikle ilk izolasyon aşamasında dışkı örneklerinden kaynaklanabilecek bir mikrobiyal kontaminasyonu engellemek için besi yerlerine ekim yapıldıktan sonra toplam hacim 8 ml olan besi yerlerine 0.5 µl antibiyotik karışımından eklenmiştir. Antibiyotik karışımı etil alkolde ve suda çözünen antibiyotikler için önce etil alkolde daha sonra etil alkol içerisine %25 alkol olacak şekilde steril saf su konularak çözdürülmüş ve herhangi bir kontaminasyon veya partikül kalmaması için 0.22 µm çaplı filtrelerden geçirilerek hazırlanmıştır (Çizelge 3.3)

Çizelge 3.4 Antibiyotik karışımını oluşturan antibiyotikler ile konsantrasyonları

Antibiyotik	Stok (mg/mL)	Son konsantrasyon (µl/mL)
Kloromfenikol	5 mg	100 µg/ml
Ampisilin	5 mg	100 µg/ml
Streptomisin	7 mg	140 µg/ml
Eritromisin	10 mgl	200 µg/ml

3.2.8. Anaerobik Gut Funguslarında (AGF) DNA izolasyonu

Funguslarda DNA izolasyonu CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) Dolye ve Dolye (1987)'ye ait yöntemin aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Enerji kaynağı olarak glikoz kullanılan sıvı besi yerlerinde geliştirilen funguslar 1380 *g* 10 dk santrifüj (Hettich, micro 200) edildikten sonra steril saf su ile yıkanmış ve hücreler toplanmıştır. Hücrelerin içinde bulunduğu ependorf tüplerine hücre duvarının yıkılmasını kolaylaştırması için steril metal bilyeler bırakılmıştır. Tüpler sıvı azot ile dolu strafor kabın içerisine bırakılarak sıvı azot ile muamele edilmiş kırılganlığı arttırıldıktan sonra ve hücre kırıcı (Dis- membranator) ile hücre duvarı parçalanması sağlanmıştır. Daha sonra 700 µl CTAB tamponu (0,1 M tris HCL (pH:8.0) 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA ; %2 CTAB, %0,2 2- merkaptoetanol) eklenmiştir. Örnekler 70 °C de 60 dk inkübe edilmiş ve her 15 dk'lık aralıklarla vorteks yardımı ile karıştırılmıştır. İnkübasyon sonrası tüpler içerisine 500 µl kloroform eklenip vortekslenmiş ve 70 °C 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tüpler santrifüjde maksimum güçte (21000 *g*) 10 dk santrifüj (Hettich, micro 200) edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan ikili fazın üst kısmından 400µl alınarak yeni ependorf

tüpüne aktarılmıştır. Alınan üst faza 230 µl isoproponal ilave edilerek vorteks yardımı ile karıştırılmıştır. Oluşan karışım maksimum güçte 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülerek tüpler içerisine 1ml %70'lik etil alkol eklenmiş ve karıştırılmıştır. Tüpler 30 dk boyunca 70°C sıcak su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince aralıklarla tüpler vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra maksimum santrifüj gücünde (21000g) 20 dk santrifüj edilmiştir. İşlem sonunda süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Ependorf tüpleri içerisinde bulunan etil alkolün tamamen uzaklaşması amacıyla tüpler 70°C'de 10 dakika süre ile bekletilmiş ve elde edilen DNA'ların üzerine 50 µl TE tampon çözelti (1mM Tris, 0,1mM EDTA pH:8.0) konularak PZR çalışmaları ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C muhafaza edilmiştir. Kullanılacak olan DNA örnekleri 50 µl dH_2O içerisinde dondurulmadan nano drop ile 340 nm 'de ölçüldüğünde ve DNA konsantrasyonunun 5-8 ng/µl arasında olduğu belirlenmiştir. Daha sonra DNA örnekleri analizlerde kullanılmak üzere +4 °C veya uzun süreli muhafaza için -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.9. Anaerobik Gut Funguslarının Morfolojik Tanımlamaları

Roll tüp agar yöntemi ile (Hungate 1986) anaerobik gut funguslarının agarda tek koloni olarak elde eldilmesi sağlanmıştır. Tek koloni olarak elde edilen kültürler sıvı besi yerinde geliştirilerek zoosporları toplanmış ve lam üzerinde Olympus BX51 ışık mikroskobu altında morfolojik tanımlamaları için zoospor kamçıları sayılmıştır.

3.2.10. ITS (International Transcript Space) Bölgesi Primer Tasarlanması

ITS bölgesi için primer tasarlanması daha önceki çalışmalarda kullanılmış ve başarılı sonuç elde edilmiş olan diziler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Kar, 2013). İleri primer 22 baz çiftten, geri prime 23 baz çiftinden oluşan bir diziye sahiptir ve bağlanma sıcaklığı 58 ^{0}C olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.5 ITS bölgesi primerleri PZR çalışmalarda kullanılan primerler

Bölge	Primer adı	Oligonükleotid dizi (5'-3')	Tm (^{o}C)
ITS	ITSF	5CTA CCG ATT GAA TGG CTT AGT G	58
	ITSR	5AGT TCA GCG GGT ACT CTT ATC TG	58

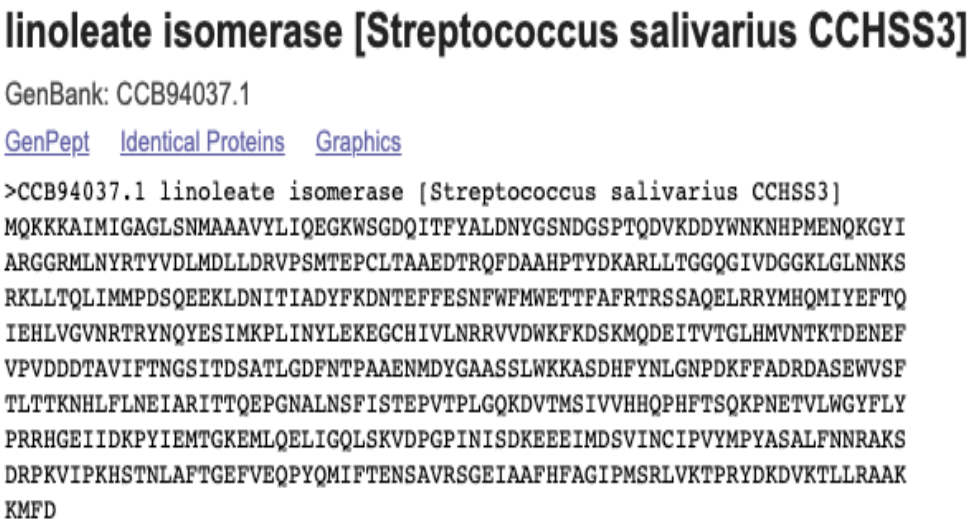
3.2.11. Linoleat İzomeraz Gen Bölgesinin Belirlenmesi

Linoleat izomeraz gen bölgesinin belirlenmesi amacıyla *Natiaonal Center for Biotechnology Information* (NCBI) veri tabanında linoleat izomeraz gen bölgelerine ait bölgeler taranmış ve maksimum benzerlik gösteren 3 bakteri referans linoleat izomeraz gen bölgesi kullanılmak üzere aminoasit dizilimi çıkarılmıştır. *Streptococcus salivarius* CCHSS3, *Lactobacillus paracasei* ve *Lactococcus lactis* referans aminoasit dizilimleri Şekil 3.6' da gösterilmiştir. Aminoasit dizilimleri bilinen gen bölgesi olası nükleotid dizilimlerine dönüştürülmüştür. Referans gen dizisi belirlendikten sonra anaerobik gut fungus cinslerinden *Neocallimastix sp* ye ait en uzun toplam DNA dizisi ile elde edilen düzenlenmiş gen nükleotid dizilimi Clone manager X kullanılarak karşılaştırılmış ve bu bölgeye göre anaerobik gut funguslarınnda olası linoleat izomeraz gen bölgesi PZR çalışmaları yapılmak üzere primerler dizayn edilmiştir (Çizelge3.5). Daha sonraki çalışmalar için aynı primer dizilerine EcoRI Kesme enzimi dizisi eklenerek dizileme tamamlanmıştır.

Çizelge 3.6 Linoleate izomeraz gen bölgesi için tasarlanan ileri ve geri primer nükleotid dizilimleri ve aynı bölgeye ait kesme enzimi eklenmiş ileri ve geri primer nükleotid dizilimi

Primer Adı	Oligonükleotid dizisi (5'-3')
FunCLAF	TAC ATA ATG TCG ATG CCA TTG
FunCLAR	ATG CCA TCG GCA ATG AAT TTC ACC
FunCLAerF	GAA TTC TAC ATA ATG TCG ATG CCA TTG
FunCLAerR	GAA TTC AGT CCA TCG GCA ATG AATT

Linoleat izomeraz gen bölgesinin anaerobik gut fungusları için tanımlanabilmesi amacıyla bu bölgeye ait bakteriyel gen bölgeleri taranmış ve aminoasit dizilimleri elde edilmiştir (Şekil 3.6). Her bir aminoasit diziliminde meydana gelebilecek nokta mutasyonları dikkate alınarak olası tüm nükleotid dizileri çıkartlmış ve maksimum eşleşme gösteren gen bölgesi elde edilmiştir. Buna göre eşleşmesi gerçekleşen ve bu gen bölgesine en yüksek oranda nükleotid eşleşmesi gösteren biri *Streptococcus salivarius* olarak seçilmiştir. Aminoasit dizilimlerinden yararlanılarak, her bir amino asite karşılık gelen nükleotidler gen bölgesini oluşturan nükleotid dizilimine çevirilmiştir.



linoleate isomerase [Streptococcus salivarius CCHSS3]

GenBank: CCB94037.1

GenPept Identical Proteins Graphics

>CCB94037.1 linoleate isomerase [Streptococcus salivarius CCHSS3]
MQKKKAIMIGAGLSNMAAAVYLIQEGKWSGDQITFYALDNYGSNDGSPTQDVKDDYWNKNHPMENQKGYI
ARGGRMLNYRTYVDLMDLLDRVPSMTEPCLTAAEDTRQFDAAHPTYDKARLLTGGQGIVDGGKLGLNNKS
RKLLTQLIMMPDSQEEKLDNITIADYFKDNTEFFESNFWFMWETTFAFRTRSSAQELRRYMHQMIYEFTQ
IEHLVGVNRTRYNQYESIMKPLINYLEKEGCHIVLNRRVVDWKFKDSKMQDEITVTGLHMVNTKTDENEF
VPVDDDTAVIFTNGSITDSATLGDFNTPAAENMDYGAASSLWKKASDHFYNLGNPDKFFADRDASEWVSF
TLTTKNHLFLNEIARITTQEPGNALNSFISTEPVTPLGQKDVTMSIVVHHQPHFTSQKPNETVLWGYFLY
PRRHGEIIDKPYIEMTGKEMLQELIGQLSKVDPGPINISDKEEEIMDSVINCIPVYMPYASALFNNRAKS
DRPKVIPKHSTNLAFTGEFVEQPYQMIFTENSAVRSGEIAAFHFAGIPMSRLVKTPRYDKDVKTLLRAAK
KMFD

Şekil 3.6 NCBI veri tabanından alınan referans *Streptococcus salivarius* CCHSS3 suşuna ait linoleate izomeraz gen bölge erişim numarası

Linoleat izomeraz gen bölgesi için referans olarak kullanılan bir diğer bakteriyel suş iste *Lacticaseibacillus paracasei* olarak belirlenmiştir. Bu mikroorganizmaların seçilmesi gen bölgelerinin birbirlerine en yakın aminoasit dizilimlerini göstermesinden kaynaklanmaktadır. Gen bölgesine ait amino asit dizilimi Şekil 3.7 ‘de gösterilmiştir.



linoleate isomerase [Lacticaseibacillus paracasei]

GenBank: AKU58526.1

GenPept Identical Proteins Graphics

>AKU58526.1 linoleate isomerase [Lacticaseibacillus paracasei]
MIKHKAIMIGAGLANMAAAVYLIQEAHWQGDQITFYSLDDHGSNDGAPTVDTVDEYWNKNHPMENTKGYV
ARGGRMLNYRTYVDLMDLLSRIPSATEPGLTAEEDTRQFDAQHRTFDKARLMEGGIGIIQAGHLGLNNTD
RLLLTKLIMMPDSEEEKLDNVSIADYFKNDPHMFQTNFWYMWETTFAFRTQSSAQELRRYMHMMIYEFTQ
IEHLVGVNRTRYNQFESIMLPLINYLKEQGCKIILNRRVTAFEFKDTAMTDEITVTGLTILNTETDDEEH
VTVDDDTAVFFTNGSITDSATQGDFDHAAVENMDYGAAASLWKQATEHFYNLGNPDKFFADRSASEWVSF
TLTTKDHLLLNEIERITTQVPGNALNSFMSTQPITALGQKDVMMSIVVHHQPHFTTQKPNETVLWGYFLY
PRRYGEFVNKPYIEMTGKEMAFELIGQLAKVDPGPGNIRDHQDEIMASIINNIPVYMPYASALFNNRAKV
DRPDVIPAHSTNLAFTGEFAEQPFQMVFTEQSAVRSGEIAAYHFTGIPMSHLVKTPRYDKDIKTLMRATK
KMFE

Şekil 3.7 NCBI veri tabanında taranmış *Lactobacillus paracasei* suşuna ait referans linoleat izomeraz gen bölgesi aminoasit dizilimi

Bir diğer aminoasit dizilimine sahip bakteri Lactococcus lactis olarak belirlenmiş olup ilgili aminoasit dizilimi Şekil 3.8’ de gösterilmektedir. Bir amino asitin birden fazla kodon tarafından kodlanabildiği bilindiğinden olası tüm gen bölgelerinin nükleotid dizilimleri oluşturulmuş ve buna göre gen bölgesi taraması yapılmıştır.

Linoleate isomerase [Lactococcus lactis]

GenBank: SPS11627.1

GenPept Identical Proteins Graphics

```
>SPS11627.1 Linoleate isomerase [Lactococcus lactis]
MRYTNGNYEAFVHPRKPENVDQKSAYIIGAGLAGLATAVFLIRDGQMSGDRIHILEELPLSGGSLDGSFI
PHDGFVVRGGREMENHFECLWDLFRTIPSLEVDDASILDEFYRIDRDDPNSSNCRIIHNRGERVDDDGKF
TLSPKAQEEIIKLFMTKEELLVGKTIEDCFTDEFFKSNFWLYWCSMFAFEKWHSAIEMRRYIMRFIHHIE
GLPDFSALKFTKYNQYESLVKPLISYLKDHGVDFKYGAQVENVEVDFSNGKKVAKAIVFADKEIKELTEN
DLVFVTNGSITESSTQGSPTQAAPKTSELGGSWKLWQNLAKQSEEFGHPDVFCKEIPKEAWVVSATVTWK
NLKIQPYFEKLTHRQLRSGKVVTGGIITVKDSNWLLSFTTHRQPHFKEQNDQETVTWVYGLLSNTPGNYI
KKPIEDCTGEEITQELLYHLGMPEEEIEAFVKENTNTIPVYMPFITSYFMLREPGDRPLVVPEQSVNLAF
LGNFAETERDTVFTTEYSVRTAMEAVYQLLNVDRGVPEVYASAYDLRTLASSAYYLSDKQKLEDLELSFI
KKQALKVGLKKIKGTYIEELLEDAGLI
```

Şekil 3.8 *Lactococcus lactis* linoleat izomeraz enziminden sorumlu gen bölgesinin amino asit dizilimi

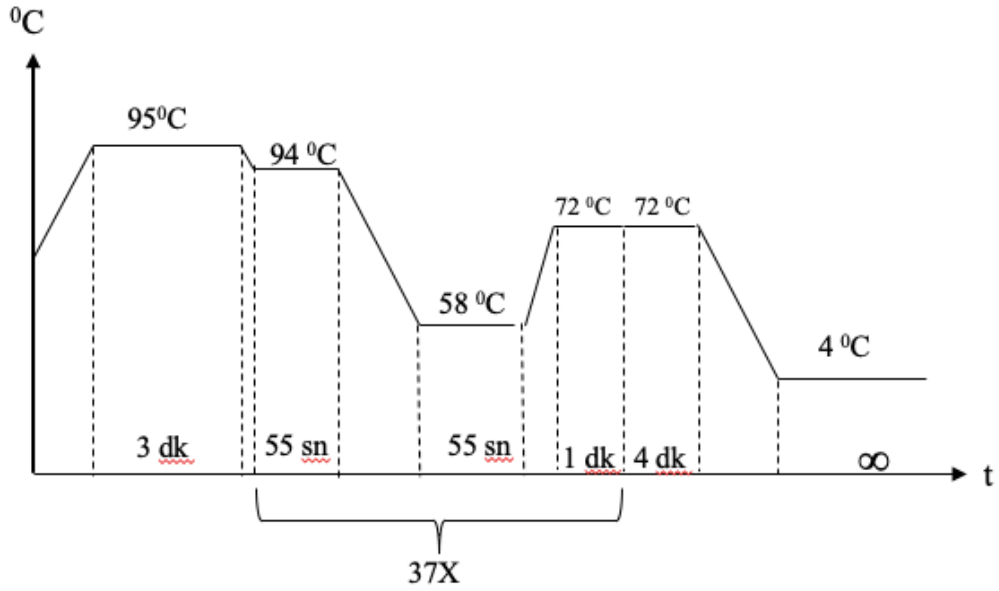
3.2.12. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu; toplam hacim 40 µl olacak şekilde; 31.5 µl dH2O, 1 µl (F) ileri ve (R) geri primerler (20 pmol) , 1 µl kalıp DNA (1ng/µl) , 4µl 10X tampon çözelti, [500 mM Tris-HCl (25°C'de pH 8.0), 50 mM MgCl2, 10 mM DTT], 1 µl dNTP (1 mM) ve 0.5 µl Taq DNA polimeraz (5 U/ml) [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT ve %50 (v/v) gliserol], karışımı ile gerçekleştirilmiştir.

PZR çalışma protokolü kalıp olarak kullanılan DNA'nın çift sarmal yapısının açılması için gerekli ön denatürasyon 95 ^{0}C olarak ayarlanmış ve 3 dakika boyunca bu sıcaklıkta tek döngü uygulanmıştır. Daha sonra asıl denatürasyon için 55 saniye boyunca 94 ^{0}C kullanılmıştır. İleri ve geri primerlerin yapışma sıcaklığı olan 58 ^{0}C 'de 55 saniye ve DNA zincirinin primerlerin bağlanması ile dNTP'lerin zinciri tamamladığı uzama sıcaklığında 1 dakika boyunca 72 ^{0}C şartlaması yapılış ve bu üç sıcaklıklı basamakların 37 tekrarı uygulanıştır. Son uzama işlemi için ise 4 dakika boyunca 72 ^{0}C ayarlanmış ve uzama tamamlanmıştır (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu için gereken kimyasallar ve miktarları

	Miktar (μL)
DNA	1μl
Primerler (F ve R)	1μl
DNA Tampon çözelti	4μl
$MgCl_2$	1μl
dNTP (A,T,G,C)	1μl
DNA polimeraz (µ/ml)	0.5μl
dH_2O	31.5μl
Toplam	40 μl



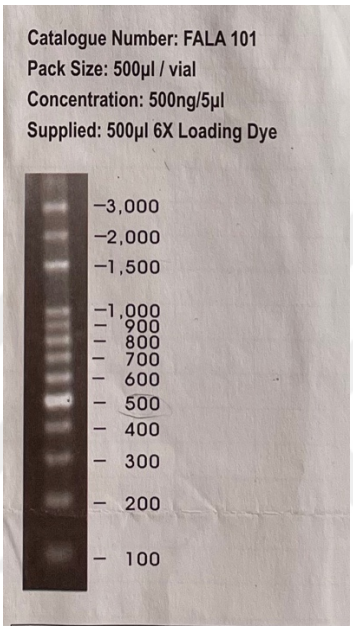
Şekil 3.9 Polimeraz Zincir Reaksiyonuna ait cihaz protokolünde uygulanan sıcaklık ve sürelerinin şematize edilmesi

Agaroz jel hazırlamak üzere; %1 ve %1.5 (w/v)‘ lik oranlarında agaroz (Merck;CAS no:9012-36-6), 1X TBE (**T**rizma Base+**B**orikAsit+**E**DTA) tampon çözeltisinde çözdürülmüştür (Çizelge 3.8). Analiz edilecek DNA örnekleri 1/5 (yükleme tampon çözeltisi/DNA) oranında yükleme solüsyonu [10 µl DNA yükleme tampon çözeltisi için; 0.025 mg bromophenol blue, %40 sükroz ve 2,5 ml EDTA (100 mM) (pH 8.0)] eklenerek yüklemeye hazırlanmıştır. PZR ve DNA örneklerinin büyüklüklerini belirlemek için 100 baz çiftlik DNA markörleri (Favorgen) kullanılmıştır. Elektroforez tankında (Cole Parmer), DNA örnekleri 12 cm jel uzunluğu için 90 volt ve 120 mA’da 15 dakika hesaplanmış ve buna göre koşturulmuştur. Koşturulan agaroz jel Et-Br (0.5 µg/ml)

ile 10-15 dakika jel koşturması sonrası boyama işlemine tabi tutulmuştur. PZR ürünleri UV ışığı altında 312 nm dalga boyunda görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır (Olympus C5060).

Çizelge 3.8 Agaroz jel tampon çözeltisi (Trisma Borikasit ETDA)

1X TBE	Kimyasal	Miktar(gr/lt)
	Borik Asit	5,5 gr
	Trizma Base	10,8 gr
	EDTA (500 mM)	4 ml



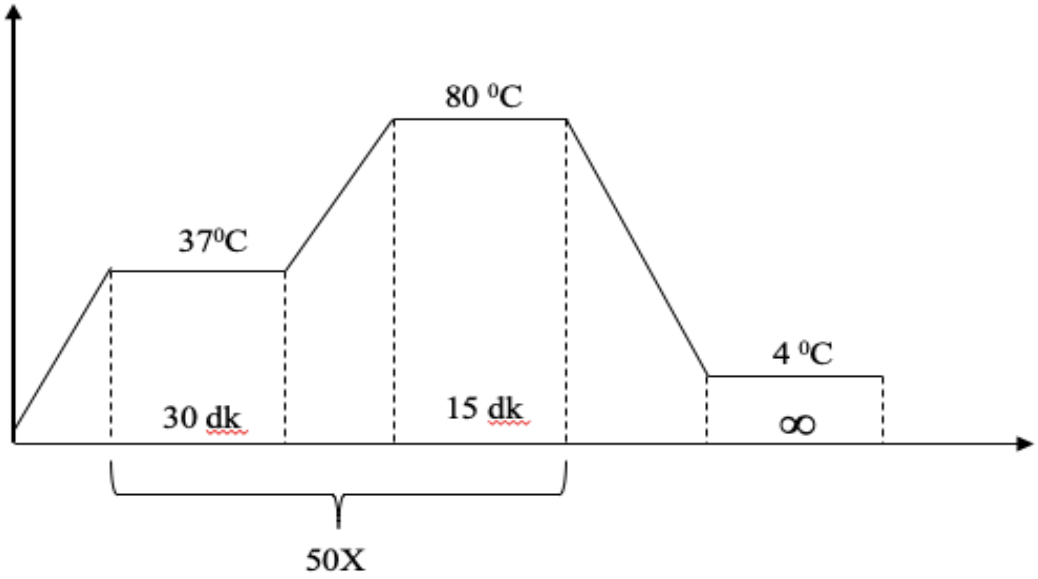
Şekil 3.10 Favorgen 100 bç DNA marker basamakları

3.2.13. DNA Dizi Analizi

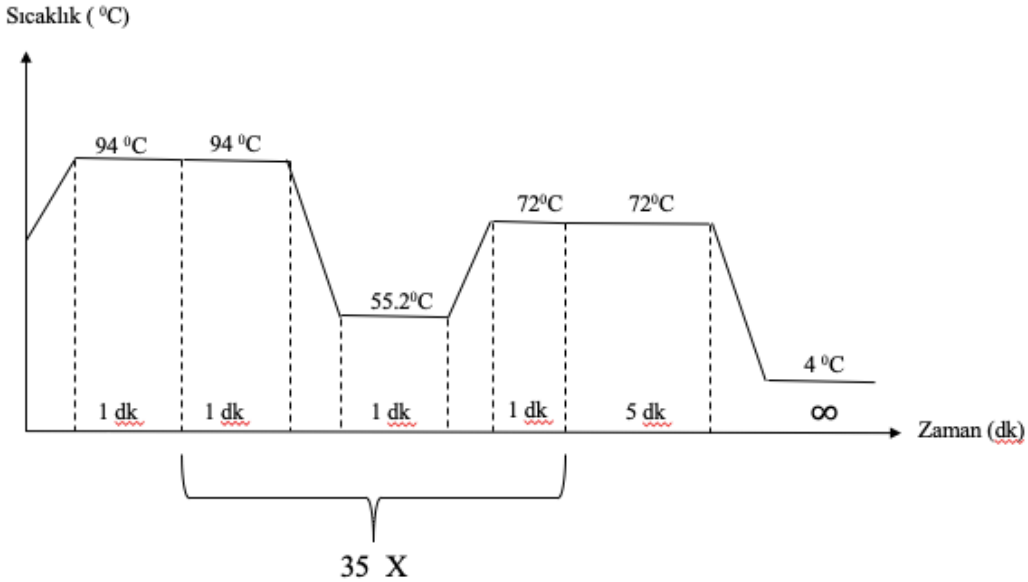
Elde edilen PZR ürünü dizileme yapılabilmesi için çift basamaklı yine bir PZR işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem hedef gen bölgesinin dNTP işaretli ddNTP'ler kullanılarak yapılan PZR işlemidir. Reaksiyon için; 2 µl 5X sequencing buffer, 2 µl big dye 3.1, 2 µl PZR ürünü, 1 µl primer (Forward veya Reverse), 2 µl dH_2O eklenerek toplam hacim 9 µl olacak şekilde PZR karışımı elde edilmiştir. PZR işleminden sonra elde edilen üründeki ddNTP, dNTP ve primer kalıntılarını uzaklaştırmak için sephadex'li kolonlar kullanılmıştır. Sephadex uygulamasında; 1 gr sephadex 14 ml dH_2O'da çözülüp içersininde kolon bulunduran ependorf tüplerine her bir örnek için 800 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. İçerisinde sephadex bulunan ependorflar 5 dakika beklenmiş ve 5000 *g*'de 3 dakkika santrifüj edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. PZR ürünleri hazırlanan bu sephadex'li kolonlara alınmış, 5000 *g*'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Örnekler Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzers-Hitachi (Molgen Tech) yüklenmiş ve nükleotit dizileri

belirlenmiştir.DNA dizileme analizi için ilk aşama PZR protokolü 37 ^{0}C'de 30 dk, 80 ^{0}C'de 15 dk ve +4 ^{0}C'de ∞ toplamda 50 döngü olacak şekilde ayarlanmıştır (Çizelge 3.9). Dizileme PZR ikinci aşamasında PZR protokolü ise 94 ^{0}C'de 1 dk, 94 ^{0}C'de 1dk, 55.2 ^{0}C'de 1 dk, 72 ^{0}C'de 1 dk, 72 ^{0}C'de 5 dk ve +4 ^{0}C'de ∞ toplam 35 döngüde tamamlanmıştır (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.9 DNA dizi analizi ilk aşama PZR protokolü



Çizelge 3.10 DNA dizi analizi ikinci aşama PZR protokolü

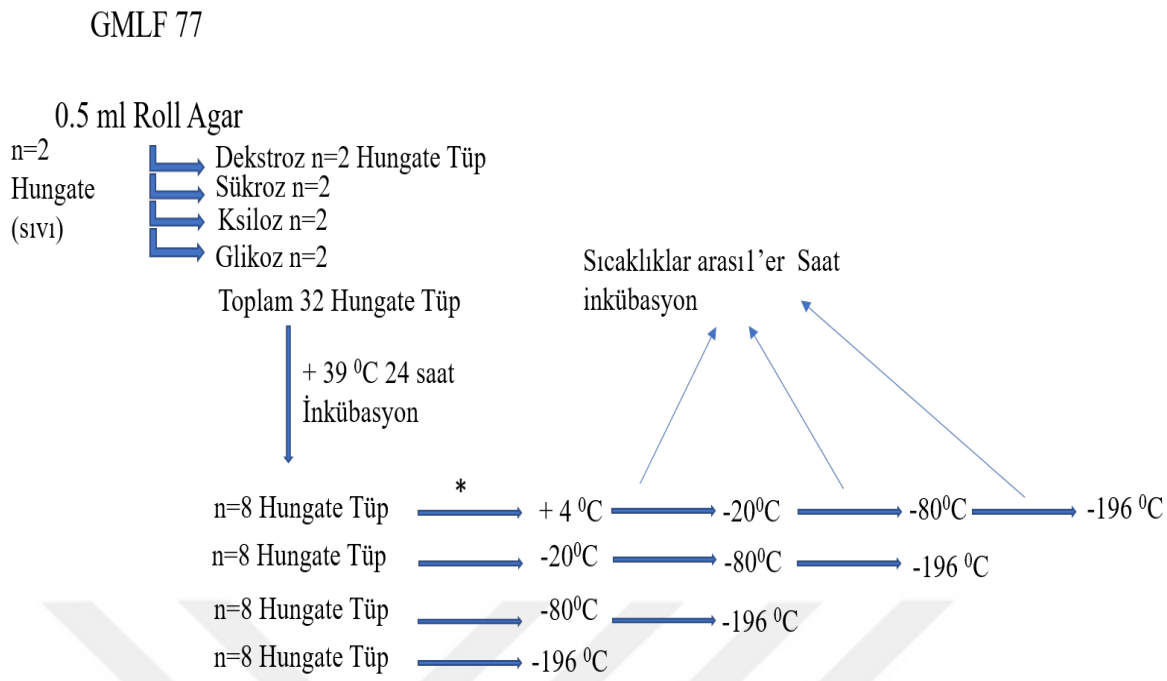


3.2.14. Filogenetik Sınıflandırma

DNA izolasyonu ve dizileme analizi sonucu elde edilen anaerobik gut funguslarına ait diziler sınıflandırma amacı ve detaylı düzenlemelerin gerçekleştirilmesi amacı ile filogenetik ağaçların görselleştirilmesi için MEGA 11 paket programı, DNA dizilerinin uygun formata dönüştürülmesi (fasta) için BioEdit paket programlarından yararlanılmış ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu çalışma ile izole edilen 7 adet fungal DNA dizisi ile NCBI veri tabanından seçilen 43 DNA dizisi kullanılmıştır. Aynı zamanda DNA dizilimlerinin hizalanmasında NCBI veri tabanı kullanılmıştır. Elde edilen diziler hakkındaki bilgileri benzer diziler ile NCBI çevirim içi programında BLAST yöntemi ile karşılaştırılmıştır. MEGA 11 programında çoklu hizalama yapımı ile elde edilen diziler uygun formatta kaydedilmiş ve Neighbour Joining (NJ) metodları ile dendrogramları oluşturulmuştur (https://www.megasoftware.net)

3.2.15. Uzun Süreli Muhafaza Deneme Deseni

Uzun süreli muhafaza yönteminde roll tüp agar ve eğik agar ile birlikte kullanılmak üzere hazırlanan 4 farklı enerji kaynaklarından birini içeren besi yerlerine izolatlar (GMLF77 ve GMLF18) inoküle edilerek 39 ^{o}C de 24 saat süreyle Hungate tüplerinde (125x16 mm, Bellco Glass Inc., USA) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda herbir örnek hattı için 6 şar adet karyovial tüp %15 gliserol kullanılarak ya da kriyoprotektan kullanılmadan +4℃, -20℃, -80℃ ve -196°C'de 1 hafta, 2 hafta, 3 hafta, 1 ay, 3 ay ve 6 ay olarak saklanmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.11 Uzun süreli saklama koşullarını belirlemek üzere planlanan deneme deseni. *:Her bir deneme hattı için 6 adet kriyoprotektanlı (%15 gliserol) ve 6 adet kriyoprotektansız toplam 12 kriyoviyal kullanılmıştır. *Caecomyces sp.*GMLF77 izolatı için roll agarda yapılan işlemlerin tamamı *Orpinomyces sp.* GMLF18 izolatı ve eğik agar için de ayrı ayrı tekrarlanmıştır.

Her bir muhafaza periyodundan sonra soğuk ortamdan çıkarılan tüpler buza konularak çözdürülmüş (yavaş çözünme), enerji kaynağı olarak 2 tüp buğday samanı içeren ve 2 tüp ise glikoz içeren besi yerlerine agar ile birlikte karbondioksit akımı altında öze kullanılarak aktarılmıştır. Anaerobik fungusların optimum gelişim gösterdiği 39 ℃ de inkübatöre bırakılan örneklerin gelişimleri 14 gün süreyle ters (inverted) mikroskop (SOIF XDS-1B) kullanılarak gözlemlenmiştir (Theodorou ve ark., 1994).

3.2.16. Yağ Asidi Analizi

Saflaştırılan ve stok kültürden temin edilen anaerobik gut funguslar yağ analizi için toplamda 150 ml anaerobik besi yeri içeren serum şişelerinde sıfır (0), otuz altı (36) ve yetmiş iki (72) saatlik gelişmeye bırakılmak üzere ekim yapılmıştır. Sıfır saatlik gelişim için ekim yapılan serum şişeleri lipit ekstraksiyonu yapılacak zamana kadar +4 ^{0}C de muhafaza edilirken, 36 ve 72 saatlik gelişim için ekim yapılan tüpler 39 ^{0}C sıcaklığa sahip inkübatörlere konulmuş ve belirlenen süre sonunda inkübatörden çıkartılarak lipit ekstraksiyonu yapılmak üzere +4 ^{0}C de muhafaza edilmiştir.

Serum şişelerinde 50 ml ‘lik (90 ml serum şişeleri içerisinde) besi yerlerinde gelişmelerini tamamlamış olan anaerobik fungusların lipit ekstraksionu için süpernatantları hücrelerden ayrılmıştır. Bu işlem sırasında 50 ml’lik serum şişelerinde bulunan örnekler kolay santrifüj edilebilmesi amacı ile 8 ml’lik bakteri tüplerine dağıtılarak 1380 g de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantlarının saf olarak elde edilmesi sağlanmıştır (Bligh ve Dyer, 1959).

3.2.17. Lipid Ekstraksiyonu

Bligh ve Dyer ‘in (1959) yaptığı lipit ekstraksiyon yöntemine göre ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu yönteme göre süpernatant ve hücreler toplandıktan sonra 1ml PBS (Phosphate Buffered Saline) solusyonunda çözdürülmüştür (PBS miktarı kullanılan hücre ve süpernatant miktarına göre değişiklik göstermektedir. Eğer 2 ml süpernatant kullanılıyorsa 2 ml PBS kullanılmalıdır). Daha sonra karışımın üzerine 3.75 ml Kloroform/Metanol (1:2) ilave edilmiştir (3.75 ml kloroform/metanol PBS miktarına bağlı olarak değişmektedir. 2 ml PBS için 7.5 ml kloroform/metanol çözeltisi kullanılmalıdır). Tüpler bu çözeltiler eklendikten sonra 2 dakika vorteks yardımı ile karıştırılmıştır. Vorteks sonrası 1.25 ml kloroform (1 ml örnek için) eklenip 30 saniye tekrar vorteks ile karıştırılması gerçekleştirilmiştir. Son olarak karışımın üzerine 1.5 M NaCl solüsyonundan 1.25 ml eklenmiştir ve tekrardan 30 saniye süre ile vorteks ile karıştırılmıştır. Vorteks sonrası tüpler 500 g de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan ikili fazdan üst sıvı dikkatlice dökülmüştür ve altta kalan kısım üzerine eşit hacimde hekzan (%99 saflıkta) ilave edilmiştir. Hekzan ilave edilen tüpler azot gazı ile muameleye tabi tutularak yağların çöktürülmesi sağlanmıştır (Bligh ve Dyer, 1959).

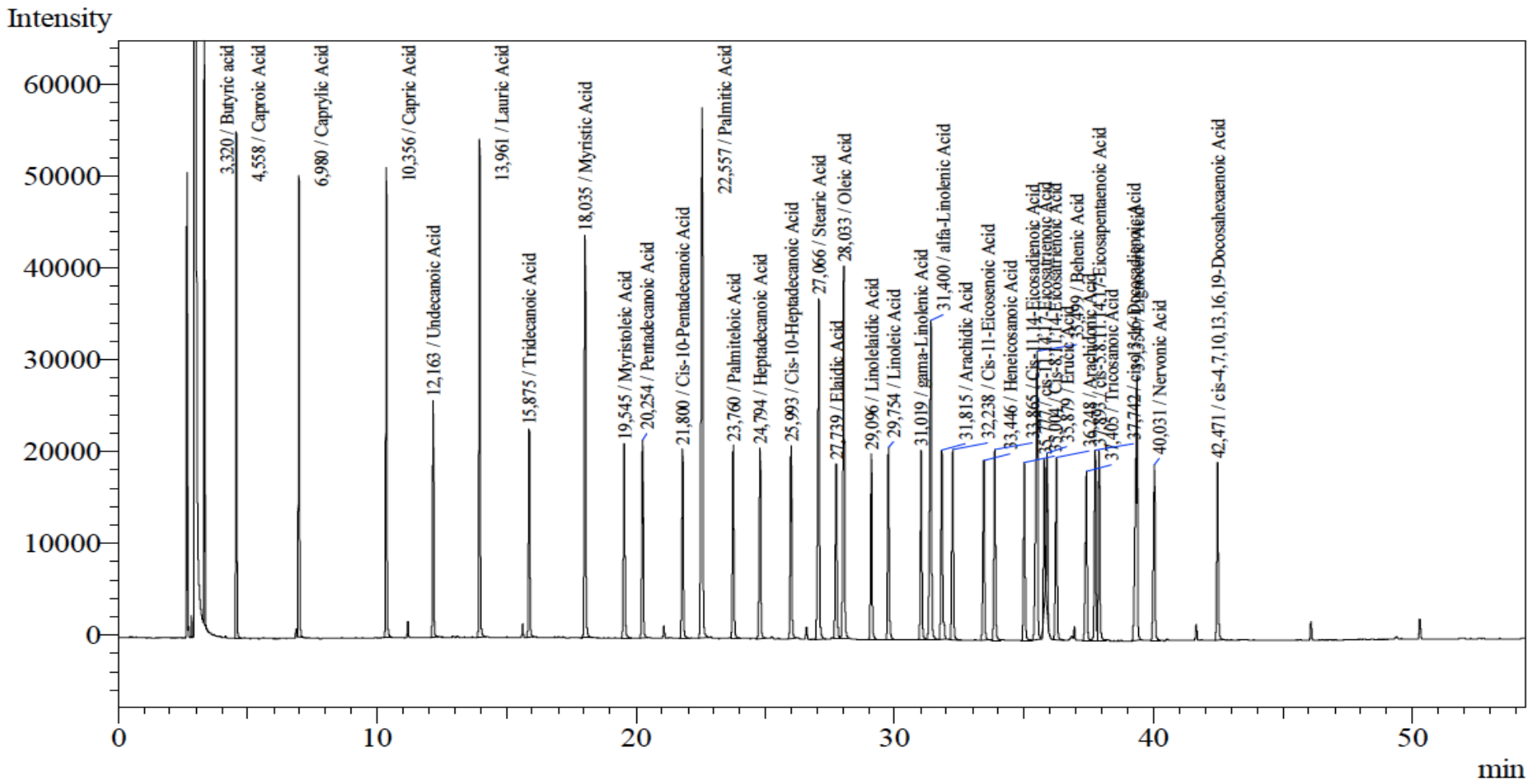
3.2.18. Gaz Kromotografi (GC) Çalışmaları

Lipit ekstraksiyonu sonrası elde edilen ürünler üzerine Gaz kromatografisi uygulanmadan önce yağ metilasyonu olarak adlandırılan ön işlem uygulanmıştır. Elde edilen yağ örneklerinden 0,1 g yağ alınıp 15 ml ağzı kapaklı tüpe konularak, üzerine 1ml 2 N Metanollü KOH çözeltisi ilave edilmiş ve 2 dk vortekslenmiştir. Daha sonra 15 dk beklenip yağ asitleri bu aşamada metil esterlerine dönüştürülmesi sağlanır. Sonrasında üzerine 10 ml hekzan ilave edilerek karıştırılıp (bu aşamada metil esterleri hekzan fazına geçer) faz ayrımı olması için 6070 *g* 10 dk santrifüj edilir. Üst fazdan 1 µl GC cihazına enjeksiyon yapılır (Hara ve Radin 1978’den modifiye edilmiştir).

COI/T.20/Doc.No33(IOC2015e) standart metodu modifiye edilerek, yağ asitlerinin metil esterlerine (FAME) transesterifikasyonu takiben gaz kromatografisi (GC) ile belirleme yapılmştır. Yağ asit metil esterleri Çizelge 3.11 'daki şartlandırmalara göre belirlenmiştir. Buna göre kapiler kolon (60m x 0.20mm x 0.25μm, TR-CN 100 Teknocroma, İspanya) ile alev iyonizasyon dedektörüne (FID) sahip GC (GC-2025, Shimadzu, Japonya) ile analiz edilmiştir. Yağ asiti metil esterlerin belirlenmesi için kullanılan reaksiyon zamanları Şekil 3.11'de gösterilen 37 yağ asiti metil esteri standardı kullanılmıştır (Supelco 37 Compenent FAME mix, Sigma Aldrich, Almanya). Konjuge linoleik asit bu standart karışım içerisinde bulunmadığından ayrıca standart (Linoleic acid, conjugated methly ester O5632, Sigma Aldrich, Almanya) olarak kullanılmış ve kalibrasyon yapılmıştır.

Çizelge 3.11 GC cihazı için cihaz koşulları

Cihaz Şartları
Cihazın markası: Shimadzu
Cihazın modeli: 2025
Kolon: TRCN100
ID: 0.25um
DF: 0.20mm
L: 60m
Taşıyıcı gaz: He
Basınç : 280.8kPa
Toplam akış: 54ml/dk
Split ratio: 50
Enjeksiyon miktarı: 0.5ul
Enjeksiyon sıcaklığı: 240◦C
Kolon sıcaklığı: 80◦C
Rate: 3C -240◦C
Detektör: 250◦C FID
Analiz süresi: 61 dk



Şekil 3.12 Yağ asidi metil esterlerinin reaksiyon zamanlarına (FAME 37 yağ asidi standart mix) ait kromatogram görüntüsü

Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	3,320	112646	63036	2,877	%		1	Butyric acid
2	4,558	133194	54979	3,402	%		2	Caproic Acid
3	6,980	144129	50135	3,682	%	S	3	Caprylic Acid
4	10,356	152346	51152	3,892	%		4	Capric Acid
5	12,163	76366	25697	1,951	%	S	5	Undecanoic Acid
6	13,961	159276	53984	4,069	%		6	Lauric Acid
7	15,875	77607	22647	1,982	%		7	Tridecanoic Acid
8	18,035	161175	43709	4,117	%	S	8	Myristic Acid
9	19,545	80102	21183	2,046	%	SV	9	Myristoleic Acid
10	20,254	80082	21491	2,046	%		10	Pentadecanoic Acid
11	21,800	78752	20586	2,012	%		11	Cis-10-Pentadecanoic A
12	22,557	247757	57627	6,329	%		12	Palmitic Acid
13	23,760	81844	21032	2,091	%	SV	13	Palmiteloic Acid
14	24,794	81600	20707	2,084	%	S	14	Heptadecanoic Acid
15	25,993	81102	20959	2,072	%		15	Cis-10-Heptadecanoic A
16	27,066	166126	37015	4,244	%		16	Stearic Acid
17	27,739	78676	18995	2,010	%		17	Elaidic Acid
18	28,033	167128	40500	4,269	%	V	18	Oleic Acid
19	29,096	80076	20214	2,045	%		19	Linolelaidic Acid
20	29,754	83479	20922	2,132	%		20	Linoleic Acid
21	31,019	81675	20641	2,086	%		21	gama-Linolenic Acid
22	31,400	168003	34679	4,292	%	V	22	alfa-Linolenic Acid
23	31,815	85314	20601	2,179	%		23	Arachidic Acid
24	32,238	83636	20719	2,136	%	S	24	Cis-11-Eicosenoic Acid
25	33,446	83262	19541	2,127	%	V	25	Heneicosanoic Acid
26	33,865	82731	20742	2,113	%		26	Cis-11,14-Eicosadienoi
27	35,004	77319	19351	1,975	%		27	Cis-8,11,14-Eicosatrien
28	35,499	165112	31424	4,218	%		28	Behenic Acid
29	35,777	52354	16086	1,337	%		29	cis-11,14,17-Eicosatrie
30	35,879	54252	16492	1,386	%		30	Erucic Acid
31	36,248	83899	19831	2,143	%	S	31	Arachidonic Acid
32	37,405	81820	18392	2,090	%		32	Tricosanoic Acid
33	37,742	82309	20684	2,103	%	V	33	cis-13.16-Docosadienoi
34	37,893	83803	20662	2,141	%	V	34	cis-5.8.11.14.17-Eicosa
35	39,354	162842	28848	4,160	%		35	Lignoceric Acid
36	40,031	84772	19091	2,165	%		36	Nervonic Acid
37	42,471	78212	19347	1,998	%		37	cis-4,7,10,13,16,19-Do
Total		3914778	1053701					

Şekil 3.13 GC Yağ asiti metil ester standart karışımı içerisinde bulunan yağ asidi metil esterleri ve reaksiyon zamanları

3.2.19. Konjuge Linoleik Asit (KLA) standardının Gaz Kromotografi (GC) okumaları için Hazırlanması

Gaz kromotografisinde (GC) konjuge linoleik asitin doğru bir şekilde gösterilebilmesi için dört farklı konjuge linoleik asit izomerlerini (c9-t11,t-10c-12, c9-c11, t9-t11) içeren (CLA-Sigma 05632) ticari konjuge linoleik asiti cis-9,11ve trans-9-11ile cis-10,12 ve trans-10,12 karışımı KLA oluşturmaktadır. Belirli seyreltmeler gerçekleştirilerek gaz kromotografında okunmuş ve konjuge linoleik asit standart pikler elde edilmiştir..

3.3. Yağ Asitlerinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

LB ve MRS besiyerlerinde patojen *Listeria monocytogenes* DSM215675, *Listeria monocytogenes* DSM219094, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213*, Bacillus cereus* ATCC11778, *Escherichia coli* ATC24922, *Salmonella enterica* suşları linoleik asit ve konjuge linoleik asitin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenebilmesi için sıvı LB- MRS ve katı LB-MRS besi yerlerine ekilmiş ve 35-37 ºC de inkübasyona bırakılmıştır.

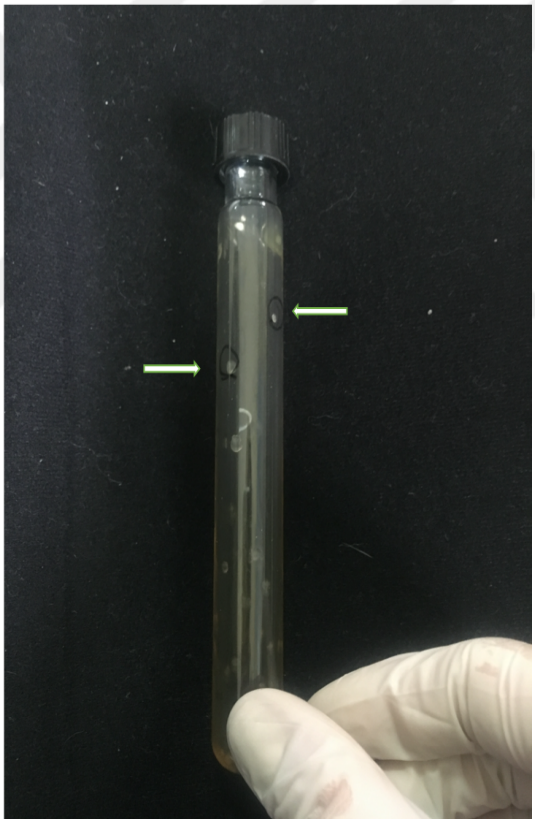
3.3.1. Linoleik Asit ve Konjuge Linoleik asitin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi

Nutrient Broth katı besi yerinde 24 saat süreli geliştirilen suşların spektrofotometrede 600 nm ‘de OD ölçümü gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrik OD değeri 0.1 olan bakterilerden 500µl alınmış ve total hacim 5 ml olan besi yerlerine ekilmiştir. Linoleik asitin ve konjuge linoleik asitin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenebilmesi için 5mg/ml, 10mg/ml, 20 mg/ml, 80 mg/ml ve 100 mg/ml linoleik asit ve konjuge linoleik asit %2 Twen 80 içerisinde ayrı ayrı homojen karışım haline getirilmiştir. Linoleik asitin yoğunluğu ve miktarının belirlenebilmesi için ise 500µl ve 1 ml linoleik asit son hacim 5ml olacak şekilde ekim yapılmış tüpler içerisine eklenmiştir. Daha sonra 3, 6, 9, 12 ve 24 saatlik zaman dilimlerinde her bir tüp 600 nm ‘de OD ölçümüne tabi tutulmuştur (EUCAST, 2020). Aynı zamanda her iki yağ asiti için antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi amacı ile yapılan deneme petri kaplarında disk difüzyon yöntemi kullanılarak da teyit edilmiştir. Buna göre petri kaplarına katı Nutrient Broth besi yeri üzerine patojen mikroorganizmalar yayılmıştır. Yağ asiti konsantrasyonları 10 mg/ml, 20mg/ml, 40 mg/ml, 80 mg/ml ve 100mg/ ml olarak belirlenmiş ve petri içerisine yerleştirilmiş diskler üzerine 10µl linoleik asit ve konjuge linoleik asit emdirilmiş ve disklerin kaymaması için 2 dakika steril kabin içerisinde bekletildikten sonra inkübatöre 24 ssaat süre ile bırakılmıştır. İnkübasyon süresi dolduktan sonra petrilerde oluşan çaplar dijital kumpas ile ölçülerek değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Dışkıdan İzole Edilen, Saflaştırılan AGF'lerin, Morfolojik Tanımlamaları ve Muhafazaları

BİGEM dışkı koleksiyonunda 14 yıl süre ile -20 °C de muhafaza edilen dışkılardan elde edilen anaerobik gut fungusları Roll tüp tekniği ile saflaştırılmış saf kültürlere ait kültürler çıplak gözle tüp içerisinde görülmekte olsada mikroskop altında gözlemlenmiştir (Şekil 4.1). Roll tüp agar içerisinde tek koloni gelişimi gösteren bireylerin rengi sarı, krem ve beyaz koloniler halinde gözlemlenmektedir. Tek koloniler CO_2 akımı altında öze yardımı ile alınarak sıvı besi yerine aktarılmış ve saf koloniler geliştirilmeye devam edilmiştir.



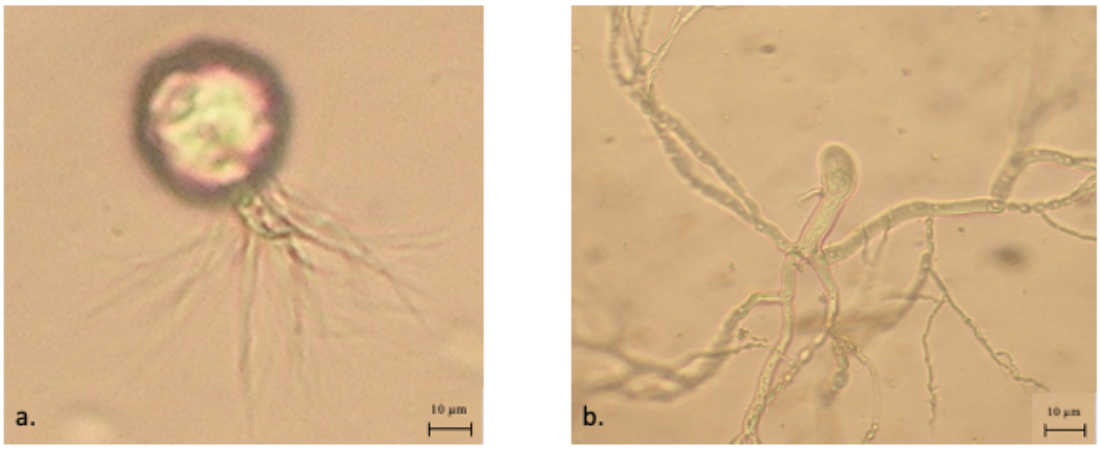
Şekil 4.1 Roll tüp tekniği kullanılarak saflaştırılma yapılan tek koloniye ait hücreler gösterilmiştir (Oklar agarlı besiyerinde çıplak göz ile gözlemlenebilen tek koloni göstermektedir).

Bu çalışmada 25 farklı anaerobik gut fungusu izole edilmiiş ve saflaştırılmış ancak 7 farklı anaerobik gut fungusuna ait (GMLF30, GMLF66, GMLF77, GMLF92, GMLF113 ve GMLF202) morfolojik tanımlamalar gerçekleştirilmiştir. Morfolojik olarak farklılık

gösteren bu izolatlar içerisinden ise gelişimlerin daha iyi olması sebebi ile GMLF30, GMLF66, GMLF77, GMLF 92, GMLF113 izolatları moleküler tanımlaması yapılmak üzere seçilmiştir.

İzolatlar farklı enerji kaynaklarında (ksiloz, glikoz, sükroz, dekstroz ve buğday samanı) geliştirilerek hücresel farklılıkları belirlenmiştir. Aynı zamanda farklı enerji kaynakları kullanılan katı besi yerlerinde de geliştirilerek agar üzerindeki koloni yapıları incelenmiştir. Bu verilere göre *Feramyces sp*. GMLF 30 çok kamçılı zoospor oluşturan, ovoid spor kesesine sahip, belirgin ve kısa kese boynu bulunan, uzun ve dallanmış rizodial yapılı bir fungus olarak belirlenmiştir. Farklı enerji kaynaklarında hücre şekillerinde morfolojik bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Agar üzerinde koloniler oluşturmaktadır.

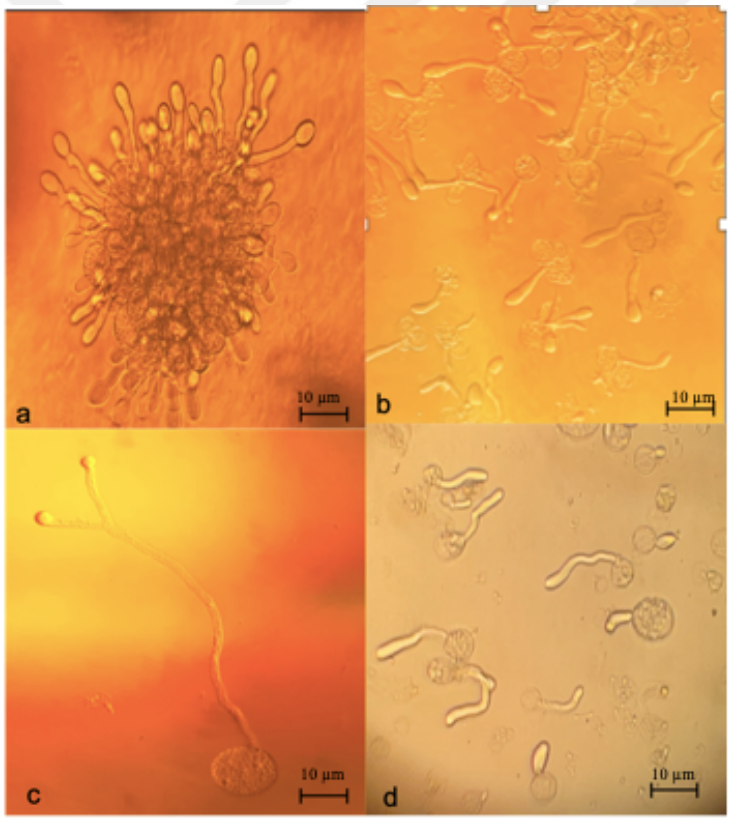
İzolasyon sonucu elde edilen diğer bir fungus ise *Neocallimastix frontalis.* GMLF 66 izolatıdır. Bu izolata ait morfolojik veriler mikroskop altında incelenmiş ve spor keseleri, rizodial yapıları ve zoospor kamçı sayıları belirlenmiştir. Zoosporları çok kamçılı olup 9-12 µm boyutundadır. Keseboynu belirgin ve uzundur (Şekil 4.2). Spor kesesi ise *Piromyces sp*.'ye ait bireylerin spor keseleri gibi uzamış şekildedir. Bu izolat sıvı besi yerinde enerji kaynağı farketmeksizin biyofilm yapıya benzer koloni oluşumu göstermektedir. Bu şekilde gelişim gösteren bir diğer anaerobik gut fungusu ise *Neocallimastix frontalis* bireyleridir. Bu özellikleri ile GMLF 66 *Neocallimastix frontalis* bireylerine morfolojik olarak benzemektedir (Barr ve ark.,1989).



Şekil 4.2 *Neocallinastix frontalis.* GMLF 66 anaerobik fungusuna ait zoospor ve olgun bireye ait mikroskop görüntüsü (a; çok kamçılı zoospor, b; dallanmış rizodial yapılı tallus

Saflaştırılan AGF örneklerinden *Caecomyces sp* GMLF 77' mikroskop altında incelenmiş ve morfolojik yapıları belirlenmiştir. Bu bireye morfolojik yapının daha iyi

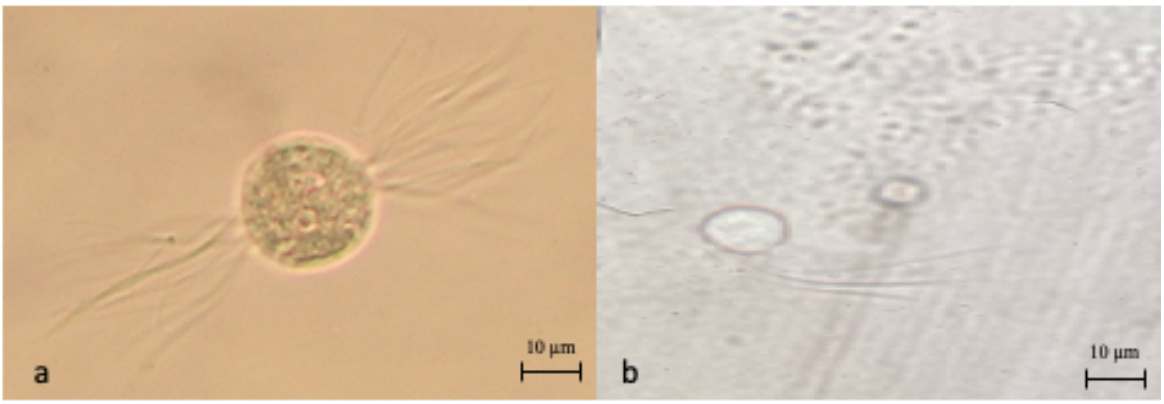
anlaşılabilmesi için populasyon agarlı besi yerinde ve sıvı besiyerlerinde mikroskop altında gözlemlenmiştir. Farklı karbon kaynakarında hücre yapılarının farklılık gösterebileceği düşünülerek farklı enerji kaynaklarındaki hücre yapılarıda mikroskobik olarak incelenmiştir (Şekil 4.3). Enerji kaynağı olarak ksiloz kullanılan sıvı besi yerindeki *Caecomyces sp* GMLF 77'ye ait bir bireylerde, tek bir kese boynundan çatallanarak iki adet zoospor kesesi ve küresel rizodial yapı oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.3c). Bu yapı Orpin (1988) tarafından da gözlemlenmiştir. Ayrıca belirgin bir kese boynu da bulunduğu net bir şekilde gözlemlenmektedir. *Caecomyces sp.* GMLF 77 Gold ve ark. (1988) çalışmalarında göstermiş olduğu gibi *C.equi* gibi tek bir rizoide sahip olmasi ile benzerlik göstermektedir. *Caecomyces sp'*ye ait diğer bir tür olan *C.communis* gibi 2 ile 4 spor kesesi oluşturması bakımından da benzerlik gösterdiği için de *Caecomyces sp* cinsine ait olduğu anlaşılmıştır (Ho ve Barr,1995).



Şekil 4.3 *Caecomyces sp* GMLF 77 numaraya ait mikroskop görüntüsü (a. agarlı ve enerji kaynağı ksiloz kullanılan besiyerinde kolonize olmuş GMLF 77, b. enerji kaynağı olarak glikoz içeren besi yerindeki populasyon, c. tek koloni gelişim gösteren GMLF 77, d. enerji kaynağı olarak ksiloz içeren besi yerindeki gelişimler)

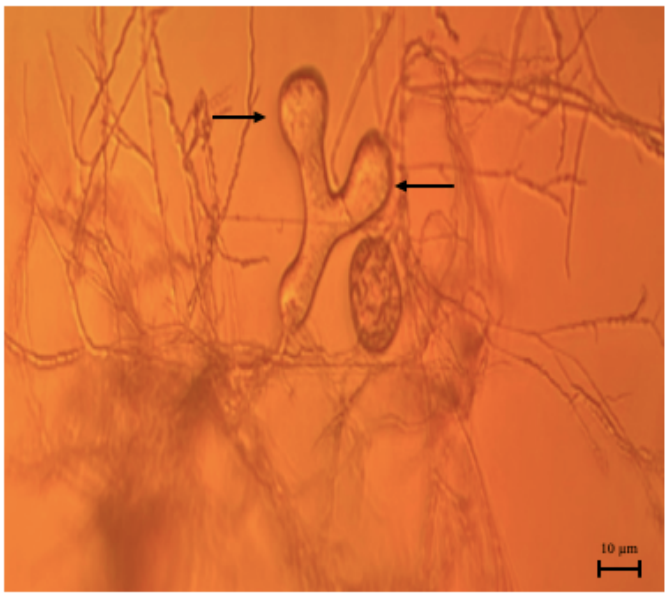
Olgun bireylerin dışında morfolojik olarak zoosporlar da gözlemlenmiş ve saf kültürlere ait zoosporların kamçıları incelenmiştir. Çalışmada kullanılan *Feramyces sp*

cinsine yakınlık gösteren GMLF 90 ve GMLF 113 izolatlarına ait zoosporlar mikroskop ile incelenmiştir. Zoosporlarda kamçılar tek bir kinotozom üzerinden oluşmaktadır ancak mikroskop altında gözlemlenirken iki farklı yönde kinotozom yapı ve kamçı oluşumu gerçekleşmiş gibi görünebilmektedir (Şekil 4.4). *Feramyces sp.,* (Hanafy ve ark.; 2018,2020) cinsleri çok kamçılı zoospora sahip olması nedeni ile bu cinsler içerisinde değerlendirilme yapılmıştır. Bu iki izolatın zoospor yapıları ve katı besi yerinde gelişim gösteren kolonileri birbiri ile benzemektedir. Her iki izolata ait koloniler düzgün dairesel koloniler oluşturmaktadır.



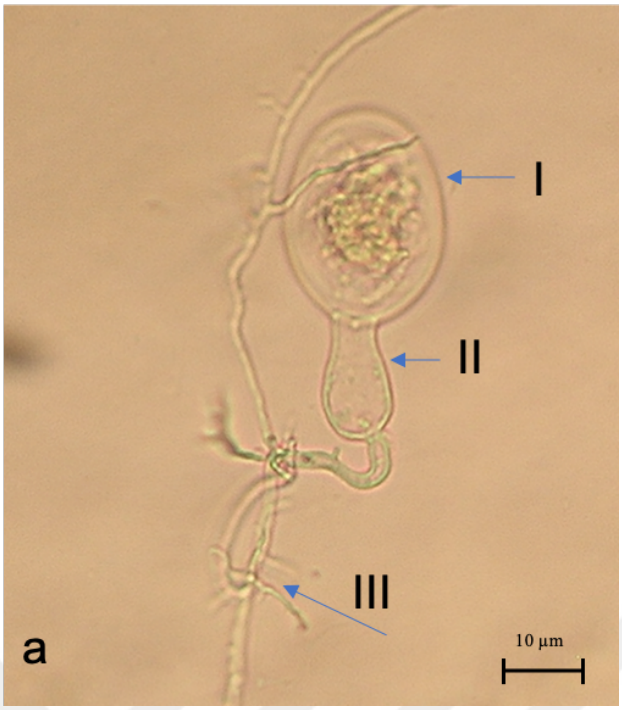
Şekil 4.4 Anaerobik gut funguslarına ait mikroskop görüntüleri. (a.*Feramyces sp.* GMLF 113 numaralı örneğe ait tek bir zoospor ve kamçıları, b. *Feramyces sp.* GMLF 90 numaralı örneğe ait tek bir zoospor ve kamçıları)

Morfolojik olarak tanımlanan *Neocallimastix sp* GMLF 92 oldukça az sayıda zoospora sahiptir. Zoosporlar tek kamçılıdır. Ergin bireylerde çoğunlukla tek bir kese boynundan oluşan iki zoospor kesesi mevcuttur. Belirgin kese boynu ve dallanmış rizodial yapıya sahiptir (Şekil 4.5). Rizoidal yapılar besi yerinde kullanılan enerji kaynağına göre farklı uzunluklarda oluşabilmektedir. Aynı şekilde enerji kaynağı farklı besi yerlerinde çoğunlukla çift spor keseli yapı gözlemlense de normal morfolojik yapıda tek zoospor keseside gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5 Morfolojik olarak tanımlanan *Neocallimastix sp* GMFLF 92' e ait mikroskop görüntüsü

Rizoidal yapısı bakımından *Piromyces sp*. GMLF 202 izolatı % 90 oranında tek bir rizoid ve sıklıkla dallanmış kollar şeklinde rapor edilmiştir. Spor kesesi ise çoğunlukla ovoid şeklinde gözlemlenmiştir. Zoosporların literatürdeki belirlemelerinde *Neocallimastix* cinsine ait bireylerde ekzojen ya da endojen gelişim gösterdiği Webb ve ark. (1988) tarafından gösterilmiş olup spor keseleri elipsoidal veya ovoid şekillerinde oluşabilmektedir. Aynı şekilde *Paucimyces polynuleatus'* a ait bireylerde spor kesesi çoğunlukla ovoid olarak gözlemlenmiştir (Hanafy ve ark.,2022). Kamçı yapıları ise GMLF 202 (moleküler tanımlaması yapılmamıştır) izolatına ait bireylerde tek kamçılı (< 4) olarak belirlenmiştir. Zoospor boyutarı incelendiğinde 8 µm ±1 boyutundadır. Benzer şekilde *Neocallimastix frontalise* ait bireylerde zoospor boyutları 7-22 µm arasında değişmektedir (Webb ve Theodoru, 1988). *Feramyces sp* ait bireylerin zoospor büyüklüğünün 9 µm olduğu Hanafy ve ark. (2018) tarafından belirlenmiş aynı şekilde GMLF 202 izolatına ait zoospor büyüklüğü de 10 µm'a olarak ölçülmüştür (Şekil 4.6). Tez çalışmasında morfolojik olarak tanımlanan anaerobik gut funguslarının listesi Çizilge 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.6 Morfolojik olarak tanımlanan *Piromyces sp.* GMLF 202 anaerobik gut fungusuna ait hücre yapısının mikroskop görüntüsü

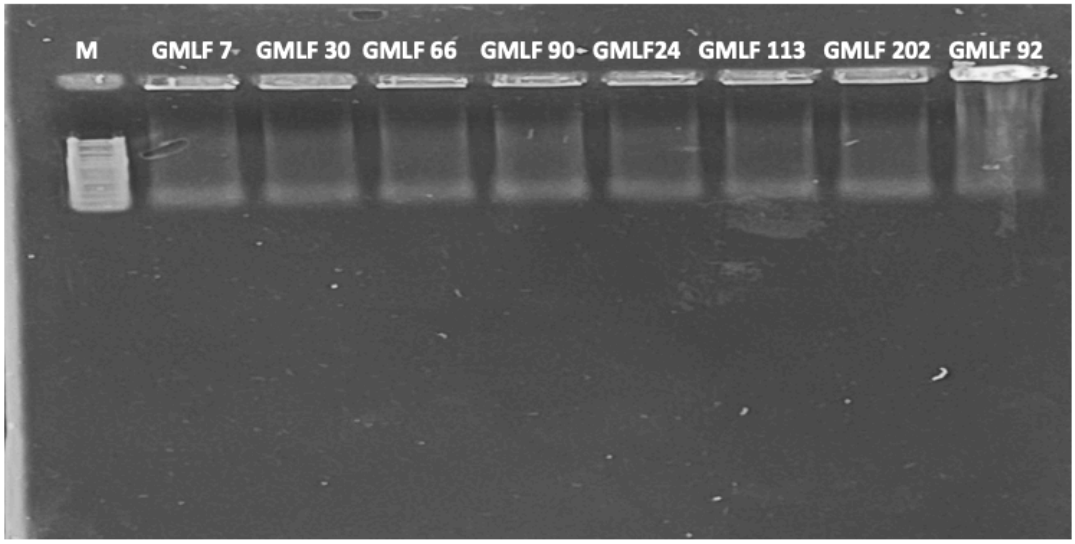
(I spor kesesi, II Kese boynu, III rizodial yapılar) .

Çizelge 4.1 Bu tez çalışması kapsamında putatif olarak morfolojik verilere göre izolasyonu, saflaştırılması ve tanımlanması yapılan AGF'ler

Morfolojik oarak tanımlaması yapılmış olan AGF'ler			
Cins	İzolat No	Thallus Yapısı	Zoospor Kamçı Sayısı
Feramyces	GMLF 30	Dallanmış rizoid	Kamçı sayısı>4
Neocallimastix	GMLF 66	Dallanmış rizoid	Kamçı sayısı >4
Caecomyces	GMLF 77	Küresel rizoid	Kamçı sayısı>4
Feramyces	GMLF 90	Dallanmış rizoid	Kamçı sayısı< 4
Neocallimastix	GMLF 92	Dallanmış rizoid	Kamçı sayısı >4
Feramyces	GMLF 113	Dallanmış rizoid	Kamçı sayısı >4
Piromyces	GMLF 202	Dallanmış rizoid	Kamçı sayısı<4

4.1.1. Anaerobik Gut Funguslarından Kromozomal DNA İzolasyonu ve Moleküler Tanımlaması

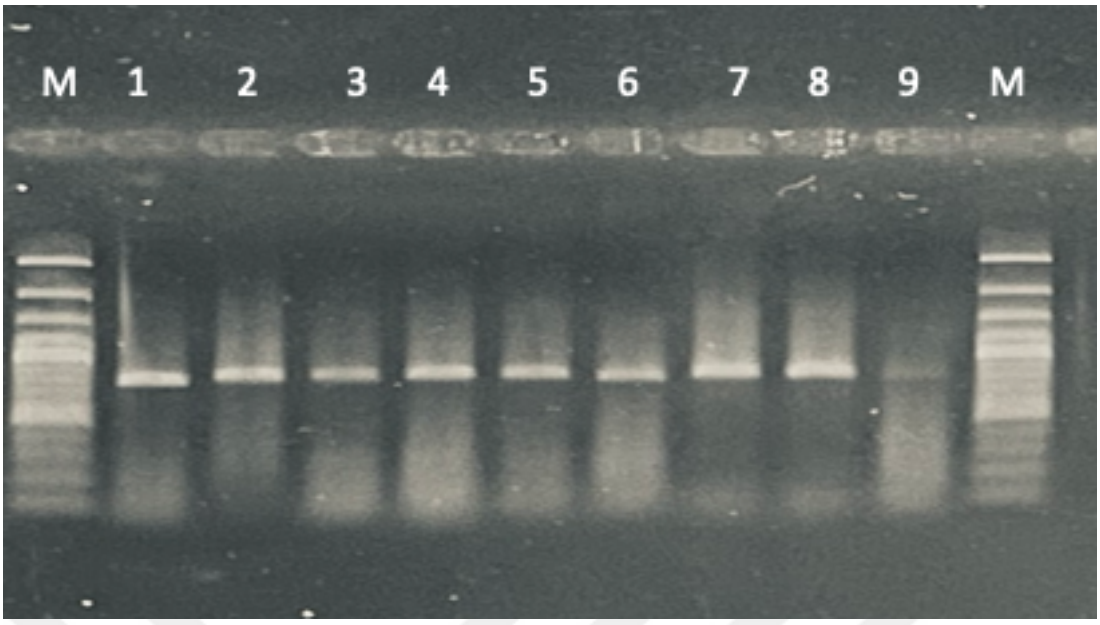
Dışkıdan izole edilerek saflaştırılan 25 anaerobik gut funguslarından CTAB metodu kullanılarak elde edilen DNA örnekleri % 0.7 agaroz içeren jelde 10 dakika 90 V 110 A de yürütülmüştür. Yürütme sonucu agaroz jel kuyucukları içerisinde DNA'ların varlığı tespit edilmiş (Şekil 4.7) ve 21 DNA izolasyonun başarılı olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen 21 DNA'dan bu tez çalışması için seçilen izolatlar GMLF 30, GMLF 66, GMLF 90, GMLF 92, GMLF 113 ve GMLF 202 ITS gen bölgesi tespiti için kullanılmıştır. Geri kalan DNA örnekleri ise linoleat izomeraz gen bölgesi çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.



Şekil 4.7 İzolasyon sonucu elde edilen DNAlardan bazı örneklerin %0,7'lik agaroz jelde koşturulması örneği (M: 1 kb marker)

4.1.2. İzolatların ITS Gen Bölgesinin Tanımlanması

DNA izolasyonu başarılı GMLF 30, GMLF 66, GMLF 77, GMLF 90, GMLF 92, GMLF 113 ve GMLF 202 örnekler için ITS primerleri kullanılarak PZR ile amplifiye edilmiştir. Gerçekleştirilen PZR analizi sonucunda, yaklaşık 780 bç uzunluktaki ITS bölgesi DNA'lar jel elektroforez ile yürütülerek UV ışık altında gözlemlenmiştir (Şekil 4.8). ITS tanımlama bölgesi ile fungus tanımlaması yapılan örneklerin DNA dizi analizleri gerçekleştirilmiştir.



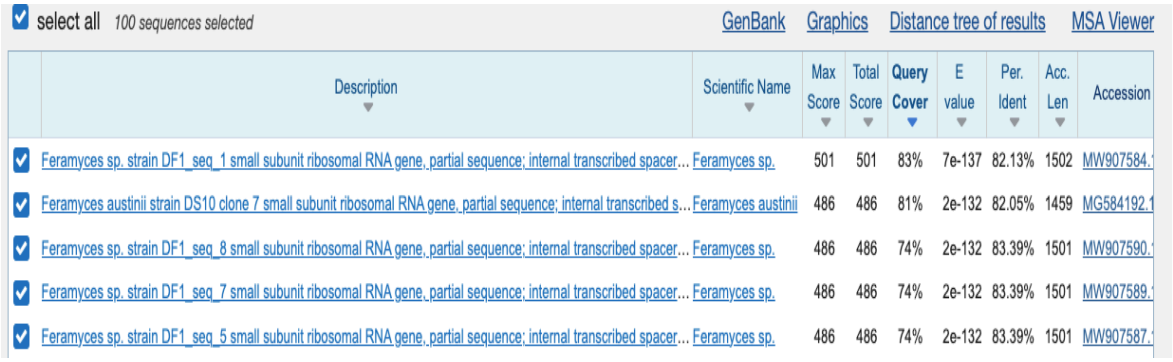
Şekil 4.8 ITS primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR analizi sonucu (M; marker , 1; GMLF 30, 2; GMLF 66, 3; GMLF 77, 4; GMLF 90, 5; GMLF 113, 6; GMLF 76, 7; GMLF 92 , 8, GMLF 202, 9; GMLF 63).

4.1.3. İzolatların DNA Dizi Analizileri

Tüm örnekler için ITS bölgelerine göre tanımlama yapılmış sonuçları NCBI veri tabanından taranmıştır. Bu veri tabanına göre daha önce yapılmış ITS gen bölgeleri dizileri karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda dizilerin filogenetik ağaç oluşumları da ITS dizileri bölgesi üzerinden gerçekleştirilmiş hem diğer cinsler hem de izolasyonu gerçekleştirilen cinsler ile benzerlikleri filogenetik ağaç üzerinde gösterilmiştir.

4.1.3.1. *Feramyces sp.* GMLF 30

Kültür koleksiyonuna *Feramyces sp.* GMLF 30 olarak numaralandırılmış fungal izolata ait DNA dizileme analizi sonuçlarına göre 718 baz çiftlik DNA dizisinde (A=382, T= 234, G= 104 ve C= 98) tüm dizi içerisindeki G/C oranı % 28 olarak tespit edilmiştir. Bu dizi ile NCBI veri tabanında daha önceden kayıt altına alınmış ITS bölgelerine ait dizilerin karşılaştırılması ile GMLF 30 izolatı %83 oranında AGF ‘ler ile benzer olduğu belirlenmiştir. Morfolojik olarak tanımlanan *Feramyces sp.* GMLF 30 olarak isimlendirilen ve bu izolat ile benzerlik gösteren ilk üç izolata ait DNA dizileri filogenetik ağaç oluşturmada kullanılmıştır. İzolatlara ait referans numaraları Şekil 4.9’de gösterilmiştir. NCBI veri tabanında maksimum benzerlik gösteren izolatın ITS bölgesi ile karşılaştırılan Morfolojik olarak tanımlanan *Feramyces sp.* GMLF 30 ‘a ait dizililerin farklılıkları ise Şekil 4. 10‘da gösterilmiştir.

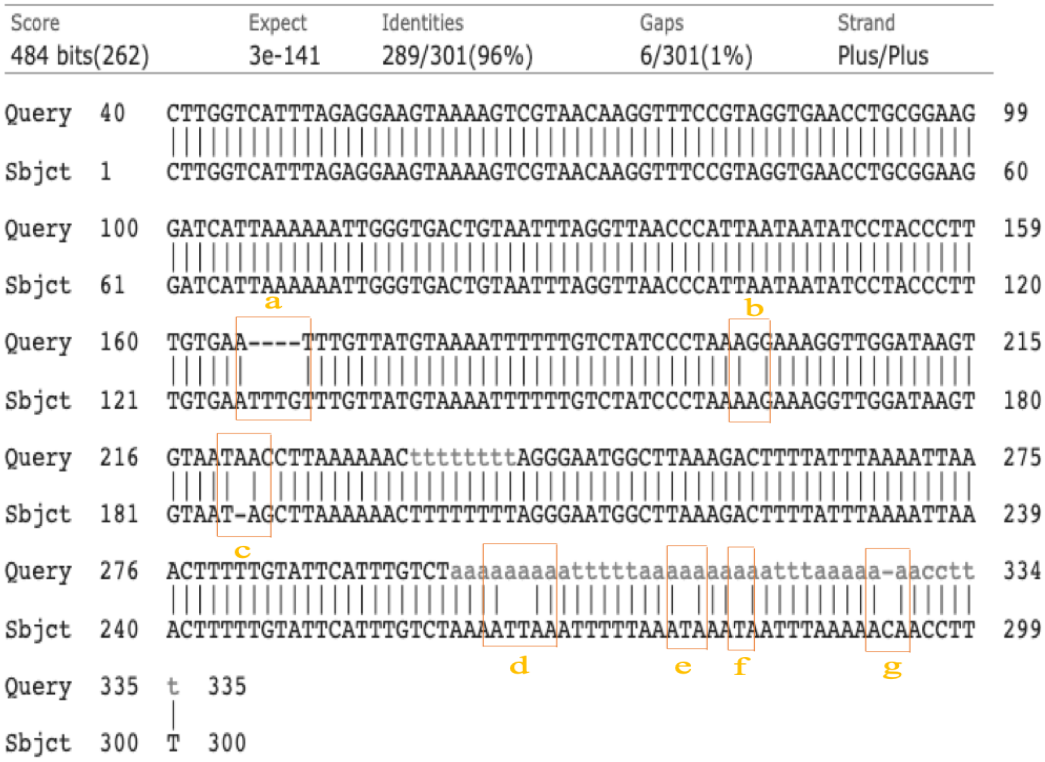


select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Feramyces sp. strain DF1_seq_1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Feramyces sp.	501	501	83%	7e-137	82.13%	1502	MW907584.1
Feramyces austinii strain DS10 clone 7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	Feramyces austinii	486	486	81%	2e-132	82.05%	1459	MG584192.1
Feramyces sp. strain DF1_seq_8 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Feramyces sp.	486	486	74%	2e-132	83.39%	1501	MW907590.1
Feramyces sp. strain DF1_seq_7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Feramyces sp.	486	486	74%	2e-132	83.39%	1501	MW907589.1
Feramyces sp. strain DF1_seq_5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Feramyces sp.	486	486	74%	2e-132	83.39%	1501	MW907587.1

Şekil 4.9 *Feramyces sp*. GMLF 30 numaralı izolata ait ITS bölgesinin NCBI veri tabanında taranması sonucu elde edilen benzerlik oranları ve benzerlik gösteren diğer mikroorganizmalar

DNA dizi analizi sonucu oluşan nükleotidlere ait kramotogramlar DNA dizilerinin doğruluğunun tespiti için kullanılmıştır. Buna göre manuel düzenlemeler yapılmış ve pikler tek tek kontrol edilerek doğru DNA dizileri elde edilmiştir.Veri tabanlarında (NCBI) DNA dizileme sonucu elde edilen diziler karşılaştırıldıktan sonra en fazla benzerlik gösteren *Feramyces sp* MV907584.1 GenBank numaralı izolat ile karşılaştırılma yapılmış ve farklılıklar Şekil 4.10 ‘de gösterilmiştir. Buna göre a, c ve g ile gösterilen kare içerisine alınan bölgede referans izolata ait dizilimin bu çalışmada kullanılan izolata ait dizisinde karşılığının olmadığı görülmektedir. Bunun yanı sıra b, d, e ve f ile gösterilen gösterilen alanda ise nükleotid değişimleri görülmüştür.



Şekil 4.10 NCBI veri tabanında Morfolojik olarak tanımlanan *Feramyces sp.* GMLF 30 fungal izolat ile maksimum benzerlik gösteren *Feramyces sp* MV907584.1 numaralı izolata ait kısmi ITS dizilerinin karşılaştırılması (Quary: Bu çalışma kapsamında izolasyonu ve saflaştırılması yapılmış olan *Feramyces sp* GMLF 30, Sbjct: Referans izolata aiy ITS bölgesi nükleotid dizilimi)

4.1.3.2. *Neocallimastix* GMLF 66

Dışkıdan izole edilerek bu çalışmada kullanılan *Neocallimastix* GMLF 66 kültür koleksiyonu numaralı fungal izolatın gen dizileme analizi gerçekleştirilmiştir. Gen dizileme analizi 782 baz çiftlik ITS gen bölgesine göre gerçekleştirilmiştir. Bu dizileme analizine göre C=88, A=274, G=97 ve T=393 olarak belirlenirken G/C oranı % 23 olarak hesaplanmıştır. Veri tabanında analiz edilen *Neocallimastix frontalis* GMLF 66 fungal izolata ait DNA dizisine benzerlik gösteren organizmalar NCBI veri tabanına BLAST yöntemi ile araştırılmış ve farklı diziler belirlenmiştir (Şekil 4.11). Aynı zamanda DNA dizisine ait kromotografik dizileme de DNA dizisindeki olası hatalı okumaların düzeltilmesinde kullanılmış ve MEGA 11 programı yardımı ile düzenlenmiştir *Neocallimastix frontalis* GMLF 66 izolatının maksimum benzerliği (%93) *Neocallimastix frontalis* KF312488.1 referans kodu olan AGF üyesi ile maksimum benzerlik göstermiştir (Şekil 4.12).

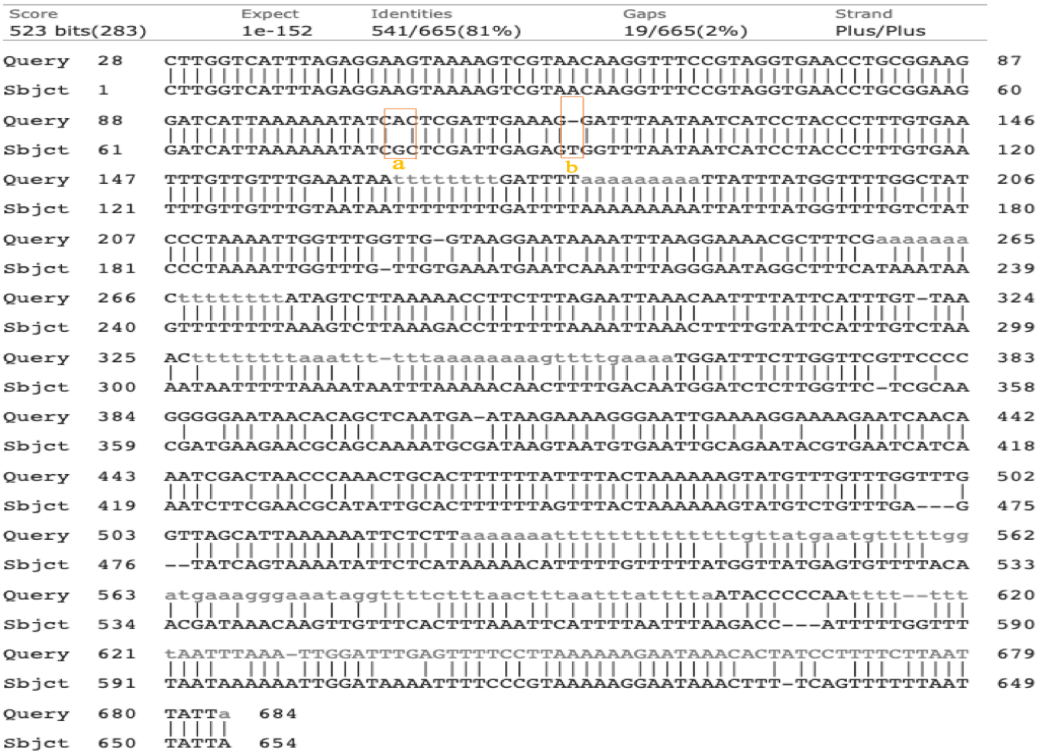


Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Neocallimastix frontalis strain ST2_5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 an...	Neocallimastix fr...	523	523	93%	1e-143	81.35%	700	KF312488.1
Neocallimastix frontalis strain ST2_6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 an...	Neocallimastix fr...	521	521	93%	5e-143	81.31%	710	KF312489.1
Neocallimastix frontalis strain ST2_4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 an...	Neocallimastix fr...	521	521	93%	5e-143	81.31%	697	KF312487.1
Uncultured fungus clone 3R1_01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, compl...	uncultured fungus	497	497	52%	9e-136	90.91%	542	JX184821.1

Şekil 4.11 *Neocallimastix frontalis* GMLF 66 suşu için ITS gen bölgesinin NCBI veri tabanında incelenmesi sonucu en yüksek benzerlik gösterdiği suşlar

DNA dizileme analizinde oluşabilecek cihazsal hataların minimuma indirilmesi için gerçekleştirilen kontrollerde dizi kramotogramından yararlanılmaktadır. Bu nedenle *Neocallimastix frontalis.* GMLF 66 izolatına ait DNA dizisinde oluşan hatalı okumalar kramotogram ile düzeltilmiştir.

Neocallimastix frontalis GMLF 66'ya ait ITS bölgesi dizilimi ile referans olarak kullanılan izolata ait ITS bölgesi dizilimleri karşılaştırıldığında (Şekil 1.12) oldukça fazla polimorfizm olduğu gözlemlenmiştir. Buna göre a ile gösterilen çerçeve içerisinde bu çalışmada kullanılan izolata ait ITS bölge diziliminde adenin (A) olarak görünen nükleotidin referans dizilimde karşılığının guanin (G) olarak değiştiği görülmüştür. Bu iki ITS dizilimindeki polimorfizm bölgelerinin çokluğunun nedeni olarak anaerobik gut funguslarının birden fazla ITS bölgesi içermesi olduğu düşünülmektedir (Özköse ve ark.2003). Referans ITS bölgesine ait dizilimde 91. nükleotid timin (T) olarak gözlemlenirken, bu çalışma için kullanılan *Neocallimastix frontalis* GMLF 66 izolatına ait ITS bölgesinde karşılığının olmadığı b ile gösterilen alanda görülmektedir.

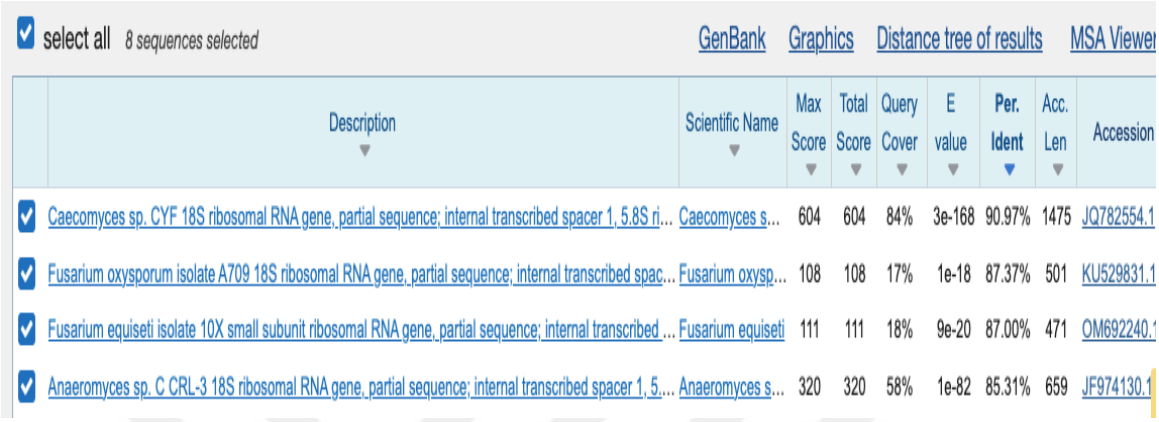


Şekil 4.12 NCBI veri tabanında Morfolojik olarak tanımlanan *Neocallimastix frontalis* GMLF 66 izolatına ait DNA dizisinin maksimum benzerlik gösterdiği *Neocallimastix frontalis* KF312488.1 referans numaralı örneğin DNA dizilerinin karılaştırılması sonucu elde edilen farklılıklar (Query: Çalışmada kullanılan DNA dizisi, Sbjct: referans alınan DNA dizisi)

4.1.3.3. *Caecomyces sp* GMLF 77

Dizi analizi sonuçlarına göre 580 baz çiftlik ITS gen bölgesine göre yapılan DNA dizileme işleminde 530 baz çiftlik bölge tanımlanmış ve nükleotid sayıları A=171, T=103, C= 96 ve G= 60 olarak belirlenirken G/C oranı %23 olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde Brownlee'nin (1989) yaptığı DNA dizi analizi sonucu *Neocallimastix sp* bireylerinin A/T oranın %87 'ye kadar çıkabildiği buna bağlı olarak G/C oranınında düşük olduğu belirlenmiştir. Genel olarak ITS bölgesinin A/T bakımından zengin olduğu bilinmektedir (Fliegerova ve ark., 2012). Yapılan çalışmalarda anaerobik gut funguslarının ITS bölge dizilimlerinde guanin ve sitozin miktarının %5-20 arasında olduğu gösterilmiştir (Brownlee, 1989). Bu çalışmada moleküler tanımlama için ITS bölgesi kullanılmış ve guanin sitozin oranlarının düşük olmasının önceki çalışmalar ile benzer olduğu belirlenmiştir. *Caecomyces sp* GMLF 77 fungal izolata ait DNA dizi analizi sonuçları NCBI veri tabanında benzerlik gösterdiği diziler belirlenmiştir (Şekil 4.13). Benzerlik oranları incellendiğinde en yüksek benzerlik oranı % 90 ile *Caecomyces sp* 'ye ait

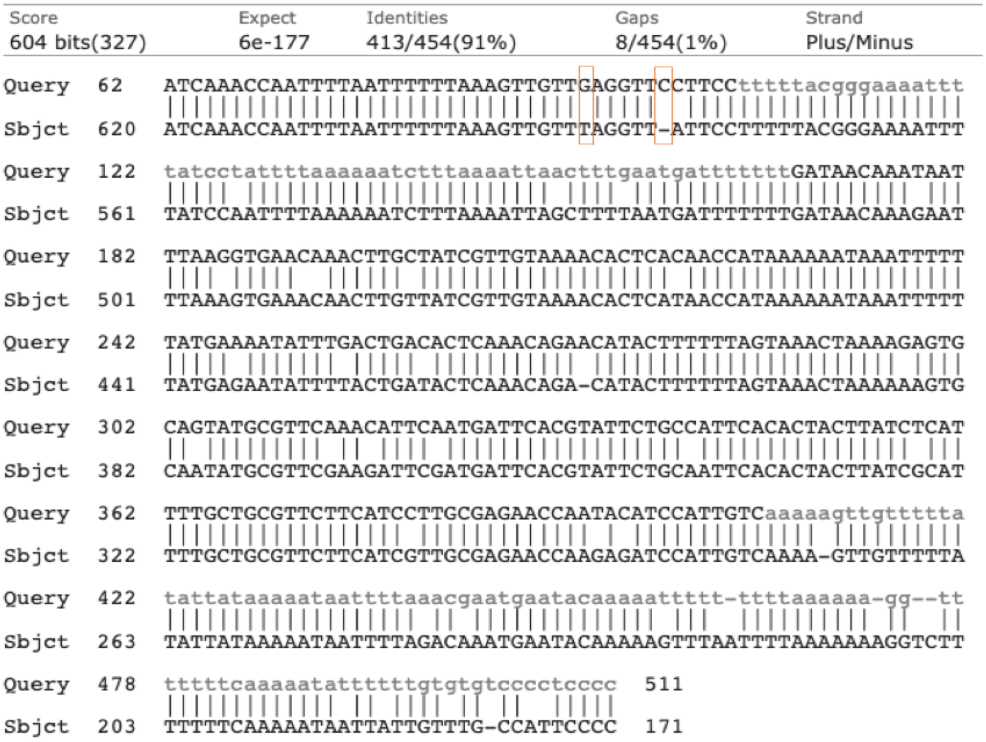
JQ782554.1 referans numaralı izolat ile eşleşmiştir. DNA dizilimine ait kromatogram verileri de dizilerin doğruluğunun tespiti amacı ile incelenmiş ve kontrolü sağlanmıştır. NCBI veri tabanında benzerlik gösteren izolat ile gerçekleştirilen karşılaştırma sonucu elde edilen polimorfizm ise Şekil 4.14'de gösterilmiştir.



select all 8 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Caecomyces sp. CYF 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ri...	Caecomyces s...	604	604	84%	3e-168	90.97%	1475	JQ782554.1
Fusarium oxysporum isolate A709 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac...	Fusarium oxysp...	108	108	17%	1e-18	87.37%	501	KU529831.1
Fusarium equiseti isolate 10X small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed ...	Fusarium equiseti	111	111	18%	9e-20	87.00%	471	OM692240.1
Anaeromyces sp. C CRL-3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5....	Anaeromyces s...	320	320	58%	1e-82	85.31%	659	JF974130.1

Şekil 4.13 *Caecomyces sp* GMLF 77'ye ait DNA dizilimi ile NCBI veri tabanında benzerlik gösteren DNA dizileri



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
604 bits(327)	6e-177	413/454(91%)	8/454(1%)	Plus/Minus

```
Query  62   ATCAAACCAATTTTAATTTTTTAAAGTTGTTGAGGTTCCTTCCttttacgggaaaattt  121
Sbjct  620  ATCAAACCAATTTTAATTTTTTAAAGTTGTTTAGGTT-ATTCCTTTTTACGGGAAAATTT  562

Query  122  tatcctattttaaaaaatctttaaaattaactttgaatgatttttttGATAACAAATAAT  181
Sbjct  561  TATCCAATTTTAAAAAATCTTTAAAATTAGCTTTTAATGATTTTTTTGATAACAAAGAAT  502

Query  182  TTAAGGTGAACAAACTTGCTATCGTTGTAAAACACTCACAACCATAAAAAATAAATTTTT  241
Sbjct  501  TTAAAGTGAAACAACTTGTTATCGTTGTAAAACACTCATAACCATAAAAAATAAATTTTT  442

Query  242  TATGAAAATATTTGACTGACACTCAAACAGAACATACTTTTTTAGTAAACTAAAAGAGTG  301
Sbjct  441  TATGAGAATATTTTACTGATACTCAAACAGA-CATACTTTTTTAGTAAACTAAAAAAGTG  383

Query  302  CAGTATGCGTTCAAACATTCAATGATTCACGTATTCTGCCATTCACACTACTTATCTCAT  361
Sbjct  382  CAATATGCGTTCGAAGATTCGATGATTCACGTATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCAT  323

Query  362  TTTGCTGCGTTCTTCATCCTTGCGAGAACCAATACATCCATTGTCaaaaagttgttttta  421
Sbjct  322  TTTGCTGCGTTCTTCATCGTTGCGAGAACCAAGAGATCCATTGTCAAAA-GTTGTTTTTA  264

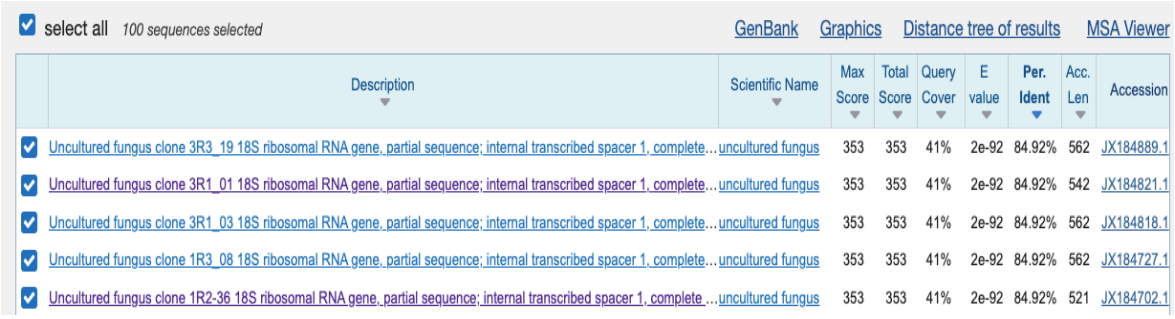
Query  422  tattataaaaataattttaaacgaatgaatacaaaaattttt-ttttaaaaaa-gg--tt  477
Sbjct  263  TATTATAAAAATAATTTTAGACAAATGAATACAAAAAGTTTAATTTTAAAAAAAGGTCTT  204

Query  478  tttttcaaaaatatttttttgtgtgtcccctcccc  511
Sbjct  203  TTTTTCAAAAATAATTATTGTTTG-CCATTCCCC  171
```

Şekil 4.14 DNA dizi analizi sonucu elde edilen *Caecomyces sp*. GMLF 77 izolatına ait ITS bölgesi (Query) ile NCBI veri tabanında en yüksek benzerlik gösteren *Caecomyces sp* CFY JQ782554.1 GenBank numaralı DNA dizilimlerinin karşılaştırılması (Sbjct)

4.1.3.4. *Feramyces sp* GMLF 90

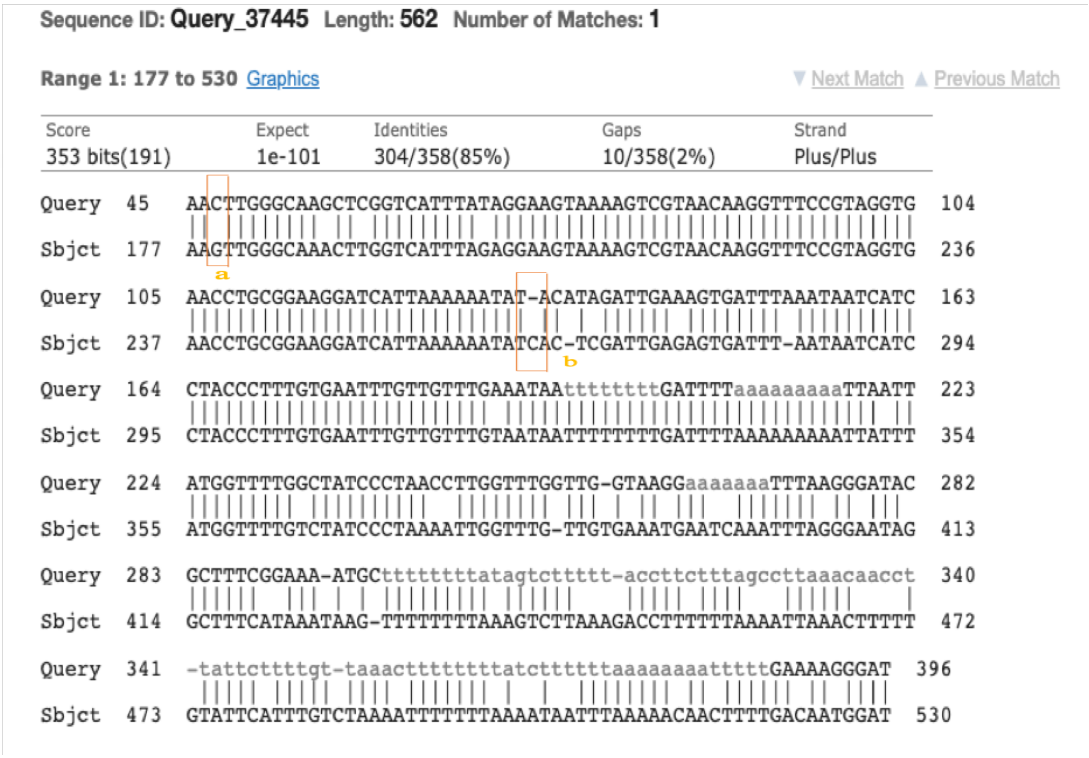
DNA izolasyonu sonucu elde edilen *Feramyces sp* GMLF 90 izolatına ait 799 baz çiftlik DNA dizisi elde edilmiş bu dizi içerisinde T= 299, A= 256, C= 124 ve G= 120 nükleotid sayılarına sahip olup G/C oranı % 30 oranında belirlenmiştir. Aynı zamanda DNA dizisi NCBI veri tabanında taranmıştır. İnceleme sonucu DNA dizilimi ile benzerlik gösteren diğer DNA dizileri Şekil 4.15 'de gösterilmiştir. Morfolojik tanımlamalara göre *Feramyces sp* olduğu düşünülen GMLF 90 için *Feramyces sp* cinsine ait ITS bölge dizileri ile diğer anaerobik gut fungusu cinslerine ait ITS bölge dizilerine göre filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Tanımlama yapılırken ITS bölgesi kullanıldığından polimorfizme açık bir bölge olması nedeni ile Gruninger ve ark., 2014) oluşturulan filogenetik ağaçlar putatif olarak oluşturulmaktadır (Nicholson ve ark., 2010). Fliegerova ve Kirk (2012) ITS bölgesinin anaerobik gut funguslarında çoğunlukla sınıflandırılamamış ve kültüre alınamamış örnekler için kullanıldığını göstermişlerdir bu tez çalışmasına ait *Feramyces sp* GMLF 92 izolatınında morfolojik verileri *Feramyces sp'*ye benzerken moleküler verileri kültüre alınmamış anaerobik gut fungusları ile eşleşerek bu görüşle uyuşmaktadır. Benzer şekilde Callagan ve ark. (2015)'nın morfolojik olarak *Piromyces sp*'ye benzeyen ancak moleküler olarak *Piromyces sp* ile uyuşmayan örneklerin bulunduğunu bildirmişlerdir. *Feramyces sp* GMLF 90 için benzerlik kültüre alınmamış anaerobik gut fungusları içerisinde benzerlik oranı en yüksek % 84 olan izolata ait referans numarası JX84889.1 şeklindedir. Bu da başka cinsler için aynı durumun söz konusu olabileceği düşüncesini doğurmaktadır. Olası dizileme hatalarından kaynaklı tanımlama eksikliklerinin olabileceği bilinmektedir. *Feramyces sp*. GMLF 90 izolatının moleküler verilere göre benzerlik gösterdiği anaerobik gut fungusuna ait ITS bölgelerine ait dizilerin karşılaştırılması Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Buna göre kare içerisine alınan alanlarda polimorfizm gerçekleştiği görülmektedir. Bu polimorfizmler bazı bölgelerde bir nükleotide karşılık gelen nükleotidin değişmesi (a) şeklinde gözlemlenirken bazı bölgelerde nükleotid diziliminin karşılığının olmadığı (b) gözlemlenmiştir.



select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Uncultured fungus clone 3R3_19 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete...	uncultured fungus	353	353	41%	2e-92	84.92%	562	JX184889.1
Uncultured fungus clone 3R1_01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete...	uncultured fungus	353	353	41%	2e-92	84.92%	542	JX184821.1
Uncultured fungus clone 3R1_03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete...	uncultured fungus	353	353	41%	2e-92	84.92%	562	JX184818.1
Uncultured fungus clone 1R3_08 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete...	uncultured fungus	353	353	41%	2e-92	84.92%	562	JX184727.1
Uncultured fungus clone 1R2-36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete...	uncultured fungus	353	353	41%	2e-92	84.92%	521	JX184702.1

Şekil 4.15 NCBI veri tabanında *Feramyces sp* GMLF 90'a ait dizilime benzerlik gösteren diğer dizilimler ve bu dizilimlere ait numaraları



Sequence ID: **Query_37445** Length: **562** Number of Matches: **1**

Range 1: 177 to 530 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
353 bits(191)	1e-101	304/358(85%)	10/358(2%)	Plus/Plus

```
Query  45   AACTTGGGCAAGCTCGGTCATTTATAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTG  104
Sbjct  177  AAGTTGGGCAAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTG  236

Query  105  AACCTGCGGAAGGATCATTAAAAAATAT-ACATAGATTGAAAGTGATTTAAATAATCATC  163
Sbjct  237  AACCTGCGGAAGGATCATTAAAAAATATCAC-TCGATTGAGAGTGATTT-AATAATCATC  294

Query  164  CTACCCTTTGTGAATTTGTTGTTTGAAATAAttttttttGATTTTaaaaaaaaaTTAATT  223
Sbjct  295  CTACCCTTTGTGAATTTGTTGTTTGTAATAATTTTTTTTGATTTTAAAAAAAAATTATTT  354

Query  224  ATGGTTTTGGCTATCCCTAACCTTGGTTTGGTTG-GTAAGGaaaaaaaTTTAAGGGATAC  282
Sbjct  355  ATGGTTTTGTCTATCCCTAAAATTGGTTTG-TTGTGAAATGAATCAAATTTAGGGAATAG  413

Query  283  GCTTTCGGAAA-ATGCttttttttatagtcttttt-accttctttagccttaaacaacct  340
Sbjct  414  GCTTTCATAAATAAG-TTTTTTTTAAAGTCTTAAAGACCTTTTTTAAAATTAAACTTTTT  472

Query  341  -tattcttttgt-taaacttttttttatcttttttaaaaaaaattttttGAAAAGGGAT  396
Sbjct  473  GTATTCATTTGTCTAAAATTTTTTTAAAATAATTTAAAAACAACTTTTGACAATGGAT  530
```

Şekil 4.16 *Feramyces sp* GMLF 90 izolatına ait ITS bölgesine en yüksek benzerlik gösteren referans izolata iat ITS bölgesinin BLAST yöntemi ile karşılaştırılması (Query: örneğe ait DNA, Sbjct: referans DNA)

4.1.3.5. *Neocallimastix sp* GMLF 92

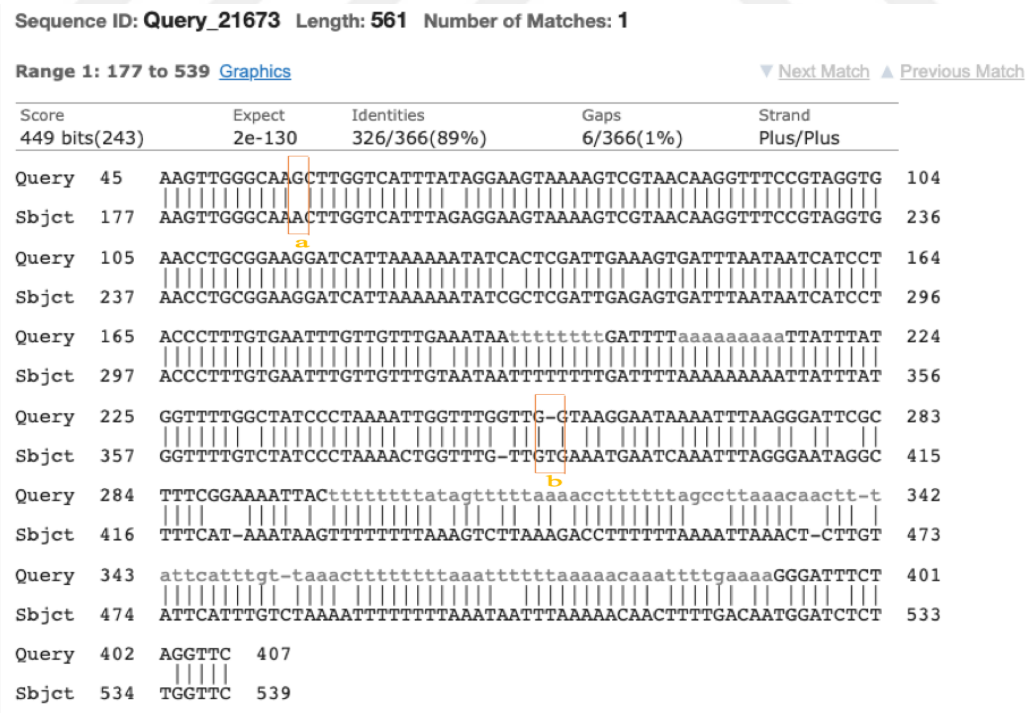
DNA izolasyonları sonucu elde edilen DNA'lara gerçekleştirilen dizileme analizi sonucu 832 baz çiftinden oluşan dizi içerisindeki nükleotid sayıları C=126, A=271, G=132, T=303 olarak belirlenmiştir. G/C oranı tüm dizi içerisinde % 31 oranında hesaplanmıştır. Aynı zmanda GMLF 92 izolatının nükleotid dizisi BLAST yöntemi ile NCBI veri tabanındaki diziler ile benzerliklerinin ve farklılıklarının belirlenmesi amacı ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.17). Dizilimlerin benzerlik oranının en yüksek %89 olarak JX184879.1 NCBI referans numaralı izolat olduğu gösterilmiştir. Benzer oldukları

düşünülen referans izolat ITS bölgesi ile morfolojik olarak *Neocallimastix sp* olduğu belirlenen GMLF 92 'ye ait ITS bölgesinin karşılaştırılması ise Şekil 4.18'de gösterilmiştir.

Neocallimastix sp GMLF 92 izolatının DNA dizilimi referans izolat DNA dizilimi ile karşılaştırıldığında bazı bölgelerde nükleotid değişimlerinin olduğu Şekil 4.18'de çerçeve (a) içerisine alınmıştır görülmüştür. Yine aynı dizi içerisinde referans izolatın DNA diziliminde bulunan ancak çalışmada kullanılan izolata ait DNA diziliminde karşılığı olmayan bölgelere de rastlanmış çerçeve (b) ile gösterilmiştir. Bu bölgelerde gözlemlenen değişimler ITS bölgesinin mutasyona açık bir bölge olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Brookman ve ark. 2000).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Uncultured fungus clone 3R2_48 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complet...	uncultured fungus	449	449	45%	3e-121	89.07%	561	JX184879.1
Uncultured fungus clone 3R1_01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complet...	uncultured fungus	449	449	45%	3e-121	89.07%	542	JX184821.1
Uncultured fungus clone 3R1_03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complet...	uncultured fungus	449	449	45%	3e-121	89.07%	562	JX184818.1
Uncultured fungus clone 1R2-36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complet...	uncultured fungus	449	449	45%	3e-121	89.07%	521	JX184702.1
Uncultured fungus clone 1R2-20 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complet...	uncultured fungus	449	449	45%	3e-121	89.07%	521	JX184692.1
Uncultured fungus clone 1F1-36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete...	uncultured fungus	449	449	45%	3e-121	89.07%	561	JX184437.1
Uncultured fungus clone 1F1-32 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete...	uncultured fungus	449	449	45%	3e-121	89.07%	562	JX184429.1

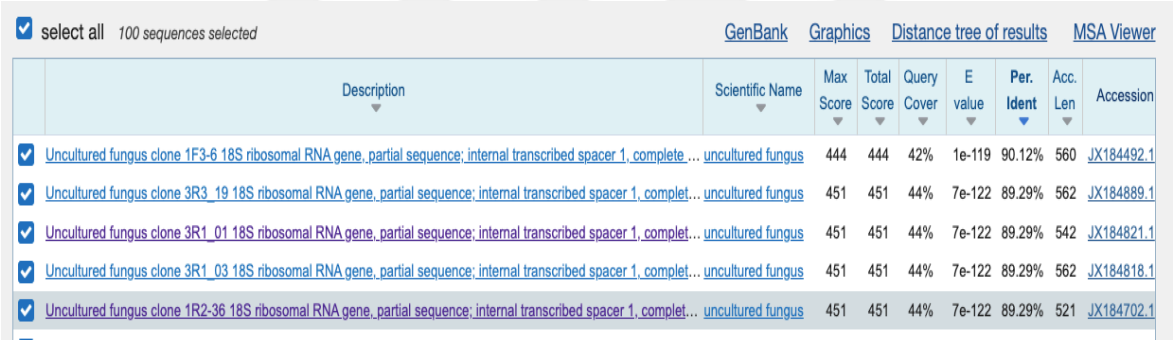
Şekil 4.17 *Neocallimastix sp* GMLF 92 izolatının DNA diziliminin NCBI veri tabanında taranması sonucu elde edilen benzerlik oranları



Şekil 4.18 *Neocallimastix sp* GMLF 92 izolatına ait ITS bölgesinin en yakın benzerlik gösteren referans izolata ait ITS bölgesi ile karşılaştırması

4.1.3.6. *Feramyces sp.* GMLF 113

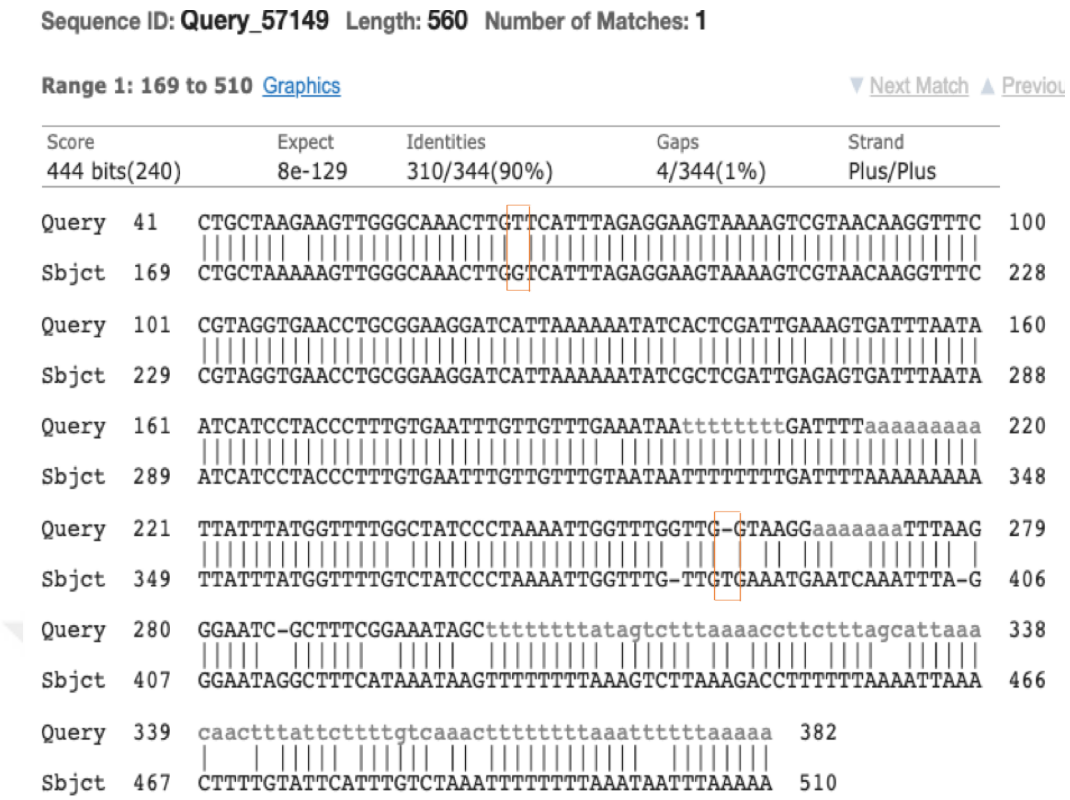
Nükleotid dizilimi belirlenen ITS gen bölgesine göre yapılan DNA izolasyonu sonrasında DNA dizilime analizi gerçekleştirilmiş ve 846 baz çiftlik bölge elde edilmiştir. Bu bölge içerisinde nükleotid sayıları A=275, T=313, G=134 ve C= 124 olarak belirlenmiştir. G/C oranı % 30 olarak hesaplanmıştır. Dizilemesi belirleen GMFL 113 'e ait ITS gen bölgesi dizileri daha önceden belirlenen benzer dizilerdeki farklılıklarla karşılaştırılması adına NCBI veri tabanında BLAST yöntemi ile araştırılmıştır. Buna göre *Feramyces sp.* GMLF 113 izolatı ile veri tabanında yer alan uncultured fungus JX184492.1 referans numaralı izolatın %90 oranında eşleştiği belirlenmiştir (Şekil 4.19). *Feramyces sp* GMLF 113 izolatı ile referans izolatın ITS bölgelerinin dizileri Şekil 4.20'de gösterilmiştir. Bu karşılaştırmada çalışmada kullanılan izolat ile referans izolatın nükleotidlerinde değişiklikler gerçekleştiği çerçeve içerisine alınarak gösterilmiştir. *Feramyces sp* GMLF 113 2 ait 27. nükleotid timin (T) olurken referans izolattaki karşılığı guanin (G) olarak değişmiştir. Bunun yanısıra referans izolatın DNA diziliminde bulunan bir nükleotidin GMLF 113 izolatına ait DNA diziliminde olmadığı da gözlemlenmiştir.



select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results | MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Uncultured fungus clone 1F3-6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete ...	uncultured fungus	444	444	42%	1e-119	90.12%	560	JX184492.1
Uncultured fungus clone 3R3_19 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complet...	uncultured fungus	451	451	44%	7e-122	89.29%	562	JX184889.1
Uncultured fungus clone 3R1_01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complet...	uncultured fungus	451	451	44%	7e-122	89.29%	542	JX184821.1
Uncultured fungus clone 3R1_03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complet...	uncultured fungus	451	451	44%	7e-122	89.29%	562	JX184818.1
Uncultured fungus clone 1R2-36 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complet...	uncultured fungus	451	451	44%	7e-122	89.29%	521	JX184702.1

Şekil 4.19 *Feramyces sp.* GMLF 113 izolatının NCBI veri tabanındaki benzerlik oranları

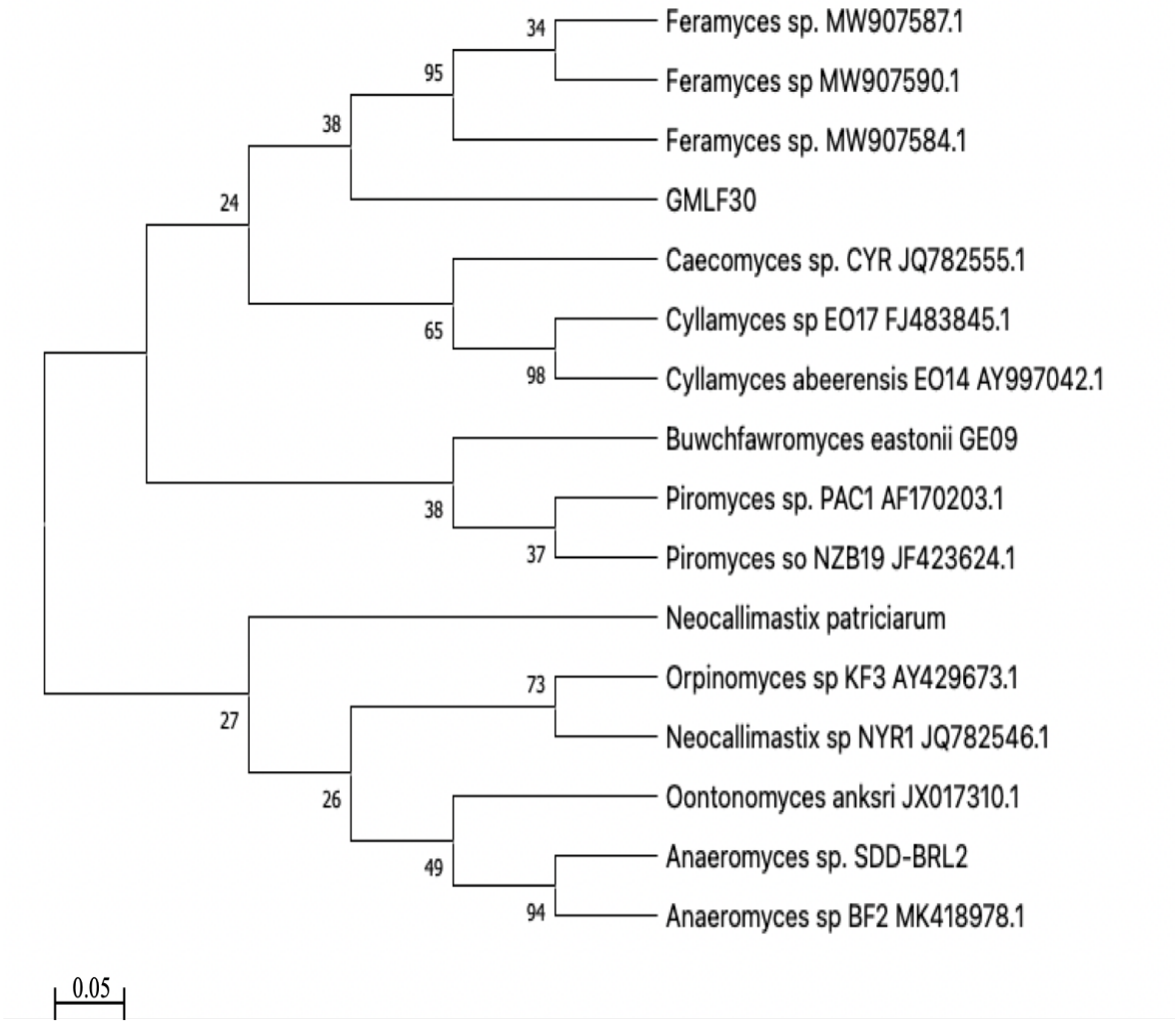


Şekil 4.20 *Feramyces sp.* GMLF 113 numaralı izolatına ait DNA dizisine (Query) maksimum benzerlik gösteren referans izolata ait DNA dizisi ile karşılaştırılması (Sbjct)

4.1.4. AGF İzolatlarının Filogenetik Yerlerinin Belirlenmesi

Fungal DNA izolatlarından olan morfolojik olarak tanımlanan *Feramyces sp.* GMLF 30'a ait ITS bölgesi ile NCBI veri tabanında kayıtlı *Feramyces sp* 'ye ait ITS bölgeleri ve anaerobik gut fungus cinslerine ait kayıt altına alınmış (NCBI) ITS bölgeleri filogenetik yerlerinin belirlenmesi için MEGA 11 paket programında NJ metodunda dendogramları oluşturulmuştur. NCBI çevirim içi veri tabanından elde edilen *Feramyces sp* MW907587.1, MW907590.1 ve MW907584.1 referans numarasına sahip izolatlara ait ITS bölgeleri ile *Feramyces sp* GMLF 30' e ait ITS bölgesi aynı kökten ayrılmışlardır. Morfolojik ve moleküler tanımlama ile *Feramyces sp* olduğu söylenebilmektedir. Filogenetik ağaç incelendiğine *Feramyces sp* GMLF 30'un diğer anaerobik gut funguslarından ayrıldığı da görülmektedir. *Feramyces sp* MW907590.1 referans numaralı fungal izolatlara ait diziler NJ (neigbor-joining) metoduna ve Bootsrapt Value 500 olarak oluşturulan filogenetik ağaç üzerinde aynı grup içerisinde yer alırken *Feramyces sp.* GMLF 30 izolatına ait diziler bu izolatlardan farklı olarak ayrı bir kolda yer aldığı görülmüştür (Şekil 4.21). İzolatlara ait ITS gen bölgelerinin hizalanmaları sonucu karşılaştırılan bölge uzunlukları 259 baz çiftlik bir bölgeyi kapsamaktadır. Bu gen

bölgelerin maksimum benzerliklerinden yararlanılarak filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. *Feramyces sp* cinsine ait Fliegerova ve ark. (2021) GenBank kayıtlarındaki diziler ile karşılaştırılmış ve filogenetik ağaç üzerinde ayrı kollarda olduğu görülmüştür.



Şekil 4.21 *Feramyces sp.* GMLF 30 fungal izolatına ait ITS DNA dizisinin diğer diziler ile olan akrabalık derecelerinin Filogenetik ağaç dendogramları üzerinde gösterilmesi

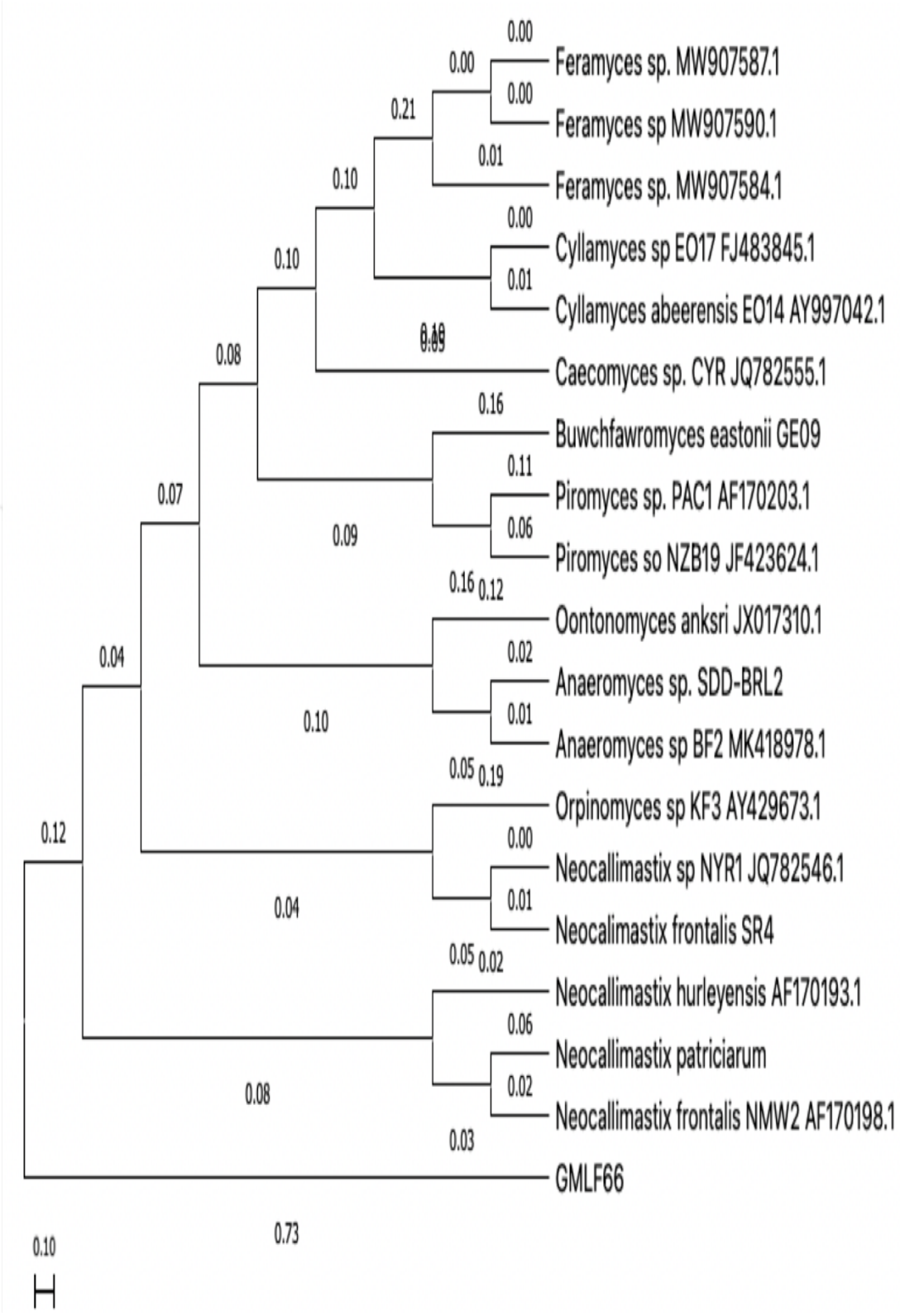
Filogenetik ağaçlandırmanın şekillendirilmesinde kullanılan MEGA 11 paket programında Bootsrapt değerinin 500 olarak ayarlandığı ve NJ maksimum benzerlik seçilerek Morfolojik olarak tanımlanan *Neocallimastix frontalis* GMLF 66 izolatı için ağaç oluşturulmuştur (Şekil 4.22). MEGA 11 paket programında diğer diziler ile hizalama yapılmış ve bu hizalama sonucu 328 baz çiftlik bir bölgeye göre filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu ağaç dendogramlarından *Neocallimastix frontalis* GMLF 66 izolatına ait olan kolun ITS dizilerine göre NCBI Blast metodu kullanılarak elde edilen veri tabanında kayıtlı diğer diziler ile farklı olduğu görülmüştür. *Neocallimastix frontalis* SY4,

Neocallimastix patriciarum, *Neocallimastix hurleyensis* vekayıt numarası AF170198.1 *Neocallimastix sp*'ye ait bireyler ile *Neocallimastix frontalis* ile maksimum benzerlik gösteren GMLF 66 izolatı farklı kollarda yer almaktadır. Ana kökten ayrılan ilk kol olan morfolojik olarak tanımlanan *Neocallimastix frontalis* GMLF 66 diğer tüm dizilerden ayrılmakta ve benzerlik göstermemektedir. Veri tabanında kayıtlı olan diğer anaerobik gut fungus cinsleri ile ayrı kollarda olmaları nedeni ile *Neocallimastix frontalis* GMLF 66 izolatının moleküler olarak bu dizilerden önemli derecede ayrıldığı öngörülmektedir.

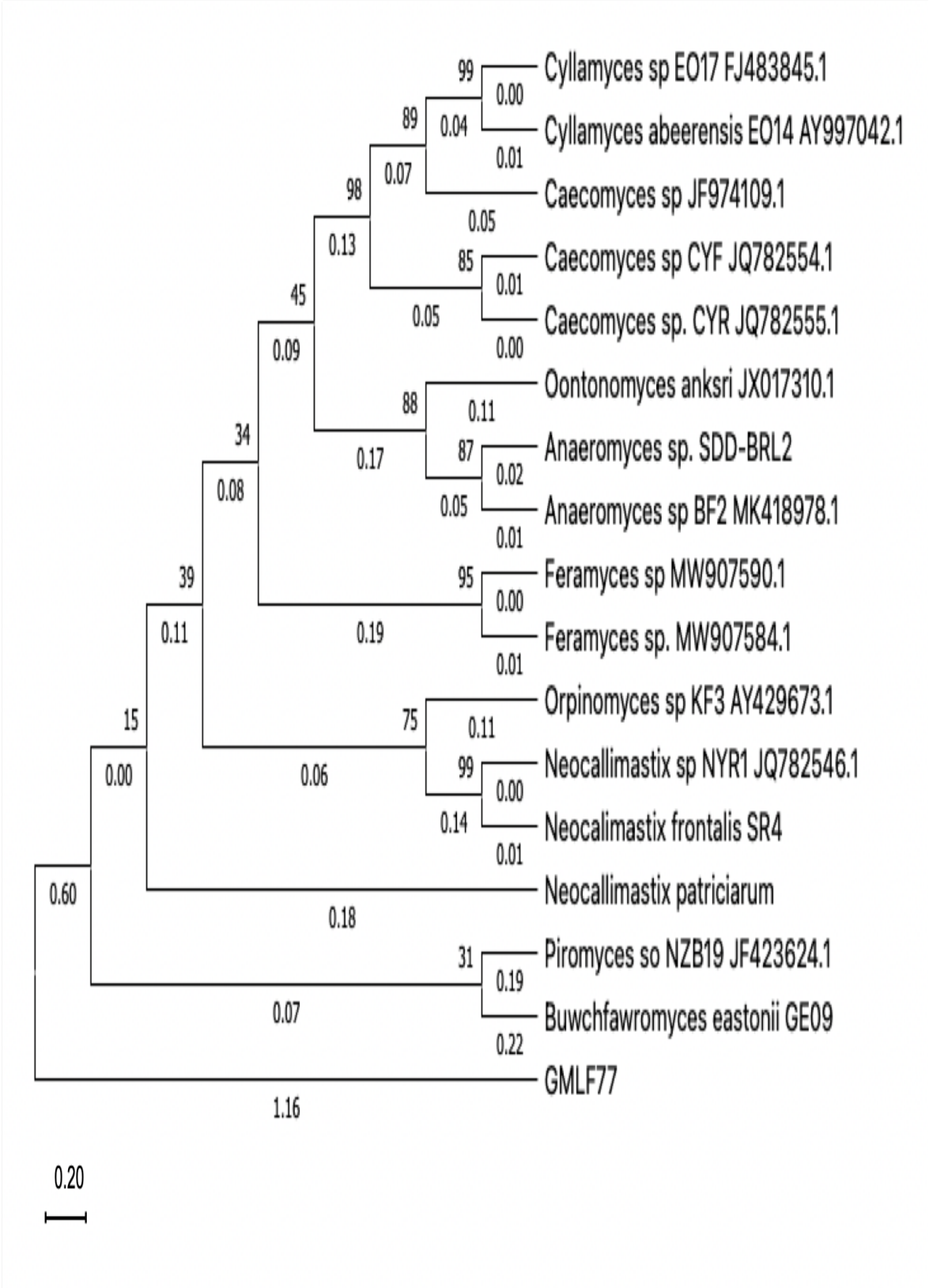
Yapılan filogenetik ağaçlandırmada *Neocallimastix sp'*ye ait bireyler Brookman ve ark. (2000)'de yaptığı çalışmadaki ile benzerlik göstermektedir. Bu cinslere ait bireyler diğer cinslere benzerlik göstermekte ancak ayrı bir kolda yer almaktadırlar.

Fungal izolat *Caecomyces sp* GMLF 77 ye ait ITS gen bölgesi GenBank kayıtlarından temin edilen *Neocallimastix frontalis, Neocallimastix hurleyensis, Neocallimastix patriciarum*, *Cyllamyces sp* EO17, *Cyllamyces sp* EO14, *Caecomyces sp* CFR, *Caecomyces sp* CYF, *Oontonomyces* sp, *Anaeromyces* sp, *Orpinomyces* sp ve *Feramyces* sp'ye ait ITS bölgeleri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.23). Filogenetik ağaç Boostsrapt 500 tekrarda gerçekleştirilmiştir. ITS bölgesi dizisinin BLAST yöntemi ile GenBankta taranması sonucu elde edilen dizilerine ait filogenetik ağaç kolları birbirinden farklıdır. Morfolojik olarak *Caecomyces sp*. GMLF 77 tanımlanan ve moleküler verilere göre de *Caecomyces sp* ile maksimum benzerlik gösteren izolatın filogenetik ağaçta tüm izolatlardan ayrı kolda yer alması tanımlamadaki yerinin tespiti açısından net bir bilgi içermemektedir.

Chen ve ark. (2003), küresel rizodial yapıya sahip *Caecomyces sympodialis* W101 izolatının anaerobik gut fungus cinslerinden *Neocallimastix sp, Piromyces sp*, *Anaeromyces sp* gibi cinsleri ile birlikte oluşturduğu filogenetik ağaçlandırmada farklı kollarda bulunduğunu belirtmiştir. *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatının da benzer şekilde *Neocallimastix sp* cinsine ait iki bireyden de ayrıldığı görülmüştür.

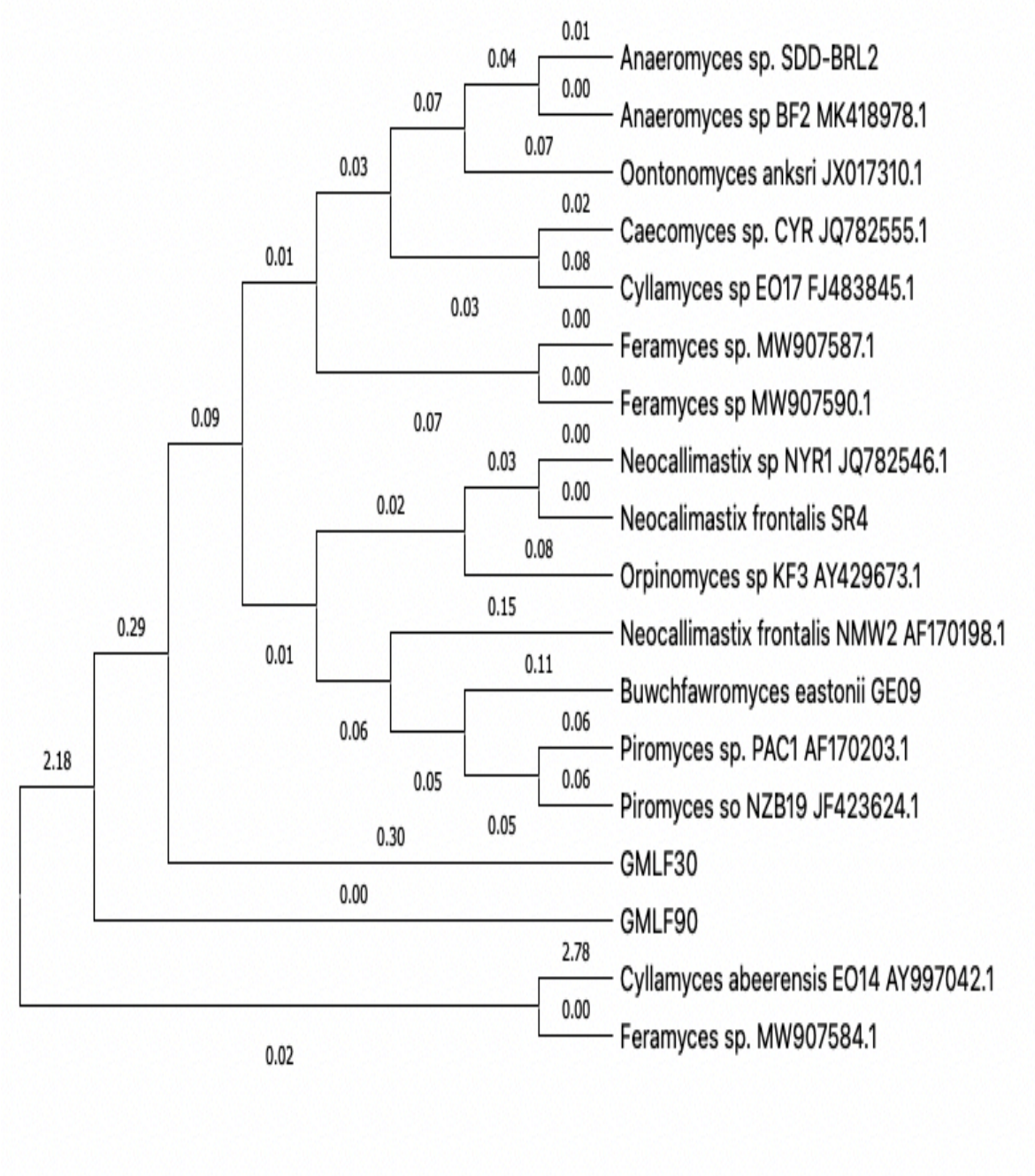


Şekil 4.22 *Neocallimastix* GMLF 66 fungal izolatının ITS DNA dizisi ile benzerlik gösteren diğer diziler arasındaki akrabalık derecelerinin Filogenetik ağaç görseli ile dendogramları üzerinde gösterilmesi



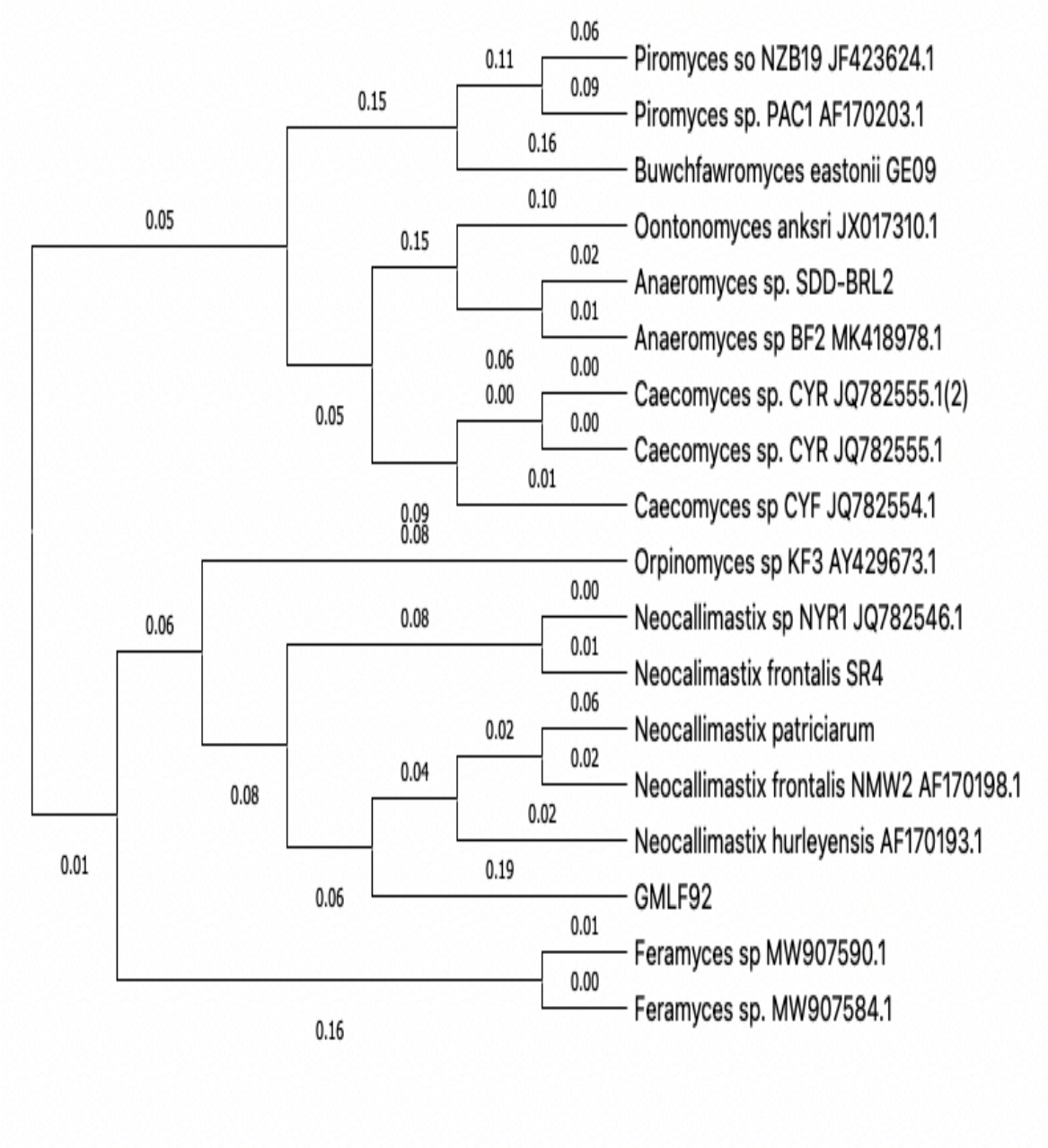
Şekil 4.23. Kullanılan Fungal izolatlarından *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatına ait ITS DNA dizileri ile diğer diziler ile arasındaki akrabalık derecelerinin Filogenetik ağaç görseli ve dendogramları üzerinde gösterilmesi

NCBI veri tabanında *Neocallimastix frontalis*, *Neocallimastix hurleyensis, Anaeromyces sp, Oontonomyces sp, Orpinomyces sp, Caecomyces sp* gibi anaerobik fungus cinslerine ait ITS dizileri ile *Feramyces sp* GMLF 90 izolatına ait ITS dizisi benzerlikleri filogenetik ağaçta gösterilmiştir (Şekil 4.24). Buna göre *Feramyces sp* GMLF 90 diğer tüm cinslerden farklı bir kolda görülmektedir.



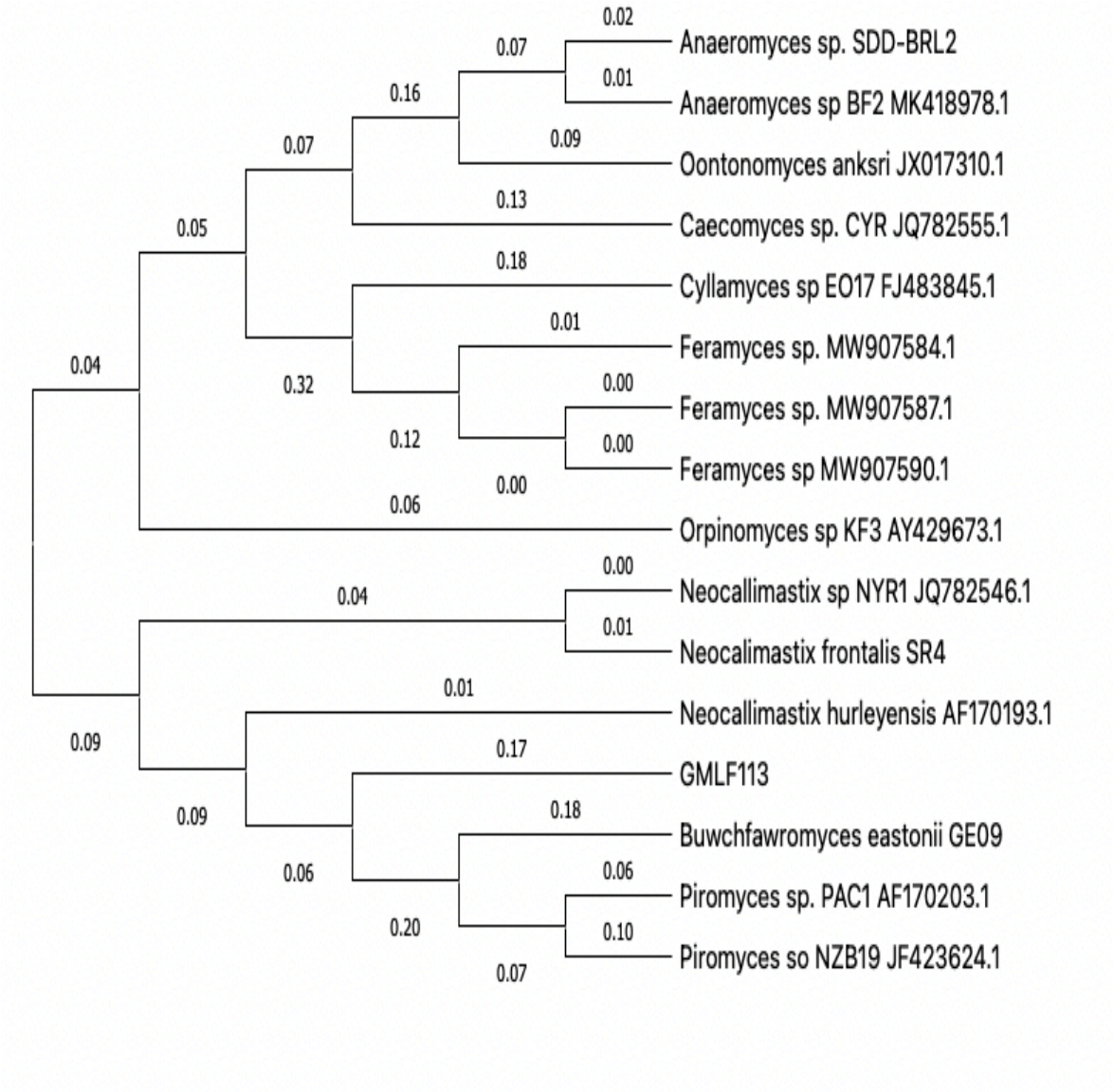
Şekil 4.24 Kullanılan Fungal izolatlardan *Feramyces s*p. GMLF 90 izolatına ait ITS DNA dizileri ile benzer izolatlar arasındaki akrabalık derecelerinin Filogenetik ağaç görseli ile dendogramları üzerinde gösterilmesi

NCBI veri tabanında kayıtlı cins düzeyinde tanımlaması yapılmış ITS bölgelerine göre çalışmada kullanılan fungal izolatlardan *Neocallimastix sp.* GMLF 92 izolatı *Neocallimastix sp* ile maksimum benzerlik göstermiştir. Buna göre bu diziye en fazla benzerlik gösteren ITS bölgelerine ait dizilerden cins düzeyinde tanımlaması yapılmış fungal izolatlar ile ayrı kollarda oldukları görülmektedir (Şekil 4.25). *Neocallimastix sp* GMLF92 izolatı ise diğer *Neocallimasitix sp* bireylerine ait ITS bölgeleri ile tek kök üzerinde ayrı kollarda yer almıştır.



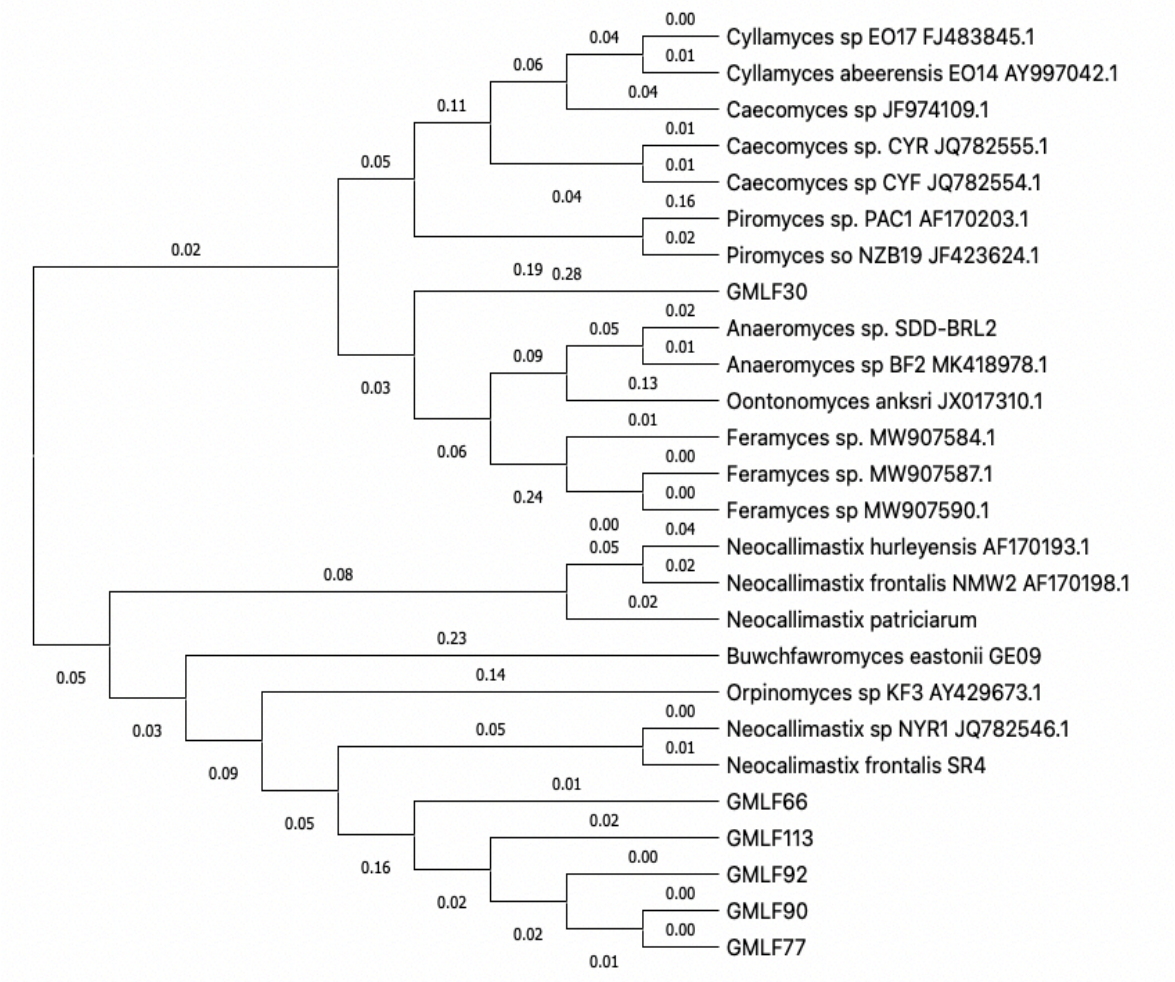
Şekil 4.25 Kullanılan Fungal izolatlardan *Neocallimastix sp* GMLF 92 izolatına ait ITS DNA dizileri ile diğer cinsler arasındaki akrabalık derecelerinin Filogenetik ağaç görseli ile dendogramları üzerinde gösterilmesi

Feramyces sp GMLF 113 izolatı ile anaerobik gut cins ve türlerine ait ITS bölgesine ait diziler Mega 11 paket programı ile 500 tekrarlı NJ metoduna göre hizalanarak filogenetik ağaçları oluşturulmuştur. Oluşan filogenetik ağaç incelendiğinde iki kolun tek bir kökten ayrıldığı görülmektedir. Kökten oluşan iki kolun kendi içerisinde dallandığı ve bu dallar içerisinde morfolojik olarak *Feramyces sp* olduğu düşünülen GMLF 113'ün *Feramyces sp*'ye ait bireylerden ayrı kollarda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.26). Farklı kollarda yer almasının *Feramyces sp*. cinsleri içerisindeki polimorfizmden kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer şekilde *Neocallimastix sp* bireyleride farklı kollarda yer alabilmektedir.



Şekil 4.26 *Feramyces sp* GMLF 113 izolatının ITS DNA dizileri ile diğer benzer izolatlar ile arasındaki akrabalık derecelerinin Filogenetik ağaç görseli ile dendogramları üzerinde gösterilmesi

ITS bölgesi dizileri kayıt altına alınan cinsler ile bu çalışmaya ait izolatların ITS bölgesi dizileri MEGA 11 programı ile hizalanmış ve 345 baz çiftlik bölgelerin akrabalık derecelerinin belirlenmesi amacı ile filogenetik ağaçları NJ (Neighbot-Joining) metodu Boostrap 500 değerine göre oluşturulmuştur. Buna göre oluşturulan ağaçta bir kök üzerinden ana iki dal oluşmuş ve bu dallardaki dendogramlarda kendi aralarında dallar oluşturmuştur (Şekil 4.27). Bu çalışmada kullanılan fungal izolatlar içerisindeki GMLF 113, GMLF 92, GMLF 90, GMLF 77 ve GMLF 66 aynı kol içerisinde yer alırken GMLF 30 bu izolatlardan farklı bir dendogramda yer almıştır. GMLF 66 izolatı ile aynı kola bağlı olan GMLF 77 ve GMLF 92 izolatları da GMLF 66 ve GMLF 113 den farklı bulunmuş ancak kendi içlerinde benzer bulunmuşlardır. Fungal izolat GMLF 77 küresel rizodial yapıdaki funguslardan olmasına rağmen bu yapıdaki GenBankta yer alan *Caecomyces sp* ITS dizileri ile aynı dalda yer almamıştır.



Şekil 4.27 Kullanılan Fungal izolatların ITS DNA dizileri ile diğer cinsler arasındaki akrabalık derecelerinin Filogenetik ağaç görseli ile dendogramları üzerinde gösterilmesi

4.2. AGF'lerin Uzun Süreli Muhafaza Yöntemine Göre Gelişim Oranları

Anaerobik gut fungusları için optimum muhafaza koşullarının belirlenebilmesi için *Caecomyces* GMLF 77 izolatı ve *Orpinomyces sp* GMLF 18 izolatı seçilmiştir. Seçilen *Caecomyces* GMLF 77 ve *Orpinomyces* GMLF 18 %1 agar içeren ve enerji kaynağı olarak ksiloz kullanılmış olan besi yerine, ekimler yapılmış 39℃'de GMLF 77 izolatı için 48 saat sonra koloni gelişimi gözlemlenmiş, GMLF 18 için daha hızlı bir gelişim söz konusu olmuş ve 24 saatin sonunda koloni gelişimi gözlemlenmiştir. Bu durum aynı şekilde izolatların eğik agar içerisinde kültüre alındıklarında da gözlemlenmiştir.

Muhafaza süresi 24 saat olan direk -80 ℃ de bekletilen GMLF 18' e ait 1 ml glikozlu besi yerine ekim yapıldıktan sonra 39℃'de inkübe edilen tüplerden 48 saat sonra gaz çıkışı olduğu gözlemlendiğinde canlılık olduğu düşünülerek ışık mikroskobu altında incelenmiş ve canlılık gözlemlenmiştir. Aynı şekilde GMLF 77 'nin bulunduğu tüpler içerisinden eğik agara ekim yapılan örnekler – 80 ℃ den 24 saat sonra çıkarılmış ve alt kültüre alınmış olan tüplerde ise 4 gün sonra canlılık gözlemlenmiştir. Muhafaza süresi olarak 24 saat boyunca – 80℃'de bekletilen GMLF 18 ve GMLF 77 48 saatlik inkübasyon sonrasında mikroskop altında incelenmiştir.

Eğik agar tekniği ile muhafaza sonuçları incelendiğinde, hiç bir ön işlem uygulanmadan -196 ^{0}C 'de ilk hafta GMLF 77 ve GMLF 18 numaralı örneklere ait aktifleşme yüzdeleri sırası ile %67 ve %100 olarak gözlemlenmiştir. Diğer yandan ön muamelesiz -20 ^{0}C ve -80 ^{0}C'de aynı süre içerisinde muhafaza edilen GMLF 77 izolatında aklifleşme/canlılık görülmemiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Eğik agar yöntemi kullanılarak 1 haftalık süre boyunca muhafaza edildikten sonra aktifleştirilen GMLF 77 ve GMLF 18 'ye ait enerji kaynağı olarak glikoz bulunan besi yerlerindeki yaşamsal faaliyetlerinin gösterilmesi (+; besiyerlerinde aktifleşme gözlemlenmiştir, - ; besiyerlerinde aktifleşme gözlemlenmemiştir).

EĞİK AGAR	GMLF 18						GMLF 77					
1 Haftalık Saklama	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp
Doğrudan -20 °C	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doğrudan -80 °C	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Doğrudan -196 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
-20 °C'den -80 °C'ye	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-80 °C'den -196 °C' ye	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
-20 °C'den -196 °C'ye	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
-20 °C -80 °C ve -196 °C 'ye	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Muhafaza süresinin 2. haftasındaki gelişimler incelendiğinde ön muamelesiz -20 ℃' de muhafaza edilen GMMLF 77 ve GMLF 18 ' ye ait örneklerin hiçbir tekerrüründe canlılık gözlemlenmezken, ön muamelesiz -196℃' de muhafaza edilen her iki örnek için kullanılan 6 karyoviyal tüplerinden yapılan aktifleştirme sonucunda gelişim gözlemenmiştir. Ön muamelesiz -20 ℃' de 2 hafta süre ile muhafaza edilen her iki izolat için aktifleşme gözlemlenmezken ön muamelesiz -196℃ muhafaza edilen GMLF 77 izolatına ait aktifleşme yüzdesinin % 50, GMLF 18 izolatında ise %66 olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Eğik agar yöntemi kullanılarak 2 haftalık süre boyunca muhafaza edildikten sonra aktifleştirilen GMLF 77 ve GMLF 18 'ye ait enerji kaynağı olarak glikoz bulunan besi yerlerindeki yaşamsal faaliyetlerinin gösterilmesi (+; besiyerlerinde aktifleşme gözlemlenmiştir, - ; besi yerlerinde aktifleşme gözlemlenmemiştir).

EĞİK AGAR	GMLF 18						GMLF 77					
2 Haftalık Saklama	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp
Doğrudan -20 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doğrudan -80 °C	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Doğrudan -196 °C	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
-20 °C'den -80 °C'ye	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-80 °C'den -196 °C' ye	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-20 °C'den -196 °C'ye	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-20 °C -80 °C ve -196 °C 'ye	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Eğik agar yöntemi ile yapılan 3 haftalık muhafaza süresinin sonunda GMLF 77 izolatının aktifleşme oranı diğer haftalarla karşılaştırıldığında –80 ^{0}C de arttığı ancak diğer parametrelerde değişiklik gözlenmediği görülmüştür (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Eğik agar yöntemi kullanılarak 3 haftalık süre boyunca muhafaza edildikten sonra aktifleştirilen GMLF 77 ve GMLF 18 'ye ait enerji kaynağı olarak glikoz bulunan besi yerlerindeki yaşamsal faaliyetlerinin gösterilmesi (+; besiyerlerinde aktifleşme gözlemlenmiştir, - ; besi yerlerinde aktifleşme gözlemlenmemiştir).

EĞİK AGAR	GMLF 18						GMLF 77					
3 Haftalık Saklama	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp
Doğrudan -20 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doğrudan -80 °C	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Doğrudan -196 °C	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
-20 °C'den -80 °C'ye	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-80 °C'den -196 °C' ye	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
-20 °C'den -196 °C'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-20 °C -80 °C ve -196 °C 'ye	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

GMLF 18 ve GMLF 77 numaralı örneklere ait belirli sıcaklıklardaki 1 aylık muhafaza sonucu canlanmaları incelendiğinde ise 3 haftalık muhafaza sonucu ile paralel seyrettiği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 Eğik agar yöntemi kullanılarak 4 haftalık süre boyunca muhafaza edildikten sonra aktifleştirilen GMLF 77 ve GMLF 18 'ye ait enerji kaynağı olarak glikoz bulunan besi yerlerindeki yaşamsal faaliyetlerinin gösterilmesi (+; besiyerlerinde aktifleşme gözlemlenmiştir, - ; besi yerlerinde aktifleşme gözlemlenmemiştir).

EĞİK AGAR	GMLF 18						GMLF 77					
4 Haftalık Saklama	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp
Doğrudan -20 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doğrudan -80 °C	+	+	+	-	-	-	+	+		-	-	-
Doğrudan -196 °C	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
-20 °C'den -80 °C'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-80 °C'den -196 °C' ye	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
-20 °C'den -196 °C'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-20 °C -80 °C ve -196 °C 'ye	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Stok kültür çalışmasına ait GMLF 18 ve GMLF 77 için 3 aylık süre sonunda stoktan canlandırma sonuçlarının 1. ay sonundaki canlılık oranları ile benzer olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 Eğik agar yöntemi kullanılarak 3 aylık süre boyunca muhafaza edildikten sonra aktifleştirilen GMLF 77 ve GMLF 18 'ye ait enerji kaynağı olarak glikoz bulunan besi yerlerindeki yaşamsal faaliyetlerinin gösterilmesi (+; besiyerlerinde aktifleşme gözlemlenmiştir, - ; besi yerlerinde aktifleşme gözlemlenmemiştir).

EĞİK AGAR	GMLF 18						GMLF 77					
3 Aylık Saklama	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp
Doğrudan -20 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doğrudan -80 °C	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Doğrudan -196 °C	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
-20 °C'den -80 °C'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-80 °C'den -196 °C' ye	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
-20 °C'den -196 °C'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-20 °C -80 °C ve -196 °C 'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Eğik agarda 6 ay muhafaza koşulu sonunda en yüksek aktiflik oranı GMLF 77 ve GMLF 18 izolatları için sırası ile yüzde olarak %67 ve %84 ile ön muamele uygulanmadan -196 °C ′de muhafaza edilen ve %15 gliserol içeren kriyoviyallerde gözlemlenmiştir. En düşük aktifleşme oranları ise 2. hafta itibari ile her 2 izolat için % 0 olarak ön muamele uygulanmadan -20 °C'de muhafaza edilen karyoviyallerde gözlemlenmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 Eğik agar yöntemi kullanılarak 6 aylık süre boyunca muhafaza edildikten sonra aktifleştirilen GMLF 77 ve GMLF 18 'ye ait enerji kaynağı olarak glikoz bulunan besi yerlerindeki yaşamsal faaliyetlerinin gösterilmesi (+; besiyerlerinde aktifleşme gözlemlenmiştir, - ; besi yerlerinde aktifleşme gözlemlenmemiştir)

EĞİK AGAR	GMLF 18						GMLF 77					
6 Aylık Saklama	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp
Doğrudan -20 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doğrudan -80 °C	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Doğrudan -196 °C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
-20 °C'den -80 °C'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-80 °C'den -196 °C' ye	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-20 °C'den -196 °C'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-20 °C -80 °C ve -196 °C 'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Muhafaza yöntemlerinden Roll agar yöntemi ile 1 hafta süre ile muhafaza edilen izolatlara ait bulgular eğik agar yönteminde de gözlemlendiği gibi GMLF 77 izolat için ön muamele uygulanmayan,%15 gliserol içeren ve –196 ℃ (diğer hiçbir parametrelerde aktiflik gözlemlenmemiştir) muhafaza edilen karyoviyal tüplerinde sağlandığı, aynı koşullar altına muhafaza edilen GMLF 18 izolatında ise tüm koşullarda aktifleşme gözlemlendiği belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8 Roll tüp agar yöntemi kullanılarak1 hafta boyunca muhafaza edilen GMLF 77 ve GMLF 18 izolatlarına ait aktifleşme tablosu(+; Enerji kaynağı olarak glikoz içeren besi yerinde aktifleşme gözlemlenmiştir, - ; enerji kaynağı olarak glikoz içeren besi yerinde aktifleşme gözlemlenememiştir).

ROLL TÜP	GMLF 18						GMLF 77					
1 Haftalık Saklama	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp
Doğrudan -20 °C	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doğrudan -80 °C	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Doğrudan -196 °C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
-20 °C'den -80 °C'ye	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-80 °C'den -196 °C' ye	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
-20 °C'den -196 °C'ye	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-20 °C -80 °C ve -196 °C 'ye	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Roll tüp agar yöntemi ile 2 hafta boyunca muhafaza edilen GMLF 77 ve GMLF 18 izolatları içi elde edilen veriler 2 hafta süre ile muhafaza sonuçları, 1 haftalık muhafaza süresinde elde edilen veriler ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9 Roll tüp agar yöntemi kullanılarak 2 hafta boyunca muhafaza edilen GMLF 77 ve GMLF 18 izolatlarına ait aktifleşme tablosu(+; Enerji kaynağı olarak glikoz içeren besi

yerinde aktifleşme gözlemlenmiştir, - ; enerji kaynağı olarak glikoz içeren besi yerinde aktifleşme gözlemlenememiştir).

ROLL TÜP	GMLF 18						GMLF 77					
2 Haftalık saklama	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp
Doğrudan -20 °C	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doğrudan -80 °C	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Doğrudan -196 °C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
-20 °C'den -80 °C'ye	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-80 °C'den -196 °C' ye	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
-20 °C'den -196 °C'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-20 °C -80 °C ve -196 °C 'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Roll tüp tekniği kullanılarak 3 hafta süre ile muhafaza edilen izolatların ön muamele uygulanmamış olan viyaller dahil aktifleşmelerinde azalma gözlemlenmiş GMLF 77 izolatının ön muamele uygulanan hiçbir tekerrüründe aktifleşme olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10 Roll tüp agar yöntemi kullanılarak 3 hafta boyunca muhafaza edilen GMLF 77 ve GMLF 18 izolatlarına ait aktifleşme tablosu(+; Enerji kaynağı olarak glikoz içeren besi yerinde aktifleşme gözlemlenmiştir, - ; enerji kaynağı olarak glikoz içeren besi yerinde aktifleşme gözlemlenememiştir).

ROLL TÜP	GMLF 18						GMLF 77					
3 Haftalık Saklama	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp
Doğrudan -20 °C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doğrudan -80 °C	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Doğrudan -196 °C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
-20 °C'den -80 °C'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-80 °C'den -196 °C' ye	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-20 °C'den -196 °C'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-20 °C -80 °C ve -196 °C 'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Roll tüp agar yöntemi ile stok almanın bir diğer zaman dilimi olan 4 haftalık süre boyunca belirli sıcaklıklarda muhafaza edilen örneklerin, süre sonunda canlılık gözlemlenme ve gözlemlenmeme durumları sonucu Roll agar yöntemi ile stok alınan GMLF 18 ve GMLF 77 numaralı örneklerin zaman uzadıkça stoklardaki canlılık oranlarının önemli ölçüde değişmediği gözlenmektedir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Roll tüp agar yöntemi kullanılarak 4 hafta boyunca muhafaza edilen GMLF 77 ve GMLF 18 izolatlarına ait aktifleşme tablosu(+; Enerji kaynağı olarak glikoz içeren besi yerinde aktifleşme gözlemlenmiştir, - ; enerji kaynağı olarak glikoz içeren besi yerinde aktifleşme gözlemlenememiştir).

ROLL TÜP	GMLF 18						GMLF 77					
4 Haftalık Saklama	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp
Doğrudan -20 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doğrudan -80 °C	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Doğrudan -196 °C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
-20 °C'den -80 °C'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-80 °C'den -196 °C' ye	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-20 °C'den -196 °C'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-20 °C -80 °C ve -196 °C 'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Roll tüp agar ile stok çalışmanın önemli zaman dilimlerinden biri olan 3 aylık muhafaza süresindeki canlılık tespitine göre 1 aylık zaman dilimi ile 3 aylık zaman dilimindeki muhafazalar sonucu canlılıklar arasında bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Bir başka anlamda bu süreler içerisinde canlanma oranlarında bir azalma görülmediği gibi canlanma gözlemlenmeyen sıcaklıklarda da herhangi bir değişiklik olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12 Roll tüp agar yöntemi kullanılarak 3 ay boyunca muhafaza edilen GMLF 77 ve GMLF 18 izolatlarına ait aktifleşme tablosu(+; Enerji kaynağı olarak glikoz içeren besi yerinde aktifleşme gözlemlenmiştir, - ; enerji kaynağı olarak glikoz içeren besi yerinde aktifleşme gözlemlenememiştir).

ROLL TÜP	GMLF 18						GMLF 77					
3 Aylık Saklama	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp
Doğrudan -20 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doğrudan -80 °C	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Doğrudan -196 °C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
-20 °C'den -80 °C'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-80 °C'den -196 °C' ye	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-20 °C'den -196 °C'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-20 °C -80 °C ve -196 °C 'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Çalışmanın en uzun muhafaza süresi olan 6 aylık süre sonunda gerçekleştirilen canlandırmaların sonuçları her iki örnek içinde belirlenen sıcaklıklardaki muhafazalarda canlılık oranları düşmüş olsa da 6 ay sonunda hala GMLF 77 numaralı örneğin stoklardan canlanabildiği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13 Roll tüp agar yöntemi kullanılarak 6 ay boyunca muhafaza edilen GMLF 77 ve GMLF 18 izolatlarına ait aktifleşme tablosu(+; Enerji kaynağı olarak glikoz içeren besi yerinde aktifleşme gözlemlenmiştir, - ; enerji kaynağı olarak glikoz içeren besi yerinde aktifleşme gözlemlenememiştir).

ROLL TÜP	GMLF 18						GMLF 77					
6 Aylık Saklama	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp	1.tüp	2.tüp	3.tüp	4.tüp	5.tüp	6.tüp
Doğrudan -20 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doğrudan -80 °C	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doğrudan -196 °C	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
-20 °C'den -80 °C'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-80 °C'den -196 °C' ye	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-20 °C'den -196 °C'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-20 °C -80 °C ve -196 °C 'ye	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Roll tüp agarlı stok çalışması için ise GMLF 18 ve GMLF 77 numaralı örnekler için en kısa süre olan 1 haftalık saklanma süresinde en yüksek canlılık oranı sırası ile %84 ve %67 ile doğrudan -196 ℃ 'de saklanan örneklerde gözlemlenmiştir. En uzun süreli saklanma koşulu olan 6 aylık dönem için en yüksek canlılık oranı GMLF 18 ve GMLF 77 numaralı örnekler için sırası ile %67 ve %50 oranında doğrudan -196 ℃ 'de saklanan örneklerde gözlemlenmiştir. En düşük canlılık oranları ise 2. hafta itibari ile % 0 olarak doğrudan -20 ℃'de 1 saat bekletilip -196 ℃ saklanan ve -20℃ , -80 ℃′ler de 1 er saat bekletildikten sonra 196 ℃ de bekletilen iki örnek içinde %0 oranında gözlemlenmiştir.

Bu çalışma ile birlikte, önceki çalışmalarda *Ceacomyces spp.* 'ye ait gelişim süreleri (bir sonraki generasyonu oluşturma süresi) 48-72 saat arasında gelişen ve çok az zoospor salınımı görülen bir cins olarak bilinirken (Chen 2007; Henske ve ark. 2017)) glikoz, dekstroz ve ksilozlu besi yerlerinde 24 saatlik zaman diliminde geliştiği ve zoospor salınımının tetiklenerek daha fazla zoospor populasyonunun olduğu gözlemlenmiştir.

Caecomyces sp, kısa süreli muhafaza edebilmek adına laboratuvar koşullarında temel besi yerlerinde 5-6 gün içerisinde taze besi yerlerine aktarılmaktadırlar (alt kültür çalışmaları). Ayrıca uzun süreli muhafazası için -80 ℃'de koruyucu kimyasal madde etilen glikol içerisinde ya da dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde saklanmaktadır (Nagpal ve ark., 2012). Ancak bu çalışma da daha önceki çalışmaların aksine -80 ℃'de koruyucu kimyasal madde gliserol olarak kullanılmış ve canlılık oranlarının bu sıcaklık için düşük olduğu belirlenmiştir. Yine aynı koşullarda diğer çalışmalarda etilen glikol ve dimetilsülfoksit(DMSO) ile muhafaza edilen örneklerde canlanma gözlemlenirken 6 aylık muhafaza süresinde GMLF 77 ye ait hiçbir tekerrürde canlılık tespiti gözlemlenmemiştir. Ayrıca çalışmaya ait en uzun muhafaza (6 ay) süresi içerisinde optimum canlanmalar -196 ℃ olarak belirlenmiştir.

Nagpal ve ark.'nın (2012) gerçekleştirdiği bir başka çalışmada alt kültür alınan ve gelişimleri sağlanan örnekler 7, 15, 30, 60 ve 90 gün boyunca 5-7 ℃ arasında saklanmış ve

30 günden sonraki muhafaza sürelerinde canlı koloni tespit edememişlerdir. Bu çalışmaya paralel olarak mevcut çalışmada ise – 196 ℃ 'den yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça canlı koloni sayısının azaldığı tespit edilmiştir.

Caecomyces sp.'i aktifleştirmek için denenen farklı yöntemler olmasına rağmen diğer cinslere göre aktifleşme yüzdesinin halen çok düşük olduğu görülmüştür. Bu nedenle bu çalışmada bu yüzdeyi artırabilmek adına eğik agar ve roll agar yöntemleri denenmiştir. Roll tüp agar yöntemi yapılıp fungusların yüzeyde kalması ve canlandırma anında tek kültür alınmasının daha kolay olması amaçlanmıştır. Eğik agar yönteminde ise fungusların agarın arasında kalıp hücrelerin ölmesinin engellemesi ve yüzey alanı geniş olduğu için daha iyi tutunmaları amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, BİGEM dışkı koleksiyonunda bulunan ve dağ keçisine ait 117 numaralı dışkı örneğinden izole edilen ve sonrasında GMLF 77 adını alan *Caecomyces sp.* ve pozitif kontrol olarak stokta uzun zaman diliminde dahi kolayca canlanabilen ve gelişebilen, polisentrik olduğu için daha dayanıklı olduğu düşünülen GMLF 18 numaralı *Orpinomyces sp*. seçilmiştir. Her iki örnek içinde saklama koşullarında agar kullanımının saklama koşullarını olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir. Aynı zamanda optimum gelişmeyi gösteren karbon kaynağı bulunan besi yerlerindeki gelişimleri göz önünde bulundurularak yapılan bu çalışmada da diğer çalışmalara oranla küresel rizodial yapıya sahip *Caecomyces sp* GMLF 77 numaralı örneğin canlanma oranlarında artış gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, dondurarak saklamada DMSO kullanımının, çözdürme sonrasında pasajların sayısında ve işlevinde yaklaşık % 30-50 oranında kayıpla sonuçlandığı bilinmektedir, bu çalışmada (DMSO) dimetil sülfoksit yerine %15 gliserol kullanılmış ve dondurarak muhafaza edilerek agar içerisindeki kolonilerin düşük sıcaklıklardan daha az etkilenerek hücre bütünlüklerinin korunması sağlanmıştır. Gliserol kullanımınında mikroorganizma kültürlerine negatif etkisi olabileceği ihtimaline karşın agarın stok çalışmalarında kullanılmasının olumlu etki gösterebileceği düşünülmüş ve çalışmalar sonucu pozitif sonuçlar alınmıştır. Yine aynı şekilde mikroorganizmaların istemleri doğrultusunda optimum gelişim gösterdiği karbon kaynaklarında gelişimleri de göz önünde bulundurulmuş buradan doğabilecek olumsuzluklarda giderilmek istenmiştir. Dolayısı ile karbon kaynağı olarak ksilen kullanılarak agar içerisindeki gelişimlerin iyileştirilmesi sağlanmıştır. GMLF 18 numaralı örnekte ise yine aktifleşme yüzdeleri diğer stok alma yöntemleri ile paralellik göstermektedir. Sıcaklık değişimleri göz önüne alındığında -20°C'de, -80°C'ye ya da -196°C'ye göre daha yavaş donduğu için aktifliklerini yitirdikleri düşünülmektedir. Aynı zamanda -80°C'de ya da -196°C'de bekletilen fungusların daha hızlı donup daha az hücre

ölümünün gerçekleşmesinden dolayı stoktan çıkarıldığında canlılık şansının -20°C'de bekletilenlere göre daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Kültür koleksiyonları, devamlılığını sağlayacak mikroorganizma grupları hakkında uzun dönemde saklanacak olan mikroorganizma sayısı oldukça önemlidir. Bu doğrultuda stok alınan pasaj sayıları da oldukça önem kazanmaktadır.

4.3. Anaerobik Gut Fungusları ve Anaerobik Gut Bakterilerinin Yağ Asiti Kompozisyonlarının Belirlenmesi

Anaerobik gut funguslarının yağ asiti kompozisyonlarının belirlenmesi ve yağ asitleri içerisinde bulunan konjuge linoleik asit üretim mekanizmalarının anlaşılabilmesi için anaerobik gut fungusları enerji kaynağı olarak glikoz kullanılan anaerobik besi yerlerinde geliştirilmişlerdir. Aynı zamanda anaerobik gut bakterilerinin de yağ asiti kompozisyonları ve linoleik asit üretim miktarlarının belirlenmesi doğrultusunda AGF'ler ile aynı koşullarda geliştirilmişlerdir. Yalnızca saf kültür gelişimlerindeki yağ asiti kompozisyonlarının belirlenmesi değil bakteri-fungus, fungus-fungus ve bakteri-bakteri eşleştirilmeleri yapılmış ve kombinasyonlu gelişimleri izlenmiştir. Bu gelişimler sonucu elde edilen süpernatantlardan yağ ekstraksiyonu yapılmış ve sonuçlar analiz edilmiştir.

Konjuge linoleik asitin linoleik asitin mikroorganizmalar tarafından vaksenik asite dönüştürülmesi sırasında açığa çıkan bir yan ürün olması sebebiyle, anaerobik gut fungusları ve rumen bakterilerinin linoleik asit varlığında nasıl bir etkileşim gösterdikleri incelenmiş ve konjuge linoleik asit miktarlarının belirlenmesi sağlanmıştır.

4.3.1. Gaz Kromotografi İle Mikrobiyal Yağ Asidi Kompozisyonunun Analizi

Gaz kromotogafi analizi ile FAME metoduna (AOAC Metot 996.06) göre 37 yağ asiti reaksiyon zamanları ve yüzdelik oranları belirlenmiştir (Çizelge 4.14). Kullanılan izolatlar için 37 yağ asiti içerisinden palmitik asit, stearik asit, linoleik asit, konjuge linoleik asit ve behenik asit sonuçları karşılaştırılmıştır. Fungusların yağ asiti kompozisyonları belirlenmesinde karşılaştırma yapabilmek ve için rumen bakterileri kullanılmıştır. Anaerobik gut fungusları, rumen bakterileri ve bu mikroorganizmaların kokültür geliştirilmesi sonucu elde edilen yağ asidi miktarları ayrı ayrı belirlenmiştir.

Çizelge 4.14. Gaz kromotografi (GC-2025 Shimadzu, kullanılan kolon: Restek Rt-2560biscyanopropyl polysiloxane, 100 m,0.25 mm ID, 0.2Mm df) FAME metodu ile elde edilebilen 37 yağ asidi metil esterleri ve alıkonma süreleri

FAME STANDART METODU					
		FAME 23.04			
Peak#	Compound ID#	Compound Name	Ret.Time	Area%	Area
1	1	Butryric Acid (C4:0)	11,838	2,3629	188569,2
2	2	Caproic Acid (C6:0)	14,094	3,2562	259858,1
3	3	Caprylic Acid (C8:0)	17,92	3,7859	302125,5
4	4	Capric Acid (C10:0)	23,035	3,8878	310257,9
5	5	Undecanoic Acid (C11:0)	25,781	1,9192	153157,7
6	6	Lauric Acid (C12:0)	28,53	3,9304	313654,1
7	7	Tridecanoic Acid (C13:0)	31,192	1,9621	156577,7
8	8	Myristic Acid (C14:0)	33,783	4,0025	319408,3
9	9	Myristoleic Acid (C14:1)	35,851	1,9651	156819,1
10	10	Pentadecanoic Acid (C15:0)	36,235	2,0225	161400,2
11	11	Cis-10 Pentadecanoic Acid (C15:1)	38,261	1,9727	157429,4
12	12	Palmitik Acid (C16:0)	38,626	6,2298	497157,1
13	13	Palmitoleic Acid (C16:1)	40,255	2,0241	161530,6
14	14	Heptadecanoic Acid (C17:0)	40,84	2,081	166071,8
15	15	Cis-10 Heptadecenoic Acid (C17:1)	42,453	2,0769	165740,6
16	16	Stearic Acid (C18:0)	43,023	4,2562	339658,4
17	17	Elaidic Acid (C18:1)	43,972	2,1153	168806,4
18	18	Oleic Acid (C18:1n9c)	44,4	4,2488	339062,9
19	19	Linoleaidic Acid (C18:2n6t)	45,484	2,0586	164281,9
20	20	Linoleic Acid (C18:2n6c)	46,402	2,0857	166441,3
21	21	Arachidic Acid (C20:0)	47,071	4,3549	347531
22	22	Gamma Linolenic Acid (C18:3n6)	47,88	2,0476	163404,4
23	23	Cis-11 Eicosenoic Acid (C20:1n9)	48,333	2,1568	172119,6
24	23	Cis-11 Eicosenoic Acid (C20:1n9)	48,67	2,0314	162107,9
25	24	Alpha Linolenic Acid (C18:3n3)	48,941	2,1663	172880,2
26	26	Cis-11,14 Eicosadienoic Acid (C20:2)	50,25	2,1129	168619,1
27	27	Behenic Acid (C22:0)	50,818	4,3487	347043
28	28	Cis-8,11,14 Eicosatriedonic Acid (C20:3n6)	51,668	2,0513	163698,5
29	28	Cis-8,11,14 Eicosatriedonic Acid (C20:3n6)	52,048	2,1731	173423,3
30	29	Erucic Acid (C22:1n9)	52,444	2,0205	161238,3
31	30	Cis-11,14,17 Eicosatriedonic Acid (C20:3n3)	52,605	2,1739	173487,6
32	31	Arachidonic Acid (C20:4n6)	52,8	2,043	163034,9
33	33	Cis-13,16 Docosadienoic Acid	53,996	2,1484	171446,9
34	34	Lignoceric Acid (C24:0)	54,524	4,1498	331166,3
35	35	Cis-5,8,11,14,17 Eicosapentaenoic Acid (C20:5n3)	55,22	1,8527	147852,3
36	36	Nervonic Acid (C24:1)	55,856	2,1685	173049,8
37	37	Cis-4,7,10,13,16,19 Docosahexaenoic Acid (C22:6n3)	61,098	1,7567	140187,4

4.3.2. *Butrivibrio fibrisolvens* JW11 Suşuna Ait Yağ Asiti Kompozisyonları

Rumen bakterisi olan *Butrivibrio fibrisolvens* JW11 enerji kaynağı olarak glikozun bulunduğu anaerobik besi yerinde 0, 36 ve 72 saat geliştirildikten sonra elde edilen süpernatantlardan yağ ekstraksiyonu ile metil ester formunda yağ asidi kompozisyonları çıkartılmıştır. Aynı zamanda KLA üretim mekanizmasının belirlenmesi içinde linoleik asit ilave edilen enerji kaynağı olarak glikoz bulunan besi yerlerinde aynı zaman dilimlerinde geliştirimiş ve süpernatantlardan yağ asiti metil esterleri oluşturulmuştur. *Butrivibrio fibrisolvens* JW11 için elde edilen kromotografik alan yüzdeleri yağ asitleri kompozisyonları içerisinden hesaplanmıştır (Çizelge 4.15).

Linoleik asitin bakteri gelişimi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla eklenen 500 µl ve 1000 µl 5 mg/ml linoleik asit ilavesinin *B. fibrisolvens* gelişimine etkisinin olmadığı görülmüştür. Ancak 2000 µl ve üzerindeki miktarlarda 5 mg/ml linoleik asit konsantrasyonu gelişim üzerine olumsuz etki göstermektedir. Bu sonuçlar Maia ve ark. (2010) çalışmasında *B.fibrisolvens* JW11 suşu için gerçekleştirilen 50 mg/ml linoleik asit ilavesinin bakteri gelişimini engellediğini gözlemlemeleri ile uyuşmaktadır. Maia ve ark., (2007), *Butrivibriyo* cinsine ait *B.hungatei* türünün 5mg/ml LA varlığından etkilenmediğini bildirmiştir. Bu sonuçlara göre aynı cinse ait türlerin benzer özellikler göstererek belirli düzeydeki LA'dan etkilenmedikleri öngörülebilmektedir.

B. fibrisolvens'e ait metil ester içerisinde yağ asidi çeşitliliğinin oldukça geniş olduğu görülmüştür. *B. fibrisolvens* için gelişim ortamı olan besi yerine linoleik asit eklemesi olmadığında palmitik asitin (PA) yüzdelik alanları sıfırıncı saatlik gelişimde %4.9, otuz altı saatlik gelişimde %73.8 ve yetmiş iki saatlik gelişim sonucunda %15.2 olarak belirlemiştir. Gelişim zamanları ile karşılaştırıldığında en yüksek palmitik asit yüzdelik alanının otuz altı saatlik gelişimde oluştuğu görülmüştür. Stearik asit (SA) 0,36 ve 72 saatlik gelişimlerdeki yüzdelik alanı %4.2 ,%56.7 ve %15.2 olarak belirlenmiştir. Stearik asit ölçümü Maia (2010)'da *B. fibrisolvens* JW11 için gözlemlenememişken aynı suş için farklı miktardaki LA değerlerinde gözlemlenmektedir. Behenik asit, oleik asit, linoleik asit ve konjuge linoleik asit yüzdelerinin ise palmitik asit ve stearik asit yüzdelerine göre düşük olduğu görülmüştür (Çizelge 4.15). Besi yeri içerisine linoleik asit ilavesi olmadan yağ kompozisyonu incelenen *Butrivibrio fibrisolvens* 0.(sıfır) saatte linoleik asit bulundurmazken, 36. saatte %4,6 ve 72. saatte % 5,9 oranında linoleik asit üretebilmekte olduğu gözlemlenmiş dolayısı ile Linoleik asitin sentez miktarnın kullanılan kültür şartlarında inkübasyon süresinin uzamasına paralel olarak artış gösterdiği belirlenmiştir.

Butrivibrio fibrisolvens JW11'in konjuge linoleik asit üretimi başta olmak üzere diğer yağ asitlerinin üretim miktarına 500 µl linoleik asitin etkisinin belirlenmesi için besi yeri içerisine ilave edilmesi sonucu oluşan yağ asidi miktarları Çizelge 4.15'de gösterilmiştir. Palmitik asit, stearik asit, behenik asit, oleik asit, linoleik asit ve konjuge linoleik asit miktarları incelendiğinde zamanla yağ asidi miktarlarının azaldığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda linoleik asit eklenmesi ile oleik asit miktarının artış gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda Kim (2000), *Butyrivibrio fibrisolvens* A38 şusunda 15 µM linoleik asit eklendiğinde bakteriyel gelişime herhangi bir etkisi olmadığı

gözlemlenmiştir. Bu çalışmlarla paralellik gösteren sonuçlara göre 500 µl linoleik asit eklenmesinin de *Butrivibriyo fibrisolvens* gelişimi üzerine herhangi bir etkisi olmadığı görülmüştür. Konjuge linoleik asit üretiminde linoleik asitin etkisi incelendiğinde 36. saatlik gelişim sonucunda KLA miktarının arttığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.15 *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 suşu için gerçekleştirilen GC yağ asidi analizi sonucu elde edilen yağ asidi kompozisyonunda bulunan birkaç yağ asiti

Butrivibriyo fibrisolvens JW11	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	31,2	38,9	36,8
Stearik Asit (C18:0)	26,6	29,9	29,4
Behenik Asit (C22:0)	42	6,4	12,9
Oleik Asit (C18:1n9c)	-	11,6	6,2
Linoleik Asit (C18:2n6c)	-	2,4	14,4
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-
Butrivibriyo fibrisolvens JW11 +500**µl** Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	18	17,2	15
Stearik Asit (C18:0)	15	18	18
Behenik Asit (C22:0)	2,5	11	6
Oleik Asit (C18:1n9c)	61	31	49
Linoleik Asit (C18:2n6c)	0,7	6	8,6
Konjuge Linoleik Asit	-	11,3	-
Butrivibriyo fibrisolvens JW11 +1000**µl** Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	10	10	17
Stearik Asit (C18:0)	8,4	55	11
Behenik Asit (C22:0)	3	1	4
Oleik Asit (C18:1n9c)	73	27	57
Linoleik Asit (C18:2n6c)	1	1,8	5,9
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-

4.3.3. *Ruminococcus albus* SY3 Suşuna Ait Yağ Asidi Kompozisyonları

Yağ kompozisyonu GC ile belirlenen *R.albus* SY3 suşuna ait yağ içeriklerinin bir kısmı Çizelge 4.16'da yüzdelik şekilde gösterilmiştir. Yağ içerikleri incelendiğinde her gelişim zaman diliminde yüzdelik dilimlerin değiştiği gözlemlenmiştir. Bakteriye ait normal gelişimde (Linoleik asit ilavesiz) Palmitik asit (PA) miktarı % 21 ile en fazla 36. saatlik gelişimde gözlemlenmiştir. Palmitik asit üretim miktarı incelendiğinde 36. saate kadar arttığı ancak 36 saat sonrası palmitik asit miktarının azaldığı gözlemlenmiştir. Stearik asit miktarı ise bakteriye ait normal gelişim süreleri içerisinde zamana bağlı olarak azalış göstermektedir. Behenik asit (BH) ve oleik asit (OA) de stearik asit ile paralellik göstermiş ve zaman ilerledikçe azalış göstermiştir. Ancak linoleik asit ve konjuge linoleik asit miktarları diğer yağ asitlerinden farklılık göstermektedir. Linoleik asit gelişimin başlamadığı 0. saatte ve gelişimin devam ettiği 36. saatte gözlemlenmezken 72. saat gelişim evresinde bakteri taradından üretilmiş ve GC kullanılarak tespit edilmiştir. Buna göre 72. saatte linoleik asit miktarı % 1.3 olarak belirlenmiştir. Konjuge linoleik asit miktarı ise gelişim saatleri içerisinde farklı yüzdeler göstermektedir. Gelişimin olmadığı 0. (sıfır) saatte % 5.1 olarak belirlenen Konjuge linoleik asit 36. saatte tüketilmiş ve ölçülememişken 72. saatte yeniden üretileye başlanarak %1.4 oranında yağ kompozisyonu içerisinde yer almıştır. Sonuçlar incelendiğinde *Ruminococcus albus* SY3 suşu için linoleik asit, konjuge linoleik asit, behenik asit, stearik asit ve oleik asit üretimleri Lin ve ark. (1999)'da gerçekleştirdikleri çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Aynı zamanda Ekinci (2020) yaptığı çalışmalarda *Ruminococcus albus* SY3 suşunun linoleik asit başta olmak üzere ve linoleik asiti normal yaşamsal yolakta kullanarak son ürün/yan ürün olarak konjuge linoleik asit sentezleyebildiği belirlenmiştir.

Ruminococcus albus SY3 suşu için başta linoleik asitin enzimatik parçalannması ve yağ asiti kombinasyonlarındaki değişiminin belirlenebilmesi için linoleik asit ile birlikte geliştirilmesi sonucu elde edilen yağ asitleri kompozisyonu Çizelge 4.16'da gösterilmiştir. Linoleik asit ilavesi ile palmitik asit, stearik asit, behenik asit, oleik asit, linoleik asit ve konjuge linoleik asit miktarlarında değişiklikler gözlemlenmiştir. Yüzde olarak incelenen sonuçlara palmitik asit 500 µl LA ilavesi ile 0. (sıfır) saatten 36 saate % 4 artış göstererek % 28 ulaşırken 36. saatten sonra sentez miktarında azalma olduğu belirlenmiştir. Stearik asit 0. (sıfır) saatte % 25 olarak belirlenmiş ancak en uzun gelişim süresi olan 72. saate doğru artış göstermiş ve % 28 olarak belirlenmiştir. Stearik asitin bakterilerin linoleik asiti biyohidrejenasyonu sürecinde en son ürün olduğu bilindiğinden bu artış beklenmektedir.

Oleik asit yüzdeleri incelendiğinde oleik asit oluşumu 72. saatte gözlemlenmiş ve % 30 ile en yüksek yağ asiti yüzdesine sahip olduğu belirlenmiştir. Linoleik asit miktarında ise 0. (sıfır) saatte ilave edilen miktar ile karşılaşılmış ancak diğer gelişim saatlerinde linoleik asit gözlemlenmemiştir. Bu durumun linoleik asit üretiminin çift yönlü olması ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Çünkü linoleik asit yıkımı ile konjuge linoleik asit ve diğer yağ asitleri oluşmakta ve çift yönlü olarak oluşan yağ asitlerinden LA yeniden sentezlenebilmektedir.

Linoleik asit miktarının arttırılarak geliştrildiği *Ruminococcus albus* SY3 suşu için yağ asiti kompozisyonunda ise tüm yağ asitlerinin ölçülebilir düzeyde olduğu görülmüştür. Burada en dikkat çeken yağ asiti yüzdesi 0. (sıfır) saatte oleik asitin % 62 oranında olmasıdır. Gelişim süresi ilerledikçe oleik asit miktarında azalma gözlenmiş ve 36. saatte %31 e düşerek % 50 oranında bir azalma gözlemlenmiştir. Bu azalmanın yanı sıra stearik asit miktarı 0. (sıfır) saatte % 16 olarak belirlenirken 36. saatte % 50 oranına yükselmiştir. Böylece oleik asitin son ürün olan stearik asite dönüştüğü söylenilebilmektedir. linoleik asit yüzdesine bakıldığında ise 0. (sıfır) saatte %0.9, 36. saatte azalarak % 0.5 ve 72. saatte yeniden artarak %1.3 oranında belirlenmiştir. Linoleik asit miktarına bağlı olarak KLA yüzdelik miktarlarıda değişiklik göstermektedir. KLA miktarı 0. (sıfır) saatte % 0.5 olarak ölçülmüş 36. saatte % 0.8 ve son olarak 72. saatte % 0 olarak ölçülmüştür. Selülolitik rumen bakterilerinin 50 μg/ml çoklu doyamamış yağ asitlerinin varlığında gelişemediğini bildiren Maia ve ark. (2007)'nın aksine *Ruminococcus albus* SY3 suşu yağ asitlerinin varlığında gelişimini sürdürebilmektedir. Yine aynı çalışmada *Ruminococcus albu*s SY3 suşunun LA kullanamadığı belirtilmiştir ancak bu tez çalışmasında kullanılan aynı suşun LA kullanarak KLA üretebildiği gösterilmiştir. Bakteriler içerisinde laktik asit bakterilerinden *L. plantarum* AKU 1009a suşunun KLA üretebilme yeteneğine sahip olduğu (yaklaşık 40 mg/ml KLA) da Kishino ve ark. (2002) tarafından bildirilmiştir *Lactobacillus plantarum* ZS2058 suşunun % 50 oranında linoleik asitin konjuge linoleik asite çevirdiği bilinmektedir (Yong ve ark., 2014).

Çizelge 4.16 *Ruminococcus albus SY3* suşuna ait yağ asiti kompozisyonuna ait bazı yağ asitleri ve yüzdelik oranları

Ruminococcus albus SY3	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	15	21	11
Stearik Asit (C18:0)	23	16	15
Behenik Asit (C22:0)	2,6	0,7	1,8
Oleik Asit (C18:1n9c)	4	2,1	1,4
Linoleik Asit (C18:2n6c)	-	-	1,3
Konjuge Linoleik Asit	5,1	-	1,4
Ruminococcus albus SY3 +500μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	24,3	28,1	27,4
Stearik Asit (C18:0)	25,2	26,6	28,1
Behenik Asit (C22:0)	-	-	3,8
Oleik Asit (C18:1n9c)	-	-	30
Linoleik Asit (C18:2n6c)	1,9	-	-
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-
Ruminococcus albus SY3 +1000μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	16	11,8	22,7
Stearik Asit (C18:0)	16,9	50	18,2
Behenik Asit (C22:0)	0,8	0,8	2,6
Oleik Asit (C18:1n9c)	62,6	31,2	48,2
Linoleik Asit (C18:2n6c)	0,9	0,5	1,3
Konjuge Linoleik Asit	0,5	0,8	-

4.3.4. *Orpinomyces sp* GMLF 19 İzolatına Ait Yağ Asidi Kompozisyonu

Orpinomyces sp GMLF 19 suşuna ait gelişimler ve bu gelişimler sonucu elde edilen yağ asiti kompozisyonları içerisindeki bazı yağ asitlerine ait yüzdelik alanlar Çizelge 4.17'de gösterilmiştir. Linoleik asit ilave edilmemiş kontrol grubundaki palmitik asit yüzdeleri 0. (sıfır) saatte % 13.3 36. saatte % 77 ve 72 saatlik gelişimde ise % 14.7 olarak ölçülmüştür. Aynı grup içerisinde stearik asit miktarı 0. (sıfır) saatte % 12.6, 36 saatlik

gelişim sonucu % 0 ve 72 saatlik gelişimde % 85.2 olarak ölçülmüştür. Behenik asit miktarları sırası ile % 3.4, % 22.9 ve % 0 olarak; oleik asit miktarı ise sadece 0. saatte % 11.4 olarak ölçülmüştür. Linoleik asit miktarıda sadece 0. (sıfır) saatte ölçülebilir miktarda gözlemlenmiş ve % 12.7 olarak belirlenmiştir. KLA miktarına ise hiçbir gelişim evresinde rastlanmamıştır.

Linoleik asit ilavesinin yağ asiti miktarlarına etkisini 500µl LA ilaveli gelişimlerde Çizelge 4.17'de gösterilmiştir. Buna göre linoleik asit ilavesi ile palmitik asit miktarı 0. (sıfır) saatte % 44.8 e yükselmiş 36. saatte bu değer ölçülemeyecek kadar azalırken 72. saate yeniden artarak % 12.4 olarak ölçülmüştür. Stearik asit miktarı 0 (sıfır) saatlik gelişimde % 53.8, 36 saatlik gelişimde ölçülememiş ve 72. saate %19,1 olarak ölçülmüştür. *Orpinomyces sp* GMLF 19 linoleik asit ilave edildiğinde behenik asit ve oleik asit üretemezken linoleik asit miktarı 0. (sıfır) saatte % 1.2 36 saatte % 0 ve 72 saatte ise % 9.1 olarak ölçülürken konjuge linoleik asit miktarına rastlanmamıştır.

Linoleik asit miktarının etkisinin yağ asiti miktarına etkisinin belirlenmesi açısından 1000 µl linoleik asit ilave edilen ve yağ kompozisyonu içerisindeki yağ asitlerinden 0 saatlik gelişimde palmitik asit % 25.5, 36 saatlik gelişimde % 12.1 ve 72 saatlik gelişimde % 22.6 olarak ölçülmüştür. Stearik asit miktarı 0 (sıfır) saatlik gelişimde % 29.2, 36. saattik gelişimde % 12.1 ve 72 saatlik gelişim ise % 16.5 oranında belirlenmiştir. behenik asit hiçbir gelişim saatinde gözlemlenmemiştir. Oleik asit 0 saatte rastlanmamıştır ancak 36 saatlik ve 72 saatlik gelişimlerdeki miktarları sırası ile % 67.4 ve % 51.9 olarak ölçülmüştür. Linoleik asit 0 (sıfır) saatte % 14.3, 36 saatte % 3 ve 72 saatlik gelişim sonucu % 2.7 üretim gözlemlenmiştir. Linoleik asit ilave edilmiş gelişimlerde konjuge linoleik asit miktarına rastlanmamıştır. *Orpinomyces sp* GMLF 19 izolatı için behenik asit ve konjuge linoleik asit üretimi hiçbir gelişim koşullarında rastlanmamıştır. Ancak Nam ve Garnswworthy (2007a) *Orpinomyces sp*. F-14 biyohidrojenasyon aktivitesinin yüksek olduğunu bildirmiş böylece KLA üretimininde mevcut olduğunu belirtmişlerdir.

Kar ve ark. (2022), *Caecomyces sp* (GMLF 12), *Neocallimastix sp* (GMLF 1, GMLF 23 ve GMLF 25), *Piromyces sp* (GMLF 17), *Orpinomyces sp* (GMLF 5) cinslerine ait yağ asiti kompozisyonlarında en yüksek orana mistrik asitin sahip olduğunu bildirmiştir ancak *Orpinomyces sp* GMLF 19 için en yüksek orana sahip yağ asiti mevcut çalışmada oleik asit olarak belirlenmitir. Bu sonuca paralel olarak Kemp ve Londer (1984) *Orpinomyces sp, Neocallimastix sp* ve *Caecomyces sp* için yağ asiti kompozisyonu içerisinde en yüksek değerin oleik asit olduğunu bildirmiştir.

Çizelge 4.17 *Orpinomyces sp* GMLF 19 izolatına ait farklı koşullarda gelişimleri sonucu yağ asiti kompozisyonları içerisindeki bazı yağ asitleri ve yüzdelik alanları

Orpinomyces sp GMLF 19	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	13,3	77,0	14,7
Stearik Asit (C18:0)	12,6	-	85,2
Behenik Asit (C22:0)	3,4	22,9	-
Oleik Asit (C18:1n9c)	11,4	-	-
Linoleik Asit (C18:2n6c)	12,7	-	-
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-
Orpinomyces sp GMLF 19 +500μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	44,8	-	12,4
Stearik Asit (C18:0)	53,8	-	19,1
Behenik Asit (C22:0)	-	-	-
Oleik Asit (C18:1n9c)	-	-	-
Linoleik Asit (C18:2n6c)	1,2	-	9,1
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-
Orpinomyces sp GMLF 19+1000μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	25,5	12,1	22,6
Stearik Asit (C18:0)	29,2	12,1	16,5
Behenik Asit (C22:0)	-	-	-
Oleik Asit (C18:1n9c)	-	67,4	51,9
Linoleik Asit (C18:2n6c)	14,3	3,0	2,7
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-

4.3.5. *Feramyces sp* GMLF 30 İzolatına Ait Yağ Asidi Kompozisyonu

Bu tez kapsamında izolasyonu, saflaştırılması ve putatif tanımlaması yapılmış olan ve yağ analizi ile yağ asiti kompozisyonu belirlenen *Feramyces sp* GMLF 30 izolatı gelişim koşullarının içerisine linoleik asit eklenmesi gelişimini etkilememiş ancak yağ kompozisyonuna etki etmiştir. Deneme koşulları olarak ilave edilen 5 mg/ml linoleik asit

konsantrasyonlarında 500 µl ve 1000 µl miktarlarında linoleik asitten hiçbir zaman diliminde gelişim açısından etkilenmediği tespit edilmiştir.

Yağ kompozisyonlarının varlığı toplam yağ asitleri içerisinde yüzde olarak Şekil Çizelge 4.18'de gösterilmektedir. Bu şekil gelişimi için gerekli besi ortamına linoleik asit ilave edilmeden GMLF 30 suşunun 0-36 ve 72 saatlik gelişimleri sonucundaki yağ asitleri miktarları göstermektedir. Palmitik asit, stearik asit, behenik asit, oleik asit, linoleik asit ve konjuge linoleik asit yüzdeleri yüzdeleri sırası ile sıfırıncı saat için % 17, % 26, % 4, % 3.5, % 2.2 ve son olarak % 0 olarak ölçülmüştür. Bu saatteki kompozisyon yüzdeleri kontrol grubunu oluşturması nedeni ile az miktarda yüzdelere sahiptir. Yağ asiti kompozisyonu yüzdeleri ilerleyen gelişim saatlerinde stearik asit miktarı sabit kalırken behenik asit ve oleik asit artış göstermiş linoleik asit azalmış ancak tekrardan artış göstermiştir. Linoleik asitin tekrardan artış göstermesi çift yönlü yağ asiti oluşumunun bir göstergesi olabilmektedir. Çünkü linoleik asitin vaksenik ve asit ve stearik asite dönüşümünden hemen sonra vaksenik asitten linoleik asit oluşumu söz konusudur ve bu dönüşüm Harfoot ve ark. (1997) tarafından da gösterilmiştir. Son olarak konjuge linoleik asit miktarında herhangi bir gelişim/artış gözlemlenmemiştir. Bu sonuç incelendiğinde konjuge linoleik asit miktarının ölçülemeyecek kadar az olabileceğininde göstergesidir. Çünkü konjuge linoleik asit üretimi linoleik asit varlığında ya da yokluğunda mevcut olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Nam ve ark.2006).

Linoleik asit ilavesinin yağ kompozisyonu içerisindeki KLA miktarına olan etkisi için 500µl (5mg/ml konsantrasyonda) linoleik asit eklenmiş ve 0,36 ve 72 saatlik gelişimler takip edilmiştir. Palmitik asit yüzdesi sıfırıncı saatte % 43 düzeyinde gözlemlenirken diğer gelişim zamanlarında palmitik asite ait yüzdelerin azalış gösterdiği Çizelge 4.18'de gösterilmiştir. Benzer şekilde stearik asit yüzdesi sıfırıncı saatte % 62 oranında iken otuz altıncı saatte stearik asit miktarı hızlı bir düşüş ile % 27 düzeyine ve son olarak yetmiş iki saat sonunda % 14 'e kadar düşmüştür. Behenik asit yüzdesi 0. (sıfır) saatte gözlemlenirken 36. saatte gözlemlenmemiş ancak 72. saatte yeniden gözlemlenebilir düzeye ulaşmıştır. Oleik asit *Feramyces sp* GMLF 30 izolatı için yüksek yüzdelik payına sahip olarak % 163 oranında gözlemlenirken gelişim zamanları ilerledikçe, sentezlenen miktarda azalma söz konusu olmuş ve 72 saat sonunda % 21 'e kadar düşmüştür. Linoleik asit miktarı ise ilave edilen miktar ile 0. (sıfır) saatte ölçülen yüzdelik alan % 3.3 olurken 36. saatte % 5.8 ve 72. saatte % 6.7 olarak ölçülmüştür. Palmitik asit, stearik asit ve oleik asit miktarlarındaki bu azalışlar linoleik asit üretimini tetiklemiş olabileceği ve linoleik asit miktarının bundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. KLA miktarı 0. (sıfır) saatte

gözlemlenebilir düzeyde iken ilerleyen zaman dilimlerinde gözlemlenemeyecek derecede düşüktür.

Çizelge 4.18 *Feramyces sp*. GMLF 30 izolata ait yağ asiti kompozisyonları içerisindeki bazı yağ asitlerine ait yüzdelik miktarlar

Feramyces sp GMLF 30	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	32,6	35,5	35,7
Stearik Asit (C18:0)	49,1	48,3	46,8
Behenik Asit (C22:0)	7,5	4,8	4,3
Oleik Asit (C18:1n9c)	6,5	6	8,7
Linoleik Asit (C18:2n6c)	4,2	2	3,2
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-
Feramyces sp GMLF 30+500**µl** Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	15,6	21,5	21,5
Stearik Asit (C18:0)	21,9	24	28,9
Behenik Asit (C22:0)	1,3	-	2,3
Oleik Asit (C18:1n9c)	58,6	45,3	42,8
Linoleik Asit (C18:2n6c)	1,2	5,1	1,3
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-
Feramyces sp GMLF 30+1000**µl** Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	12	14,1	-
Stearik Asit (C18:0)	12,5	13,6	16,8
Behenik Asit (C22:0)	-	1,6	2,1
Oleik Asit (C18:1n9c)	70,5	64,4	-
Linoleik Asit (C18:2n6c)	1,4	2,2	-
Konjuge Linoleik Asit	0,4	1,7	-

Son olarak gerçekleştirilen 1000µl 5 mg/ml linoleik asit ilave edilmesinin yağ kompozisyonu için etkileri incelenmiş ve Palmitik asit miktarı 0. (sıfır) saatte % 56, stearik asit % 58, behenik asit % 0, oleik asit % 329, linoleik asit % 6.2 ve Konjuge linoleik asit % 2.6 olarak ölçülmüştür. Linoleik asit ilave edilmesi ile 0. (sıfır) saatteki yağ

kompozisyonlarında da artış olduğu belirlenmiştir. Yağ asitlerinin yüzdeleri 36. saatte palmitik asit, stearik asit, oleik asit ve linoleik asit azalış gösterirken, ve KLA miktarlarında artış olduğu görülmüştür. Linoleik asitin azalışı ile KLA 'nın artması da LA'dan KLA üretiminin gerçekleştiğini göstermektedir. Gelişim zaman diliminin sonuncusu olan 72. saatlik gelişimde stearik asit ve behenik asit dışındaki tüm yağ kompozisyonları ölçülemeyecek derecede azalmışken bu iki yağ asiti artış göstermektedir. Stearik asitin son ürün olması sebebiyle miktarının olması Kemp ve Lander (1984) tarafından rapor edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

4.3.6. *Caecomyces sp* GMLF 77 Yağ Analizi Sonucu

Yağ kompozisyonu incelendiğinde *Caecomyces sp* GMLF 77 için oluşturulan besi yeri içerisine linoleik asit ilave edilmeden geliştirilmede elde edilen ve 0, 36, 72 saatlerdeki gelişimleri gözlemlendiğinde 0. (sıfır) saatte Palmitik asit miktarı % 20 iken yetmiş ikinci saatte % 36'ya çıkmıştır (Çizelge 4.19). Aynı şekilde stearik asit yüzdeside 72. saate gelindiğinde sıfırıncı saatte elde edilen yüzdenin iki kat arttığı belirlenmiştir. Linoleik asit miktarında sıfırıncı saat ile 36. saat arasında bir düşüş gerçekleşmiştir. Bu düşüş ile 36. saatte KLA üretiminin gerçekleştirildiği belirlenmiştir. Çünkü 0. (sıfır) saatte KLA miktarı ölçülemeyecek kadar az iken 36. saatte %2.5 düzeyine erişmiştir.

Küresel rizodial yapıya sahip AGF olan GMLF 77 ye ait yağ kompozisyonu içerisinde yer alan palmitik asit yüzdesi linoleik asit ilavesi yapıldığında 0. (sıfır) saatte %14.2, 36. saatte %24.7 ve 72. saatteki miktarı ise %21.7 olarak belirlenmiştir. Stearik asit miktarları incelendiğinde 0. (sıfır) satteen 72. saate doğru belirgin bir artış meydana gelmiş ve sırası ile % 9.3, % 18.3 ve % 33.6 olduğu belirlenmiştir. Stearik asit miktarının, uzun süreli inkübasyon sonucu artmasının son ürün olarak sentezlenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Kemp ve Lander, 1984). Behenik asit miktarları linoleik ilavesi olmayan gelişimlerdeki yüzdeler ile karşılaştırıldığında çok düşük olarak belirlenmiştir. Buna göre behenik asit yüzdeleri 0. (sıfır)-36. ve 72. saatlerde % 0, % 2.2, % 6.1 olarak belirlenmiştir. Oleik asitin yağ asiti kompozisyonu içerisindeki yeri ise *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatı için oldukça yüksek olmasına karşın inkübasyon süresi arttıkça oleik asit miktarının azaldığı gözlemlenmiştir. Linoleik asit miktarı ise küresel rizodial yapıya sahip funguslarda yapılan daha önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir. Çömlekçioğlu ve ark. (2011) yaptığı çalışmalarda küresel rizoide sahip AGF *Caecomyces sp'nin* LA varlığında mevcut LA'yı KLA'ya dönüştürdüğünü belirlemişlerdir. Bu sonuçlara göre GMLF 77 linoleik asitin parçalanmasında rol almaktadır. 0. (sıfır) satte linoleik asit miktarı

% 0.8 olarak belirlenirken 36. saatte %1 ve 72. saatte 4,9 olarak belirlenmiştir. Ancak buna rağmen KLA miktarının ölçülemeyecek kadar az düzeyde olduğu belirlenmiştir. Spesifik olarak incelenen palmitik asit, stearik asit, behenik asit, oleik asit, linoleik asit ve konjuge linoleik asit dışında yağ asiti kompozisyonlarıda Kar ve ark. (2022)'nın yaptığı yağ asiti kompozisyonlarının incelenmesi ile paralellik göstermektedir. Kar ve ark. (2022) küresel rizodial yapıya sahip AGF 'de linoleik asite rastlamazken linoeik asit ilavesi olmadan geliştirilen *Caecomyces sp* GMLF 77 ye ait her gelişim süresinde LA formasyonunun gerçekleştiği belirlenmiştir.

*Caecomyces s*p GMLF 12 suşunun ilk inokulasyon aşamasında ortamda bulunan linoleik asite karşı duyarlı olduğunu göstermiştir (Çömlekçioğlu ve ark., 2011). Benzer sonuçlara Kim ve ark. (2008) tarafından *Piromyces communis* M014 suşu ile yapılan çalışmalarda da ulaşılmıştır. Ancak bu sonuçlar *Caecomyes sp* GMLF 77 izolatı için benzerlik taşımamaktadır. Linoleik asit ilavesinin *Caecomyces sp* GMLF 77'ye ait hiçbir gelişim zamanında *Caecomyces sp* GMLF 77' nin gelişimine etki etmediği görülmüştür. Ayrıca Çömlekçioğlu (2011), oleik asitin Monosentrik fungus olan *Caecomyces sp*'de en yüksek yağ asiti olduğunuda bildirmiştir. Bu durumda küresel rizodial yapıdaki fungusların oleik asit üretim yeteneklerinin gelişmiş olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda *Caecomyces sp*, *Neocallimastix spp* ve *Orpinomyces sp* cinslerine ait bireylerin yağ asiti kompozisyonları içerisinde en yüksek payı palmitik asit, stearik asit ve oleik asitin aldığı da bildirilmiştir (Çömlekçioğlu ve ark., 2011).

Linoleik asit miktarının küresel rizodial yapılı fungus olan *Caecomyces sp'* de *Neocallimastix sp* ve *Orpinomyces sp'*den daha yüksek değerlere sahip olduğu bildirilmiştir (Çömlekcioğlu ve ark., 2012). Bu durumda küresel rizodial yapılı *Caecomyces. sp* GMLF 77 izolatı ile paralel bir değer göstermektedir. Kar ve ark. (2022), AGF yağ asiti kompozisyonları içerisinde 3. büyük yağ asiti yapısının stearik asit olduğunu bildirmiş palmitik asit miktarını ise toplam yağ asiti kompozisyonunun % 20 'den fazlasını oluşturduğunu bildirmiştir. Oysa bu çalışmada stearik asit *Caecomyces sp* GMLF 77 dahil tüm AGF suşlarında 2. sıradaki yağ asiti konumundadır.

Çizelge 4.19 *Caecomyces sp* GMLF 77 fungusuna ait yağ kompozisyonu içerisindeki bazı yağ asitleri ve yüzdelik miktarları

Caecomyces sp. GMLF 77	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	20,6	17,4	36,5
Stearik Asit (C18:0)	53,8	15,9	49,9
Behenik Asit (C22:0)	5,7	35	6,3
Oleik Asit (C18:1n9c)	7,4	10,4	1,1
Linoleik Asit (C18:2n6c)	12,2	5,2	1,9
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-
Caecomyces sp. GMLF 77+500μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	14,2	24,7	21,7
Stearik Asit (C18:0)	9,3	18,3	33,6
Behenik Asit (C22:0)	-	2,2	6,1
Oleik Asit (C18:1n9c)	73	53,6	33,5
Linoleik Asit (C18:2n6c)	0,8	1	4,9
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-
Caecomyces sp. GMLF 77+1000μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	10,6	10,2	33,5
Stearik Asit (C18:0)	4,9	7	38
Behenik Asit (C22:0)	1,3	1,3	1,2
Oleik Asit (C18:1n9c)	83	78,5	27,1
Linoleik Asit (C18:2n6c)	-	0,8	-
Konjuge Linoleik Asit	-	1,2	2,5

4.3.7. *Feramyces sp* GMLF 92 İzolatına Ait Yağ Asidi Kompozisyonu

Yapılan yağ analizi sonucu *Feramyces sp* GMLF 92 izolatına ait yağ kompozisyonu içerisinden seçilen palmitik asit, stearik asit, behenik asit, oleik asit, linoleik asit ve konjuge linoleik asit yüzdelik alanları belirlenmiştir (Çizelge 4.20). Kontrol grubu olarak oluşturulan linoleik asit ilave edilmeden gerçekleştirilen gelişim saatlerine göre

palmitikasit 0. (sıfır) saatte %23.5, 36. saatte %24.9 ve 72. saatte %13.7 olarak gözlemlenmektedir. Stearik asit miktarının diğer yağ asiti miktarlarına göre yüksek olduğu görülmektedir. Buna göre stearik asit miktarı 0. (sıfır) saatte % 34.6, 36. saatte %42.4 ve 72. saatte %19.3 olarak belirlenmiştir. BA miktarı incelendiğinde 0. (sıfır) saatte en yüksek % 8.4 ile 36. saatte %4.7 ve 72. saatte % 5.7 olarak ölçülmüştür. Oleik asit yağ asitleri içerisindeki miktarı 0. (sıfır) saatte %12.7, 36. saatte % 7.5 ve 72. saatte % 11.9'dur. Linoleik asit ilave edilmeyen kontrol grubu içerisindeki linoleik asit miktarı 0. (sıfır) saatte % 5.1, 36. saatte % 5.7 ve 72. saatte %1,6 olarak belirlenmiştir. Linoleik asit miktarının azalması KLA miktarının artması ile orantılıdır. KLA 0. (sıfır) saatte % 3.6, 36. saatte % 0 ve 72. saatte %44.8 ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Bu artış linoleik asitten konjuge linoleik asit sentezlenmesine bağlı olduğu şeklinde yorumlanmıştır (Tanaka ve Shigeno, 1976; Singh ve Hawke, 1979).

Yağ asiti kompozisyonunda linoleik asit ilavesi ile yağ asiti miktarlarındaki değişim gözlemlenmiş ve PA miktarının 500µl linoleik asit ilave edilmesi ile 0. (sıfır) saatte %22.7, 36. saatte %33.8 ve 72. saatte %22.4 olarak ölçülmüştür. Bu değerler kontrol grubu ile karşılaşırıldığında linoleik asit ilavesinin palmitik asit miktarına etki ettiği şeklinde yorumlanmıştır. Stearik asit miktarında ise 0. (sıfır) saatte %19.4, 36. saatte %45.8 ve 72. saatte %25.4 olduğu görülmüştür. Linoleik asit ilavesinin stearik asit miktarında önemli bir değişikliğe yol açmadığı görülmüştür. Behenik asit miktarı 0. saatte %2.5, 36. saatte %11.5 ve 72. saaatte %3.1 olarak ölçülmüştür. Oleik asit miktarında linoleik asit ilavesi ile dikkat çekici bir artış 0. saatte % 45.8 ile gözlemlenmektedir. Oleik asit miktarı 36. saatte hızlı bir azalış ile %8.7 ve 72. saatte %9.3 olarak ölçülmüştür. Yağ asitlerinin parçalanması ve bir başka yağ asitininin oluşması konusunda *Feramyces sp* GMLF 92 fungusunun oleik asiti parçalayabilme yeteneği bu sonuçların ortaya çıkmasının sebebi olarak gösterilebilmektedir. Yağ asiti sentezlenme ve parçalanmaları üzerine gerçekleştirilen Kim ve ark. (2008)'deki çalışma ile paralellik göstermemektedir. Çünkü Kim ve ark. (2008) çalışmalarında linoleik asit ile gelişen kültürlerin yağ asiti kompozisyonlarında azalma ve gelişememe sonuçları ile karşılaşmışlardır. *Piromyces communis* M014 için gerçekleştirilen çalışmada linoleik asit ilavesinin inhibe edici olduğu rapor edilmiştir (Kim ve ark., 2008).

Linoleik asit (LA) ilave edilerek geliştirilen *Feramyces sp* GMLF 92 izolatı için linoleik asit miktarının artırılması (1000 µl) gelişimi üzerine hiçbir olumsuz etki göstermemiştir. Yağ asiti kompozisyonu incelendiğinde GMLF 92 suşu PA miktarı 0.saatte %21.8, 36. saatte 19.9 ve 72. saatte 29,8 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.20). SA

miktarınnın ise 0. (sıfır) saatte %19, 36. saatte %38.8 ve 72. saatte %30.4 olduğu tespit edilmiştir. SA miktarının 36. saatte maksimum seviyeye ulaştığı ve 72. saatte ise tekrar düştüğü görülmüştür.

Çizelge 4.20 *Feramyces sp* GMLF 92 fungal izolata ait yağ asiti kombinasyona ait bazı yağ asitleri ve yüzdelik alanları.

Neocallimastix sp GMLF 92	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	23,5	24,9	13,7
Stearik Asit (C18:0)	34,6	42,4	19,3
Behenik Asit (C22:0)	8,4	4,7	5,7
Oleik Asit (C18:1n9c)	12,7	7,5	11,9
Linoleik Asit (C18:2n6c)	5,1	5,8	1,6
Konjuge Linoleik Asit	3,6	-	46,8
Neocallimastix sp GMLF 92+500μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	22,7	33,8	22,4
Stearik Asit (C18:0)	19,4	45,8	25,4
Behenik Asit (C22:0)	2,5	11,5	3,1
Oleik Asit (C18:1n9c)	45,8	8,7	9,3
Linoleik Asit (C18:2n6c)	4,4	-	1,3
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-
Neocallimastix sp GMLF 92+1000μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	21,8	19,9	29,8
Stearik Asit (C18:0)	19	38,8	30,4
Behenik Asit (C22:0)	2,1	4,4	3,7
Oleik Asit (C18:1n9c)	54,7	20,5	17,7
Linoleik Asit (C18:2n6c)	1,6	5,4	2,7
Konjuge Linoleik Asit	-	-	9,5

Yağ asitleri linoleate izomeraz (LAI) aktivitesini engellediğinden substrat içindeki yağ asiti çift bağları önemlidir. Ayrıca hidrofobik etkileşim ile 16 karbon atomundan daha

uzun doymamış yağ asitleri enzim aktivitelerini inhibe ettiğinden dolayı önemlidir (Gorissen ve ark., 2015). Enzim aktivitesinin inhibe edilebilmesi yağ asitleri konsantrasyonuna bağlı olabildiği belirlendiğinden *Feramyces sp* GMLF 92 fungusunun linoleik asitten konjuge linoleik asit üretiminin gerçekleşmemesi diğer yağ asitlerinin miktarının yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Mikrobiyal yağ asitlerinin üretiminde ve çeşitliliğinde besi yeri içeriğine katılan maya özütü, enerji kaynakları ve yağların etkisinin olduğu görülmüştür (Owaga ve ark. 2008). Bu etmenler değerlendirildiğinde *Feramyces sp* GMLF 92 fungal izolatına ait yağ asiti kompozisyonundaki palmitik asit, stearik asit, behenik asit, oleik asit ve linoleik asit miktarlarnın diğer fungal izolatlardan farklı olmasının besi yerindeki potansiyelleri doğrultusunda olduğu düşünülmektedir.

4.3.8. *Piromyces sp* GMLF 202 İzolatına Ait Yağ Analizi Sonucu

Yağ asit kompozisyonları belirlenen *Piromyces sp* GMLF 202 suşuna ait linoleik asit eklenmemiş ve eklenmiş gelişimler Çizelge 4.21'de gösterilmiştir. Linoleik asit eklenmemiş gelişimlerde palmitik asite ait 0, 36 ve 72 saatlik gelişimlerdeki yüzdelik alanları sırası ile % 3.5 , % 6.5 ve % 0 olarak ölçülmüştür. Palitik asit miktarı 0 (sıfır) saatlik gelişimden 36 saatlik gelişime doğru artış göstermişken 72 saatlik gelişim sonunda ortamda ölçülemeyecek kadar az bir alana sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer yağ asiti stearik asit miktarı incelendiğinde 0 (sıfır) saatlik gelişimde % 20, 36 saatlik gelişimde % 41.2 ile 2 kat artmış ve 72 saatlik sürede % 50 ile tüm yağ asiti kompozisyonu içerisinde en fazla alana sahip olmuştur. Behenik asit, linoleik asit ve konjuge linoleik asit miktarına ise linoleik asit eklenmemiş hiçbir gelişim süresinde rastlanmamışken oleik asit yalnızca 0 (sıfır) saatlik gelişimde %39.8 yüzdelik alana sahiptir.

Linoleik asit eklenerek (500µl) geliştirilen *Piromyces sp*. GMLF 202 fungal izolatı için yağ asiti kompozisyonu içerisindeki palmitik asit 0 saatlik gelişimde gözlenmemiş ancak 36 ve 72 saatlik gelişim sürelerinde sırası ile % 2 ve % 29 olarak ölçülmüştür. Palmitik asit miktarı 36 saatlik gelişimden 72 saatlik gelişime kadar 10 kat artmıştır. Stearik asit miktarı 0. (sıfır) saatte % 32.9, 36 saatlik gelişimde %4.1 ve 72 saatlik gelişimde %22.6 olarak belirlenmiştir. Stearik asit gelişim süresi içerisinde önce 8 kat düşüş göstermiş ardından tekrar 5 katı kadar artış göstermiştir. Linoleik asit ilave edilen gelişimde behenik asit 0 ve 36 saatlik gelişimlerde gözlemlenmezken 72 saatlik gelişimde % 6.1'lik bir alana sahip olduğu belirtilmiştir. Diğer yağ asiti oleik asit miktarının 0 saatlik gelişimde yağ asiti kompozisyonunun % 59.1'lik alanına sahip olduğu, 36 saatlik gelişim

sonunda ölçülebilecek bir alana sahip değilken 72 saatlik gelişim sonunda % 26.1 alana sahip olduğu rapor edilmiştir. Linoleik asit miktarı 0 saatte % 2.2 36 saatte kullanılarak ortamda bulunmadığı 72 saatte yeniden dönüştürülerek % 2.9 'luk bir alana sahip olduğu görülmüştür. Linoleik asitten konjuge linoleik asit oluşumu *Piromyces sp.* GMLF 202 izolatında net olarak görülmektedir. İlk gelişim zamanı 0 (sıfır) saatlik sürede KLA gözlemlenmezken LA miktarının olmadığı 36 saatlik zaman diliminde yağ asiti kompozisyonununun %90'ını oluşturduğu ancak 72 saatlik gelişimde ise linoleik asit dönüşümünün yeniden başlaması sebebiyle ölçülemediği gözlemlenmiştir.

Yağ kompozisyonundaki değişimin gözlemlenebilmesi için ilave edilen 1000µl 5mg/ml linoleik asit ile gelişim gösteren *Piromyces sp* GMLF 202 fungal izolata ait palmitik asit miktarı 0. (sıfır) saatte %26.9, 36. saatte %11.4 ve 72. saate ise % 11.6 olarak belirleniştir. Palmitik asit miktarının 0 (sıfır) saatlik gelişimde en yüksek seviyede olduğu görülmüştür. Stearik asit miktarı 0. (sıfir) saatte ve 36. saatte gözlemlenmezken 72. saatte %9.9 olarak ölçülmüştür. Bu durumun tersi olarak behenik asit ise 0. saatte % 4,7 olarak ölçülürken diğer gelişim zamanlarında bu yağ asitine rastlanmamıştır. Linoleik asit ve konjuge linoleik asit miktarları ise *Piromyces sp* GMLF 202 için oldukça önemli miktarlardadır. LA miktarı 0 (sıfır) saatlik gelişimde %1 36. saatte %1,1 ve 72 saatte gözlemlenmezken KLA miktrarı 36. saatte yağ asiti kompozisyonunun %51.6'lık alanını oluşturmaktadır.

Yağ asitlerinin var olduğu gelişim ortamlarında AGF içerisinde yer alan *Neocallimastix frontali*s'in gelişiminin yavaşladığı ancak az miktarda da olsa KLA üretebildiği Maia ve ark. (2007) çalışmalarında belirtilmiştir. *Piromyces sp* GMLF 202'ye ait yağ asiti kompozisyonlarında GMLF 202'nin gelişiminde herhangi bir gerilemenin gerçekleşmediği ve oldukça yüksek miktarlarda KLA üretebildiği görülmektedir.

Filamentli fungusların KLA üretebilme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. *Delacroixia coronata* IFO8586, *M. isabellina* IFO 8572 gibi suşların 100 µg/ml'den fazla KLA üretebildiği Ando ve ark. (2009) tarafından bildirilmiştir. Bu da yalnızca anaerobik gut funguslarının değil, fungusların genelinde bu özelliğin aktif olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan *Piromyces sp.* GMLF 202 izolatınında diğer AGF 'ler içerisinde en yüksek yağ asiti (Konjuge linoleik asit) üretim potansiyeline sahip olduğu görülmüştür.

Maya ve mantarların konjuge linoleik asit üretimini gerçekleştirdiği gibi patojen maya grubunda bulunan *Candida albicans* türüne ait bireylerde konjuge linoleik asit inhibe edici etki göstermektedir. Birçok yağ asitinin özellikle konjuge linoleik asitin *Candida*

bireylerinin hifa gelişimlerini olumsuz etkilediği gözlemlenmiştir (Shareck ve ark., 2011). Ancak GMLF 202 fungal izolatının KLA varlığında rizodial yapılarında ya da gelişim fazlarında herehangi bir olumsuz etkiye rastlanmamıştır.

Çizelge 4.21 *Piromyces sp* GMLF 202 numaralı izolata ait yağ asiti kompozisyonları içerisindeki bazı yağ asitlerinin miktarlarına ait yüzdelik alanlar

Piromyces sp GMLF 202	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	3,5	6,5	-
Stearik Asit (C18:0)	20,1	41,2	50,4
Behenik Asit (C22:0)	-	-	-
Oleik Asit (C18:1n9c)	39,8	-	-
Linoleik Asit (C18:2n6c)	-	-	-
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-
Piromyces sp GMLF 202 +500μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	-	2,0	29,6
Stearik Asit (C18:0)	32,9	4,1	22,6
Behenik Asit (C22:0)	-	-	6,1
Oleik Asit (C18:1n9c)	59,1	-	26,1
Linoleik Asit (C18:2n6c)	2,2	-	2,9
Konjuge Linoleik Asit	-	90,2	-
Piromyces sp GMLF 202+1000μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	26,9	11,4	11,6
Stearik Asit (C18:0)	-	-	9,9
Behenik Asit (C22:0)	4,7	-	-
Oleik Asit (C18:1n9c)	65,8	33,6	61,0
Linoleik Asit (C18:2n6c)	1,1	1,0	-
Konjuge Linoleik Asit	-	51,6	-

4.3.9. *Ruminococus albus* SY3 ve *Feramyces sp* GMLF 30 Kokültür Gelişimlerine Ait Yağ Asiti Kompozisyonları

Kombinasyonlu gelişimlerin yağ asiti miktar ve kompozisyonlarına etkisini belirlemek amacı ile *R.albus* ve *Feramyces sp* GMLF 30 numaralı izolatın kokültür gelişimi sonucu yağ asitleri kompozisyonları içerisindeki bazı yağ asitleri ve yüzde miktarları Çizelge 4.22'de gösterilmiştir.

Kombinasyonlu gelişimin linoleik asit ilave edilmeden gerçekleştirildiği 0. saatteki yağ asitleri içerisindeki palmitik asit miktarı % 27, 36. saatte % 30 ve 72. saatte % 32.4 olarak belirlenmiştir. Palmitik asit miktarının gelişim süresi uzadıkça arttığı gözlemlenmiştir. Stearik asit miktarı 0 saatlik gelişimde % 43.7 36 saatlik gelişimde % 49 ve 72 saatlik gelişimde % 56.7 olarak belirlenmiştir. Behenik asit ise zaman uzadıkça miktarı azalan bir yağ asiti olarak belirlenmiş ve 0 (sıfır) saatte % 22,8 36 saatte % 14.5 ve 72 saatte % 10 'a düştüğü gözlemlenmiştir. Oleik asit 0 (sıfır) saatlik gelişim dışındaki gelişimlerde ölçülememiş 0 (sıfır) saatlik gelişimdeki miktarı ise % 2.5 olarak belirlenmiştir. Linoleik asit miktarı ise 0 (sıfır) saatlik gelişimde % 2 olarak belirlenirken sonraki gelişimlerde gözlemlenememiştir. KLA için ise hiçbir gelişimde sonuç alınamamıştır.

Linoleik asit ilave edilerek kombinasyonlu gelişimlerin yağ asiti kompozisyonuna etkisinin belirlenmesi için 500 µl ilave edilerek kokültür geliştirilen *Ruminococcus albus* SY3 ve *Feramyces sp* GMLF 30 fungus izolatı için palmitik asit miktarı 0 (sıfır) saatlik gelişimde %17,2 36 saatlik gelişimde %14 ve 72 saatlik gelişimde ise % 4.7 olarak ölçülmüştür. Palmitik asit miktarı gelişim süresi uzadıkça azalma eğrisi göstermektedir. Stearik asit miktarı 0 (sıfır) saatlik gelişimde %16.7 olarak 36 saatlik gelişimde %14.4 ve 72 saatlik gelişimde ise % 8.4 olarak belirlenmiş ve azalış gösterdiği görülmüştür.

Kokültür çalışmalarında linoleik asitinde etkisinin belirlenmesi amacıyla linoleik asit eklenmiş ve daha sonra linoleik asit miktarı da arttırılarak (1000µl) yağ asiti kompozisyonundaki değişimler gözlemlenmiştir. Kokültür gelişim sonucu *Ruminococcus albus* SY3 ve GMLF 30 suşlarına ait PA 0. saatte % 22.7 olarak belirlenirken 36. saatte bu değer %18.9 oranına düşmüş ancak 72. saatte % 29 oranına tekrar yükselmiştir. SA miktarı ise ilk zaman dilimi 0. (sıfır) saatte % 34.4, 36. saatte % 21.9 ve 72. saatte % 30 olarak ölçülmüştür. PA ve SA miktarları 36. saatte düşüş gösterirken 72. saatte tekrar artış göstermiştir. Bu da yağ asitlerinin üretimlerinin 72 saate kadar devam edebileceğini göstermektedir. BA miktarı ise zaman dilimleri içerisinde gittikçe azalış göstermiştir. Bu

oranlar ise sırası ile % 1.8-10 ve %2.5 oranında ölçülmüştür. Yağ asitleri içerisinde en belirgin düşüşü Oleik asit miktarının 0. (sıfır) saatte %30 oranından 36. saatte % 3.1'e kadar düştüğü 72. saatte ise ölçülememiştir. Linoleik asit ise yalnızca 36 ve 72 saatlerde ölçülebilmiş olup sırası ile % 2 ve % 2.1 oranındadır. KLA ise hiçbir zaman diliminde ölçülememiştir.

Çizelge 4.22 *Ruminococcus albus* SY3 ve *Feramyces sp.* GMLF 30'a ait yağ kompozisyonları içerisndeki bazı yağ asitlerinin yüzdelik miktarlar

Ruminococcus albus SY3+ *Feramyces sp* GMLF 30	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	27	30	32,4
Stearik Asit (C18:0)	43,7	49	56,7
Behenik Asit (C22:0)	22,8	14,5	10
Oleik Asit (C18:1n9c)	2,5	-	-
Linoleik Asit (C18:2n6c)	2	-	-
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-
Ruminococcus albus SY3+ *Feramyces sp* GMLF 30 +500μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	17,2	14	4,7
Stearik Asit (C18:0)	16,7	14,4	8,4
Behenik Asit (C22:0)	2,5	2	5,3
Oleik Asit (C18:1n9c)	54,6	27,2	5,3
Linoleik Asit (C18:2n6c)	3,2	10,2	5,5
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-
Ruminococcus albus SY3+*Feramyces sp* GMLF30 +1000μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	22,7	18,9	29
Stearik Asit (C18:0)	34,4	21,9	30
Behenik Asit (C22:0)	11,8	10	2,5
Oleik Asit (C18:1n9c)	30	3,1	-
Linoleik Asit (C18:2n6c)	-	2	2,1
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-

Kokültür gelişimleri ile *Ruminococcus albus* SY3 ve *Feramyces sp* GMLF 30 suşlarının saf kültür gelişimleri karşılaştırıldığında yağ asiti kompozisyonlarındaki oranların kontrol grubu olan linoleik asit ilave edilmeyen gelişimde tüm inkübasyon süreleri için Palmitik asit, oleik asit, linoleik asit ve konjuge linoleik asit için düşüş gösterdiği ancak stearik asit ve behenik asit için artış gösterdiği görülmüştür. Aynı karşılaştırma 500µl linoleik asit ilave edilerek gelişim gösteren ve yağ asiti kompozisyonları elde edilen sonuçlara göre ise palmitik asit, oleik asit, stearik asit için azalırken linoleik asit değeri arttığı halde konjuge linoleik asit değerinde bir değişiklik gerçekleşmemiştir. Yağ asiti miktarı 1000µl' ye çıkarıldığıda ise kokültür ve saf gelişimler karşılaştırıldığında palmitik asit, stearik asit, behenik asit ve miktarlarında artış gerçekleşirken oleik asit, linoleik asit ve konjuge linoleik asit miktarlarında azalış görülmüştür. Bu değerler kokültür ile geliştirmenin özellikle konjuge linoleik asit üretimi üzerine olumsuz etki göstererek üretimi durdurduğunu belirlemiştir. Çünkü saf kültür geliştirmelerin her bir zaman diliminde konjuge linoleik asit üretimi ölçülebilirken kokültür gelişimlerin hiçbir gelişim zaman dilimlerinde KLA üretimine rastlanmamıştır. Oleik asit miktarı her iki suşun saf gelişimlerinde %50 üzerinde orana sahipken kokültür gelişiminde bu değerler %3 oranlarına kadar düşebilmiştir. Oleik asit miktarının da kokültür gelişimlerinden etkilendiği belirlenmiştir.

4.3.10. *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77 Kokültür Gelişimlerine Ait Yağ Asidi Kompozisyonu

Liloneik asiti konjue linoleik asite biyohidrojenasyon ile dönüştürdüğü bilinen *B. fibrisolvens* JW11 ile küresel rizodial yapıya sahip olan GMLF 77 suşlarının kokültür gelişimleri, kültür çalışmalarında kullanılan besi yerlerine linoleik asit ilave edilerek gelişimleri sonucu elde edilen yağ asiti kompozisyonlarından bazıları Çizelge 4.23'de gösterilmiştir. Kokültür gelişim sonucu PA'nın yağ asitleri içerisinde kapladığı alan yüzdesi 0. saatte %39, 36. saatte %12 ve 72. saatte %9.8 olduğu belirlenmiştir. SA'nın kapladığı alan ise 0 (sıfır) saatlik gelişimde % 35.2, 36 saatlik gelişimde %54.9 ve 72 saatlik gelişimde % 13.9 olarak ölçülmüştür. Behenik asit miktarı 0 ve 72 saatlik gelişimlerde ölçülmüş olup sırası ile % 1.9, %2.2 oranlarına sahiptir. Oleik asit ise 0 (sıfır)saatlik gelişimde % 11.7, %21.5 ve % 2.1 oranlarına sahip olduğu belirlenmiştir. Linoleik asit miktarı 0.saatte %2.3, 36. saatte %0.5 ve 72 saatlik gelişimde %0.8 yüzdelik alan olarak belirlenmiştir. KLA miktarına ise hiçbir gelişim süresinde rastlanmamıştır.

Linoleik asit ilave edilerek gelişimleri ve yağ asitleri kompozisyonu belirlenen kokültür çalışması sonucunda palmitik asit 500µl LA ilavesi ile 0. (sıfır) saatte %16.5, 36. saatte %14'e düşmüş 72 saatte ise %17.6 ya çıkmıştır. Aynı koşulllarda stearik asit miktarı 0. (sıfır) saatte %18.8, 36 saatte %19 ve 72 saatte %22.4 oranına yükselmiştir. Behenik asit ise linoleik asit varlığında 0., 36. ve 72. saatlerde ölçülmüş olup sırası ile %5.1, % 6.3 ve % 3.1 olarak ölçümüştür. Oleik asit linoleik asit varlığında sırası ile %55.9, %48.9, %46.5 olarak ve linoleik asit ise %1.4, %3.9, %2.9 oranında ölçülmüştür. Linoleik asit varlığında konjuge linoleik asit üretimi yalızca 72 saatlik gelişim sonunda görülmüş ve % 0.7 olarak ölçülmüştür. Linoleik asitin 1000 µl olarak eklendiği kokültür gelişimlerindeki palmitik asit yüzde alanı 0. saatte %17.8, 36. saatte %4.7 ve 72. saatte %9.2 olarak, stearik asit miktarı gelişim zamanlarına göre sırası ile %18.7, %4.4, %7.2 olarak, behenik asit yüzde alanı 0 (sıfır) ve 72 saatlik gelişimlerde gözlemlenmiş olup 0 saatlik gelişimde % 2.4, 72 saatlik gelişimde ise %1.8 alan yüzdesine sahiptir. Oleik asit miktarı ölçülmüş ve 0 saatlik gelişimde %58.7, 36 saatlik gelişimde %24.2 ve 72 saatlik gelişimde %73.9 alan yüzdesi ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Linoleik asit miktarı linoleik asit ilave edildiği halde düşüş göstermiş ve 0. saatte % 1.2 36. saatte %1.7 ve 72 saatte % 0.5'lik bir alana sahiptir. KLA miktarı LA ilavesi ile maksimum seviyeye ulaşmış olup 36. saatte %50.6 'lık bir yüzdelik alana sahipken bu değer 72 saat sonunda 0.8 olarak ölçülmüştür.

Kokültür gelişimleri ile saf kültür gelişimleri karşılaştırılan *B.fibrisolvens* JW11 ile *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatına ait linoleik ait ilavesi olmayan gelişimlerdeki palmitik asit, behenik asit, linoleik asit miktarı azalmış, stearik asit, oleik asit miktarında artış gözlemlenmiş konjuge linoleik asit miktarında bir değişiklik meydana gelmemiştir. Linoleik asit ilavesinin 500 µl olduğu kokültür gelişimi saf kültürler ile karşılaştırıldığında palmitik asit, stearik asit, behenik asit yüzdelik alanında önemli bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir. Oleik asit, linoleik asit ve KLA miktarında ise azalma görülmektedir. Linoleik asitin 1000 µl olarak eklendiği kokültür çalışmaları ile saf gelişimler sonucu elde edilen yağ asitleri kompozisyonları karşılaştırıldığında palmitik asit, stearik asit, behenik asit, oleik asit, linoleik asit ve konjuge linoleik asit yüzdelik alanlarının her iki mikroorganizmanın saf gelişim yüzdelerinden düşük olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.23 *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77 suşlarına ait kokültürlü gelişimleri sonucu elde edilen yağ asiti kompozisyonları içerisindeki bazı yağ asitlerine ait alan yüzdeleri

Butrivibriyo fibrisolvens JW11+ *Caecomyces sp* GMLF 77	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	39	12	9,8
Stearik Asit (C18:0)	35,2	54,9	13,9
Behenik Asit (C22:0)	1,9	-	2,2
Oleik Asit (C18:1n9c)	11,7	21,5	2,1
Linoleik Asit (C18:2n6c)	2,3	0,5	0,8
Konjuge Linoleik Asit	0	0	0
Butrivibriyo fibrisolvens JW11+*Caecomyces sp* GMLF 77+500μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	16,5	14,4	17,6
Stearik Asit (C18:0)	18,8	19	22,4
Behenik Asit (C22:0)	5,1	6,3	3,1
Oleik Asit (C18:1n9c)	55,9	48,9	46,5
Linoleik Asit (C18:2n6c)	1,4	3,9	2,9
Konjuge Linoleik Asit	-	-	0,7
Butrivibriyo fibrisolvens JW11+*Caecomyces sp* GMLF 77+1000μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	17,8	4,7	9,2
Stearik Asit (C18:0)	18,7	4,4	7,2
Behenik Asit (C22:0)	2,4	-	1,8
Oleik Asit (C18:1n9c)	58,7	24,2	73,9
Linoleik Asit (C18:2n6c)	1,2	1,7	0,5
Konjuge Linoleik Asit	-	50,6	0,8

4.3.11. *Ruminococcus albus* SY3 *Caecomyces sp.* GMLF 77 Kokültür Gelişimlerine Ait Yağ Asidi Kompozisyonları

Rumen bakterileri (*R.albus* SY3) ve anaerobik gut funguslarının (*Caecomyces sp* GMLF 77) kokültür gelişimlerinin, kokültür gelişimlerine linoleik asit ilavesi ile

gelişmelerinin yağ asiti kompozisyonuna etkisi araştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.24'de gösterilmiştir. Kokültür geliştirilme sonucu Palmitik asit, stearik asit, behenik asit, oleik asit, linoleik asit ve konjuge linoleik asit gibi yağ asitleri seçilmiş ve bu yağ asitlerine göre yorumlanmıştır. Yağ asitleri içerisindeki palmitik asit miktarı 0. saatte % 32.6 oranında, 36. saatte %34.1 oranında ve 72. saatte ise %29.3 oranında ölçülmüştür. Stearik asit miktarları ise 0. saatte %38, 36. saatte %32.6 ve 72. saatte %33.5 olarak belirlenmiştir. Behenik asit miktarı 0.,36. ve 72 saatlik gelişimlerindeki sıralamaya göre %15.3, %6.6 ve %9.4 olduğu görülmektedir. OA alan yüzdesi 0 saatlik gelişimde %1.4 oranında 36 saatlik gelişimde %9 ve 72 saatlik gelişimde %9.5 oranında ölçülmüştür. Linoleik asit ilavesi olmadan gerçekleştirilen bu grupta linoleik asit miktarı 0. saate %1.4, 36. saatte %2.2 ve 72 saatte %4.1 oranında oduğu belirlenmiştir. Hirbir gelişim süresinde KLA yüzdelik alanı ölçülmemiştir. Linoleik asit ilavesi ile kokültürlerin gelişimleri sonucu yağ asiti kompozisyonlarına göre 500 µl Linoleik asit eklendiğinde palmitik asit miktarı 0. saatte %32.6, 36. saatte % 34.1 ve 72. saatte %29.3 olarak belirlenmiştir. Stearik asit miktarı ise gelişim saatleri sırasına göre %38, % 32.6 ve %33.5 oranına sahiptir. Behenik asit yüzdelik alanı yalnızca 0. saatte %13.4, 36. saatte %15.4 olarak ölçülmüştür. Oleik asitin diğer yağ asitleri içerisindeki yüzdelik alanı 0 saatlik gelişimde % 18.4 iken 36. saatte bu değer %7.7 oranına düşmüş ve 72 saatlik gelişimde ise tekrar %16.8 oranına yükselmiştir. Linoleik asit ve KLA'ya ait yağ yüzdelik alanları ise yalnızca 72 saatlik gelişimde belirlenmiş ve sırası ile %15,8 ile %10,7 oranında tespit edilmiştir. Linoleik asit ilavesinin 1000 µl'ye çıkarıldığı kokültür denemesine ait yağ asiti kompozisyonları içerisindeki palmitik asite ait 0 (sıfır) saatlik gelişim % 21.9, 36 saatlik gelişimdeki miktarı % 22.2 ve 72 saatlik gelişimdeki miktarı ise % 33.7 olarak belirlenmiş olup gelişim süresi arttıkça palmitik asit miktarıda artış göstermiştir. Yağ asitleri içerisindeki stearik asit için 0. saatteki miktarı % 29.2 oranındayken 36. saatte %10.3 oranına düşmüş ve yine palmitik asitte olduğu gibi 72 saatlik gelişimde bu değer %54.3'e çıkmıştır. Stearik asitin mikrobiyal gelişim gelişim süresi uzadıkça artmasının yağ asitlerinin biyohidrojenasyon reaksiyonun son ürünü olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Kemp ve Lander, 1984). Genel olarak yağ asiti kompozisyonları içerisinde düşük yüzdeye sahip olan BA miktarı ise 0. saatte % 3.5 oranına 36. saatte % 1 ve 72. saatte %10.4 oranında tespit edilmiştir. Oleik asit ve linoleik ise yalnızca 0 ve 36 saatlerde ölçülmüş olup 72. saatte sırası ile %29.3 ve % 3.4 olarak 36. saatte ise %49.7 ve %2.2 oranına sahip oldukları görülmüştür. KLA miktarına ise hiçbir inkübasyon süresinde rastlanmamıştır.

Çizelge 4.24 *R.albus* SY3 *Caecomyces sp* GMLF 77 Kokültür Gelişimlerinin Yağ Analizi sonucu elde edilen yağ asitlerinden bazılarına ait farklı gelişim zamanlarındaki yüzdelik alanları

Ruminococcus albus SY3+ *Caecomyces s*p GMLF77	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	32,6	34,1	29,3
Stearik Asit (C18:0)	38	32,6	33,5
Behenik Asit (C22:0)	15,3	6,6	9,4
Oleik Asit (C18:1n9c)	4,1	9	9,5
Linoleik Asit (C18:2n6c)	1,4	2,2	4,1
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-
Ruminococcus albus SY3+ *Caecomyces sp* GMLF77+500**µl** Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	29	27,5	2,3
Stearik Asit (C18:0)	38,7	44,1	2,3
Behenik Asit (C22:0)	13,4	15,4	-
Oleik Asit (C18:1n9c)	18,4	7,7	16,8
Linoleik Asit (C18:2n6c)	-	-	15,8
Konjuge Linoleik Asit	-	-	10,7
*Ruminococcus albu*s SY3+ *Caecomyces sp* GMLF77+1000µl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	21,9	22,2	33,7
Stearik Asit (C18:0)	29,2	10,3	54,3
Behenik Asit (C22:0)	3,5	1	10,4
Oleik Asit (C18:1n9c)	29,3	49,7	-
Linoleik Asit (C18:2n6c)	3,4	2,2	-
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-

Saf kültür ve kokültür gelişimlerinin sonuçları karşılaştırıldığında Palmitik asit, stearik asit, behenik asit, oleik asit miktarlarının linoleik asit ilave edilmeden geliştirildiğinde önemli bir azalış veya artış gerçekleştirmediği görülürken linoleik asit yüzdelik alanında azalma sözkonusu olmuştur. KLA oranında ise bir değişiklik gerçekleşmemiştir. Linoleik asit ilavesi ile 500 µl'lik miktardaki gelişimlerde kokültür ve

saf kültür gelişimlerinin karşılaştırılmasına göre palmitik asit, stearik asit, behenik asit, linoleik asit, konjuge linoleik asit miktarlarında bir artış görülürken oleik asit miktarında düşüş olduğu belirlenmiştir. Linoleik asit eklenmesinde 1000 µl miktarıdaki kokültür gelişimi ve saf kültür gelişimleri incelendiğinde palmitik asit, stearik asit, behenik asit ve linoleik asit yüzdeleri artış gösterirken oleik asit ile konjuge linoleik asit miktarında azalma meydana geldiği belirlenmiştir.

4.3.12. *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 ve *Ruminococcus albus* SY3 Kokültürüne Ait Yağ Asidi Kompozisyonu

Rumen bakterilerinin bir arada geliştirilmelerinin bakteriyel yağ asitlerine etkisi araştırılmıştır Kokültür geliştirmede *B.fibrisolvens* JW11ve *R.albus* SY3 kullanılmıştır. Aynı zamanda kokültür gelişimlerine linoleik asit eklenmesininde yağ asiti kompozisyonuna etkiside araştırılmış ve bu sonuçlar Çizelge 4.25'de özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre palmitik asit linoleik asit ilavesiz ortamda 0. saatte % 24.4 oranına 36. saatte %27.8 oranına ve 72. saate ise % 26.9 yüzdelik oranına sahiptir. Aynı koşullarda stearik asit oranı incelendiğinde 0. saatte % 38.4, 36. saatteki oranı ise % 36.7 ve 72 saatlik gelişimde ise % 34.4 olarak belirlenmiştir. Behenik asit oranı 0, 36 ve 72. saatlerde sırası ile %19.7, %23 ve %32.2 oranında hesaplanmıştır. Oleik asit ise yalnızca 36. ve 72. saatlerde ölçülmüş olup %1.3 ve %2.9 oranlarına sahiptir. Linoleik asit miktarıda oleik asit gibi yalnızca 36. ve 72. saatlerde % 1.2 ve % 3.1 olarak ölçülmüştür. Konjuge linoleik asit miktarına ise bu koşullarda rastlanmamıştır. Linoleik asit ilave edilen (500 µl) kokültür gelişimlerdeki yağ asiti kompozisyonları içerisinde palmitik asit miktarı 0.saatte % 35.9 oranındayken 36. saatte %29.5 'e düşmüş ve 72. saatte ise miktarı tekrar düşerek % 0.2 oranına ulaşmıştır. SA miktarı yağ asitleri içerisinde 0. saatteki oranı % 20.5 iken 36. saatte % 18.8 oranına düşmüş 72. saatte ise yüksek oranda düşerek % 0.4 oranına düşmüştür. Behenik asit miktarıda palmitik asit ve stearik asit gibi 0. saatte % 3.3 oranından 36. saatte % 3.9 a çıksada 72. saatte % 0.3 oranına düşmüştür. oleik asitin yağ asitleri içerisindeki oranında gelişim süresinin artması ile ters orantılı olarak azalış olup 0. saatte % 22.4 oranından 36. saatte % 17.5 oranına ve 72 saat sonunda ise % 0.1 oranına kadar düştüğü görülmüştür. Linoleik asit miktarıda diğer yağ asitlerinden farklı sonuç göstermemiş olup gelişim sürelerince 0. saatte % 2.8 oranındayken 36. saatte % 5.2 oranına yükselmiş ancak 72. saatte önemli derecede düşüş göstererek %0.4 olarak ölçülmüştür. Belirlenen yağ asitlerinin oldukça düşük bu yüzdelik alanlarınnın zıttına KLA sadece diğer yağ asiterinin maksimum düşüş gösterdiği gelişim zamanı olan 72. saatte %95.9 oranında yağ asitlerinin

neredeyse tamamını oluşturacak düzeyde ölçülüştür. Bu kokültür gelişiminin konjuge linoleik asit üretimi ve diğer yağ asitlerinin tüketilmesi üzerine pozitif yönde etki ettiği belirlenmiştir. Linoleik asit ilavesinin diğer bir parametresinde (1000 µl) ise palmitik asit yağ asitleri içerisinde 0. saatlik gelişimde % 17.2 oranında olduğu 36. saatte bu oranın %26 oranına yükseldiği ve son gelişim saati 72. saatte % 21.8 oranına düşmüş olsada budeğerler diğer parametreye göre yüksektir. Stearik asit miktarı yağ asitleri içerisinde 0. saatte % 22.9 yüzdelik alanına sahipken 36. saatte bu oran %49'a ulaşmış ancak 72. saatlik gelişimde % 22'ye düşmüştür. Behenik asit ise stearik asit gibi 36. saatte artış göstermiş olup gelişim süreleri sırasına göre % 4, %24.4 ve % 2.3 olarak ölçülmüştür. Oleik asit yalnızca 0. ve 72. saatte ölçülmüş ve %55.7 ile % 49 oranlarında olduğu belirlenmiştir. Linoleik asite sadece 72. saatte rastlanmış ve % 4.4 oranında ölçülmüştür. Bu şartlarda Konjuge linoleik asit miktarına rastlanmamıştır. Önceki deneme koşulları ile karşılaştırıldığında konjuge linoleik asitin diğer yağ asitlerinin yokluğunda var olduğu görülürken konjuge linoleik asit üretiminin olmadığı koşullarda diğer yağ asitlerinin miktarlarının arttığı gözlemlenmiştir.

Saf kültür gelişimleri ile kokültür gelişimleri karşılaştırıldığında Linoleik asit eklenmemiş gelişimlerdeki *B.fibrisolvens* JW11 ve *R.albus* SY3'e ait yağ asitleri içerisindeki palmitik asit, stearik asit, behenik asit miktarları artarken, oleik asit, linoleik asit ve konjuge linoleik asit miktarlarında azama görülmüştür. Linoleik asit eklemeli ilk deneme (500 µl) sonucuna göre palmitik asit, stearik asit, behenik asit, oleik asit ve linoleik asit 72. saatlik gelişimde azalma gösterirken konjuge linoleik asit miktarında artış göstermiştir. İkinci deneme de (1000 µl) ise palmitik asit miktarında önemli bir artış ya da azalış gözlemlenmemişken stearik asit düşmüş, behenik asit miktarında azalma görülmüş, oleik asit miktarında ise düşüşler gözlemlenmiştir. Diğer yağ asitleri gibi linoleik asit miktarınında düştüğü belirlenmiştir.

B.fibrisolvens için KLA üretim incelenmesi araştırmalarında 3. ve 5. günden sonra üretim miktarlarının artmaya başladığı gözlemlenmiştir (Ando ve ark.,2009). Buna göre *B.fibrisolvens* JW11 ve *R.albus* SY3'e ait 500 µl LA ilaveli kokültür gelişimlerindeki 36 saatlik ve 72 saatlik gelişimlerde KLA miktarına rastlanması literatürdeki çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Çizelge 4.25 *B.fibrisolvens* ve *R.albus* SY3 Kokültür Gelişimlerine Ait Yağ asiti kompozisyonundaki bazı yağ asitlerinin yüzdelik alanları

Ruminococcus albus SY3+*Butrivibriyo fibrisolvens* JW11	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	24,4	27,8	26,9
Stearik Asit (C18:0)	38,4	36,7	34,4
Behenik Asit (C22:0)	19,7	23	32,2
Oleik Asit (C18:1n9c)	-	1,3	2,9
Linoleik Asit (C18:2n6c)	-	1,2	3,1
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-
Ruminococcus albus SY3+*Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 +500μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	35,9	29,5	0,2
Stearik Asit (C18:0)	20,5	18,8	0,4
Behenik Asit (C22:0)	3,3	3,9	0,3
Oleik Asit (C18:1n9c)	22,4	17,5	0,1
Linoleik Asit (C18:2n6c)	2,8	5,2	0,4
Konjuge Linoleik Asit	-	-	95,9
Ruminococcus albus SY3+*Butrivibriyo fibrisolv*ens JW11 +1000μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	17,2	26	21,8
Stearik Asit (C18:0)	22,9	49	22
Behenik Asit (C22:0)	4	24,4	2,3
Oleik Asit (C18:1n9c)	55,7	-	49
Linoleik Asit (C18:2n6c)	-	-	4,4
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-

4.3.13. *Feramyces sp.* GMLF 30 ve *Caecomyces sp* GMLF 77 Kokültür Gelişimlerinin Yağ Analizi Sonucu

Kokültür gelişimlerinin yağ asiti üretim miktarlarına etkisinin belirlenmesi amacı ile AGF'ler gelişim eğrileri göz önüne alınarak seçilmiş ve GMLF 30 şusu ile GMLF 77 suşu birlikte geliştirilmiş daha sonra linoleik asit varlığındaki yağ asiti oranlarıda

incelenmiştir (Çizelge 4.26). Linoleik asit ilave edilmeyen gelişimlerin 0. (sıfır) saatinde PA miktarı % 33.2, 36 saatte % 30 ve 72 saatte % 33.4 olarak ölçülmüştür. SA miktarı 0. (sıfır) saatte % 38.1, 36. saatte % 30 düşmüş olup 72 saatte % 45.2 oranına çıkmıştır. BA miktarıda PA ve SA gibi 0. (sıfır) saatte inkübasyon sürelerine göre yüksek olup % 7.5 36. saate % 4.5 ve 72 saatte % 4.9 olarak ölçülmüştür. OA miktarı ise 0. (sıfır) saatte %6.2 36. saatte %20 ve 72. saatte %8.2 oranında belirlenmiştir. LA 0. saatte %3.5, 36. saatte % 4.1 ve 72. saate % 1.8 olduğu görülmüştür. LA ölçülebilecek miktarlarda olmasına rağmen KLA üretimi gerçekleşmemiştir.

Palmitik asit miktarı besiyerlerine linoleik asit ilave edildiğinde 0. (sıfır) saatte % 15.4 olarak 36 saatte % 16 ve 72 saatte %20 ile artan bir eğilim göstermektedir. SA miktar da PA gibi artış gösteren bir diğer yağ asiti olmuş olup 0, 36 ve 72 saatlik gelişimlerdeki oranları sırası ile %18, %23 ve %24 olduğu belirlenmiştir. Diğer bir yağ asiti behenik asit gelişim süreleri ilerledikçe artış göstermiş ve en düşük 0. saatte %1.8, 36. saatte % 3 ve en yüksek değerede 72 saatte %3.7 oranı ile ulaşmıştır. Bu artış oranlarının zıttına oleik asit miktarı gelişim süreleri ilerledikçe düşüş göstermiş ve 0. (sıfır) saatte % 55 oranı ile en yüksek, 36. saatte % 36 ile en düşük ve 72. saatte ise % 44 ile yeniden artış gösterdiği görülmüştür. Linoleik asit oranları ise 0. (sıfır) saatte %1.4 36. saatte %2.6 ve 72. saatte % 2 olarak belirlenmiştir. Konjuge linoleik asit miktarına ise rastlanmamıştır. Linoleik asit miktarının arttırıldığı yağ asiti kompozisyonu oranlarında ise palmitik asit 0. (sıfır) saatte %12.9, 36. saatte %12.5 ve 72 saatte ise %15.6 ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Stearik asit miktarı 0 (sıfır) saatlik gelişimde % 12.3, 36 saat gelişim sonunda % 13.4 ve 72 saatlik gelişimin sonunda yükselerek % 17 oranında olduğu gözlemlenmiştir. Behenik asit miktarı 0 saatlik gelişimden 72 saatlik gelişime doğru değişiklik göstermiştir. Buna göre 0 saatlik gelişimde % 16, 36 saatlik gelişimde % 2.4 oranına çıkmış ve 72 saatlik gelişimde ise % 0.7 oranında olduğu görülmüştür. Diğer yağ asitleri içerisinde en yüksek alan oranına sahip yağ asiti oleik asit olarak belirenmiş olup yüzdelik alanları gelişim zamanına göre 0, 36 ve 72 saatteki oranlar % 68.3, %61.4 ve %62 şeklinde ölçülmüştür. Linoleik asit miktarının düşük olduğu belirlenmiş olup gelişim zamanlarına göre 0. saatlik gelişimde % 0.5, 36 saatlik gelişimde % 1.2 ve en uzun gelişim zamanı olan 72 saatlik gelişimde % 0.7 olarak ölçülmüştür. Kokültür gelişiminde konjuge linoleik asit miktarına rastlanmamıştır.

Kokültür gelişimleri ile saf kültür gelişimlerinden elde edilen veriler karşılaştırılmış ve *Feramyces sp* GMLF 30 ile *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatlarına ait linoleik asit ilave edilmeyen grup için palmitik asit, stearik asit, behenik asit, oleik asit, linoleik asit miktarlarının kokültür gelişiminden etkilenmediği, artış ya da azalış görülmediği

belirlenmiştir. Linoleik asit ilave edilen kokültür gelişimlerindeki yağ asiti alan yüzdeleri incelendiğinde ise palmitik asit, sterarik asit, behenik asit miktarlarında bir artış veya azalış gözlemlenmezken oleik asit ve linoleik asit miktarlarında kokültür gelişimlerden olumsuz etkilenerek oranlarının azaldığı belirlenmiştir. Linoleik asit miktarının arttırılarak yağ asiti kompozisyonları incelendiğinde palmitik asit, stearik asit, behenik asit, oleik asit alan yüzdelerinde önemli bir artış ve azalış gözlemlenmemişken linoleik asit ve konjuge linoleik asit alan yüzdelerinde azalış göstermiştir.

Çizelge 4.26 Morfolojik olarak tanımlanan *Feramyces sp*. GMLF 30 ve *Caecomyces sp* GMLF 77 fungal izolatlarının kokültür gelişimlerine ait yağ asiti kompozisyonları

Feramyces sp GMLF 30+ *Caecomyces sp* GMLF77	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	33,2	30	33,4
Stearik Asit (C18:0)	38,1	28,4	45,2
Behenik Asit (C22:0)	7,5	4,5	4,9
Oleik Asit (C18:1n9c)	6,2	20	8,2
Linoleik Asit (C18:2n6c)	3,5	4,1	1,8
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-
Feramyces sp GMLF 30+ *Caecomyces sp* GMLF77 +500μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	15,4	16	20
Stearik Asit (C18:0)	18	23	24
Behenik Asit (C22:0)	1,8	3	3,7
Oleik Asit (C18:1n9c)	55	36	44
Linoleik Asit (C18:2n6c)	1,4	2,6	2
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-
Feramyces sp GMLF 30+ *Caecomyces sp* GMLF77 +1000μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	12,9	12,5	15,6
Stearik Asit (C18:0)	12,3	13,4	17
Behenik Asit (C22:0)	1,6	2,4	0,7
Oleik Asit (C18:1n9c)	68,3	61,4	62
Linoleik Asit (C18:2n6c)	0,5	1,2	0,7
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-

KLA üretimini etkileyebilecek faktörler arasında kullanılan karbon ve azot kaynakları, substratlar, yağ asitleri, pH, tripton konsantrasyonları gibi etkenlerin olabileceği Ando ve ark. (2009) yaptıkları çalışmalarında göstermişlerdir. Kokültür çalışmaları içerisindeki *Feramyces sp* GMLF 30 ile *Caecomyces sp* GMLF 77 fungal izolatlarına ait konjuge linoleik asit miktarı incelendiğinde konjuge linoleik asit miktarının saf kültür gelişimlerinde mevcut olduğu ancak kokültür gelişimlerinde rastlanmadığı görülmüştür. Konjuge linoleik asit üretiminin olmaması yukarıda belirtilen faktörlerin biri ya da birkaçı ile açıklanabilir.

4.3.14. *Feramyces sp* GMLF 30 ve *Neocallimastix* sp GMLF 92 Kokültür Gelişimlerinin Yağ Analizi Sonucu

Farklı cins anaerobik gut funguslarının bir arada geliştirilmelerinde birbirlerinin yağ asiti üretimi üzerine etkisinin belirenmesi amacı ile gerçekleştirilen yağ ekstraksiyonu sonuçları Çizelge 4.27'de gösterilmiştir. Buna ek olarak kokültür geliştirmeye linoleik asit ilavesinin etkilerinin belirlenmesi için gelişim ortamlarına eklenen 500 µl ve 1000 µl LA ile geliştirilen GMLF 30 ve GMLF 92 'ye ait yağ asiti kompozisyonuda belirlenmiştir (Çizelge 4.27).

LA ilavesi gerçekleştirilmeyen gelişim sonucu PA miktarı 0. (sıfır) saatte %30, 36 saatlik gelişimde %29.6 ve 72 saatlik gelişime ise % 9 oranında olduğu görülmüştür. Palmitik asit miktarı gelişim süresi arttıkça azalmıştır. Stearik asit miktarı ise gelişim süresinin artması ile paralellik göstermektedir. Buna göre 0 (sıfır) saatlik gelişimde %57, 36 saatlik gelişimde % 60 ve 72 saatlik gelişimde ise % 85 oranındadır. Bu artışın linoleik asitin biyohidrojenasyonu sonucu son ürün olarak oluşmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Behenik asit miktarı ise stearik asit miktarına zıt olarak gelişim zamanı ile ters orantılıdır. Gelişim zamanına göre 0 (sıfır) saatte %12.3, 36 saatte % 9 ve 72 saatte % 4 oranında ölçülmüştür. İncelenen diğer yağ asitleri olan oleik asit, linoleik asit ve konjuge linoleik asite ise rastlanmamıştır.

Linoleik asit ilave edilen (500µl) kokültürlerdeki yağ asiti kompozisyonuna göre ise palmitik asit 0 (sıfır) saatlik gelişimde %24, 36 saatlik gelişimde % 28 ve 72 saatlik gelişimde ise %21 oranında bir alana sahiptir. Stearik asit yüzde alanı gelişim süresinin artması ile doğru orantılı olarak artmış ve 0 saatlik gelişimde % 57, 36 saatlik gelişimde %60 ve en uzun gelişim süresi olan 72 saatte % 63 ile en yüksek oranda ölçülmüştür. Önceki sonuçlar ile karşılaştırıldığında behenik asit miktarı gelişim süresinin artması ile ters orantılı olarak ölçülmüştür. Sırası ile 0, 36 ve 72 saatlik gelişimlerdeki alan yüzdeleri

%12, %13 ve %5 olarak ölçülmüştür. Oleik asit ise sadece 0 (sıfır) saatlik gelişimde % 29 olarak belirlenmiştir. Linoleik asit ve konjuge linoleik asit yüzdelik miktarları ise diğer yağ asitleri içerisinde en düşük oranlara sahip olarak yalnızca 72 saat gelişim sonunda sırası ile % 6.3 ve %12 olarak ölçülmüştür. Kokültür çalışmaları ile saf kültür çalışmalarına yağ asitleri içerisinden LA eklenmesi ile gerçekleştirilen çalışmaya ait yağ kompozisyonları da karşılaştırılmıştır. Linoleik asitin 500 µl olarak eklendiği ve gelişimin 0, 36 ve 72 saat sürdürüldüğü ve yağ asiti kompozisyonlarnın karşılaştırılmasında ise PA miktarının önemli bir artış ya da azalış göstermediği, SA ve BA miktarlarının artış gösterdiği ancak OA ve LA miktarlarının önemli derecede azalış gösterdiği belirlenmiştir. KLA miktarı ise her iki suşun saf kültür gelişimlerinde belirlenememişken kokültür gelişiminde LA eklenmesi ile arttığı tespit edilmiştir. Buda LA'dan KLA üretiminin gerçekleşmesinden dolayı LA miktarının azalmasını açıklamaktadır. Bu gruba ait KLA sonuçlarının hem LA eklenmesinden hem de kokültür çalışmasından pozitif etkilendiği düşünülmektedir

Yağ asiti eklemenin etkisinin belirlenmesi amacı ile gerçeleştirilen çalışmada ise 1000 µl linoleik asit eklenmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Sonuç olarak palmitik asit miktarı ilk gelişim saati olan 0. (sıfır) saatte % 12, 36. saatte %7.7 ve 72. saatte % 23.5 olarak ölçülmüştür. Stearik asit (SA) yüzdelik alanı ise yine 0 (sıfır) saatlik gelişimde % 14, 36 saatlik gelişimde %25.2 ve 72 saaatlik gelişimde % 39.1 olararak belirlenmiştir. Behenik asit (BA), yalnızca 0 (sıfır) saatlik gelişimde %10 olarak gözlemlenmiştir. Linoleik asit ise 0 saatlik ve 36 saatlik gelişimde gözlemlenmiş sırası ile %2.4 ve %1.9 oranında hesaplanmıştır. KLA ise hiçbir gelişimde gözlemlenmemiştir.

Saf kültür olarak geliştirilen *Feramyces sp* GMLF 30 ve *Neocallimastix sp* GMLF 92 izolatlarına ait yağ asiti kompozisyonları ile kokültür gelişimleri sonucu elde edien yağ asitleri karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmaya göre palmitik asit, stearik asit, behenik asit yüzde alanları artarken, oleik asit, linoleik asit ve KLA miktarları azalmıştır. Saf gelişimlerden elde edilen yağ kompozisyonlarında GMLF 92 suşuna ait %46.8 oranında bir KLA üretimi sözkonusu olurken kokültür gelişimde KLA üretimi negatif etkilenmiş ve üretilmediği tespit edilmiştir.

Linoleik asit miktarının arttırılarak kokültür çalışması yapılan *Feramyces sp*. GMLF 30 ve *Neocallimastix sp* GMLF 92 izolatlarına ait 1000 µl LA ile gelişmeleri sonucu palmitik asit, stearik asit miktarlarında bir artış veya azalış gözlemlenmemiştir. Behenik miktarı ise düşüş göstermiştir. Oleik asit, linoleik asit ve konjuge linoleik asit miktarlarında azalış görülmüştür.

Çizelge 4.27 *Feramyces sp* GMLF 30 ve *Neocallimasitx sp* GMLF 92 fungal izolatlarının kokültür gelişimleri sonucu elde edilen yağ asiti kompozisyonları içerisindeki bazı yağ asitleri ve alan yüzdeleri

Feramyces sp GMLF 30+ *Neocallimastix sp* GMLF 92	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	30	29,6	9
Stearik Asit (C18:0)	57	60	85
Behenik Asit (C22:0)	12,3	9	4
Oleik Asit (C18:1n9c)	-	-	-
Linoleik Asit (C18:2n6c)	-	-	-
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-
Feramyces sp GMLF 30+ *Neocallimastix sp* GMLF 92 +500μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	24	28	21
Stearik Asit (C18:0)	34	57	63
Behenik Asit (C22:0)	12	13	5
Oleik Asit (C18:1n9c)	29	-	-
Linoleik Asit (C18:2n6c)	-	-	6,3
Konjuge Linoleik Asit	-	-	1,2
Feramyces sp GMLF 30+ *Neocallimastix sp* GMLF 92 +1000μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	12	7,7	23,5
Stearik Asit (C18:0)	14	25,2	39,1
Behenik Asit (C22:0)	10	-	-
Oleik Asit (C18:1n9c)	-	-	1,1
Linoleik Asit (C18:2n6c)	2,4	1,9	-
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-

4.3.15. *Caecomyces sp.* GMLF 77 ve *Neocallimastix sp* Fungus GMLF 92 Kokültür Gelişimlerinin Yağ Analizi Sonucu

Kokültür gelişimlerinden biri olan *Caecomyces sp* GMFL 77 *ve Neocallimastix* sp GMLF 92 fungal izolatlarına ait yağ asiti kompozisyonları incelenmiştir. Bu kokültür

çalışmasına ait besiyerine dışarıdan yağ asiti ilavesi olmadan elde edilen yağ asitlerinden bazılarının yüzdelik alanları Çizelge 4.28'de gösterilmiştir. Palmitik asite ait gelişim sürelerinde elde edilen yüzdelik alanlar 0. (sıfır) saatte % 22, 36. saatte %32.3 ve 72. saatte %34 olarak belirlenmiştir. Stearik asit miktarı incelendiğinde 0 saatlik gelişimde %31.4, 36 saatlik gelişimde %33,3 son gelişim saati olan 72 saatlik gelişim sonunda ise %48 oranına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Behenik asit miktarı ise gelişim süreleri sırasına göre %16.1, %3.8 ve %17 olarak ölçülmüştür. Behenik asit miktarı ilk gelişim saatinden sonra düşmüş ve gelişim süresi sonuna doğru yeniden artmıştır. Oleik asit ve linoleik asit miktarlarına ise sadece 36. saatte rastlanmış sırası ile %17 ve %2.5 olduğu belirlenmiştir. Bu kokültür çalışmasında KLA miktarına hiçbir gelişim evresinde rastlanmamıştır.

Linoleik asitin kokültür gelişimlerde yağ asiti kompozisyonuna etkisinin belirlenmesinde 500 µl ve 1000 µl besi yerlerine ilave edilmiş ve yağ asitleri kompozisoyonundaki bazı yağ asitleri incelenmiştir. Buna göre ilk miktarın sonuçları içerisinde Palmitik asit miktarı 0 (sıfır) saatlik gelişimde % 26.1 olarak ölçülürken gelişimin ilerelemesi ile 36 saattlik gelişimde % 4.6 oranına düşmüş ancak ilerleyen gelişimde 72 saat sonunda artarak %24.6 oranına ulaşmıştır. Stearik asit miktarında 0. (sıfır) saatte % 44.8 oranında, 36 saatte % 7.4 oranında ve 72 saatte % 41.4 oranında olduğu yine palmitik asit ile benzer artış azalış zamanları gösterdiği belirlenmiştir. Behenik asit ilk gelişim saatinde % 19.5, 36 saatlik ikinci gelişim süresinde % 1.9 ve son gelişim 72 saatte ise %8.5 oranında ölçülmüştür. Oleik asit sadece 36 saatlik gelişimde ölçülerek % 14.6 oranında olduğu tespit edilmiştir. Linoleik asit ise 36 ve 72 saatler de ölçülebilmiş ve sırası ile %10 ile %3.9 oranlarına sahip olduğu rapor edilmiştir. Konjuge linoleik asit miktarıda oleik asit miktarına benzer şekilde yalnızca 36 saatlik gelişimde %2.6 olarak ölçülmüştür. Linoleik asit miktarının arttırılarak yağ asiti kompozisyonu incelenmiş olup palmitik asit miktarı 0 (sıfır) saatte %24.1, 36 saatte % 27 ve 72 saatte % 12.4 olarak, stearik asit 0 (sıfır) saatte %23, 36 saatte % 42, 72 saatte %. 45.2, behenik asit sırası ile % 8.6, %10, %6.4 olarak, oleik asit %40.3, %8.9, %2.2 olarak, linoleik asit %1.9, %3.9 ve %2.8 ve son olarak konjuge linoleik asit ise sadece 36 saatte %2.5 oranında ölçülmüştür.

Saf kültür olarak geliştirilen *Caecomyces sp* GMLF 77 ve *Neocallimasitix sp* GMLF 92 izolatlarına ait yağ asiti kompozisyonlarındaki miktarlar ile kokültür gelişiminden elde edilen miktarlar karşılaştırılmış ve palmitik asit, stearik asit miktarlarında bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir. Behenik asit, oleik asit miktarlarında farklı zaman dilimlerinde azalmalar gözlemlenmiştir. Linoleik asit miktarlarının ise her gelişim saatinde azaldığı belirlenmiştir. Konjuge linoleik asit

miktarında ise linoleik asit ilave edilmeden geliştirilen bu gurup içerisinde herhangi bir değişiklik olmadığı görülmüştür.

Linoleik asit ilave edilerek saf ve kokültür olarak geliştirilen *Caecomyces sp* GMLF 77 ile *Neocallimastix sp* GMLF 92 izolatlarının yağ kompozisyonları karşılaştırılmış ve 500 µl linoleik asit ilave edildiğindeki yağ komposizyonlarından palmitik asit, stearik asit, behenik asitte bir artış azalış gözlemlenmezken oleik asit miktarında düşüş gözlemlenmiştir. Benzer düşüş linoleik asitin gelişim zamanlarında da gözlemlenmiştir. Ancak konjuge linoleik asit miktarında kokültür gelişimlerinde bir artış sözkonusudur. Bu artış diğer yağ asitlerine göre düşük görünsede konjuge linoleik asitin oranları içerisinde yüksek sayılabilecek orandadır. Linoleik asit miktarının arttırıldığı kokültür alışması ile saf kültür gelişimleri ile karşılaştırılmıştır. Buna göre palmitik asit miktarında önemli bir artış ya da azalış görülmemişken *Caecomyces sp* GMLF 77 saf kültürde stearik asit üretimi oldukça düşükken kokültür çalışması ile bu miktar önemli miktarda artış göstermiştir. Behenik asit oranları ise kokültür gelişimi ve linoleik asit ilavesi ile artış göstermiştir. Oleik asit miktarı ise kokültür çalışmalarında saf kültür yağ asitleri kompozisyonuna göre düştüğü görülmüştür. Linoleik asit miktarında ise önemli bir azalış ya da artış gözlemlenmemiştir. Ancak konjuge linoleik asit miktarında azalış meydana gemiştir. Anaerobik gut fungusları dışındaki filamenti fungus ve mayalarında (*Mortierella* ve *Delacroixia*) yüksek oranda KLA üretimi gerçekleştirdikleri rapor edilmiştir (Ogawa ve ark., 2008). Birçok fungus ve maya izolatlarının yağ asiti kompozisyonu incelenmiş ve konjuge linoleik asiti kullanarak vaksenik asit ürettikleri belirlenmiştir. Bu maya ve fungus cinsleri içeriside *Delacroixia, Mortierella, Penicilliuni, Pichia* ve *Lipomyes* yer almaktadır (Ogawa ve ark. 2008). Kokültür geliştirilen *Caecomyces sp* GMLF 77 ve *Neocallimastix sp* GMLF 92 fungal izolatlarınında ürettikleri konjuge linoleik asitin gelişim süreleri içerisinde miktarının önce artıp sonra azalmasının nedeni olarak konjuge linoleik asitin funguslar tarafından delta-9 izomeraz enzimi ile vaksenik asite dönüştürülmüş olduğu öngörülmektedir.

Çizelge 4.28 *Caecomyces sp* GMLF 77 ve *Neocallimastix sp* GMLF 92 fungal izolatlarının kokültür gelişimleri sonunda elde edilen yağ asitleri kompozisyonları içerisindeki bazı yağ asitlerine ait alan yüzdeler

Caecomyces sp GMLF 77+ *Neocallimastix sp* GMLF92	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	22	31,3	34
Stearik Asit (C18:0)	31,4	33,3	48
Behenik Asit (C22:0)	16,1	3,8	17
Oleik Asit (C18:1n9c)	-	17	-
Linoleik Asit (C18:2n6c)	-	2,5	-
Konjuge Linoleik Asit	-	-	-
Caecomyces sp GMLF 77+ *Neocallimastix s*p GMLF92 +500μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	26,1	4,6	24,6
Stearik Asit (C18:0)	44,8	7,4	41,4
Behenik Asit (C22:0)	19,5	1,9	8,5
Oleik Asit (C18:1n9c)	-	14,6	-
Linoleik Asit (C18:2n6c)	-	10	3,9
Konjuge Linoleik Asit	-	2,6	-
Caecomyces sp GMLF 77+ *Neocallimastix sp* GMLF92 +1000μl Linoleik Asit	Alan (%)		
Yağ Asidi	0. Saat	36. Saat	72.saat
Palmitik Asit (C16:0)	24,1	27	12,4
Stearik Asit (C18:0)	23	42	45,2
Behenik Asit (C22:0)	8,6	10	6,4
Oleik Asit (C18:1n9c)	40,3	8,9	2,2
Linoleik Asit (C18:2n6c)	1,9	3,9	2,8
Konjuge Linoleik Asit	-	2,5	-

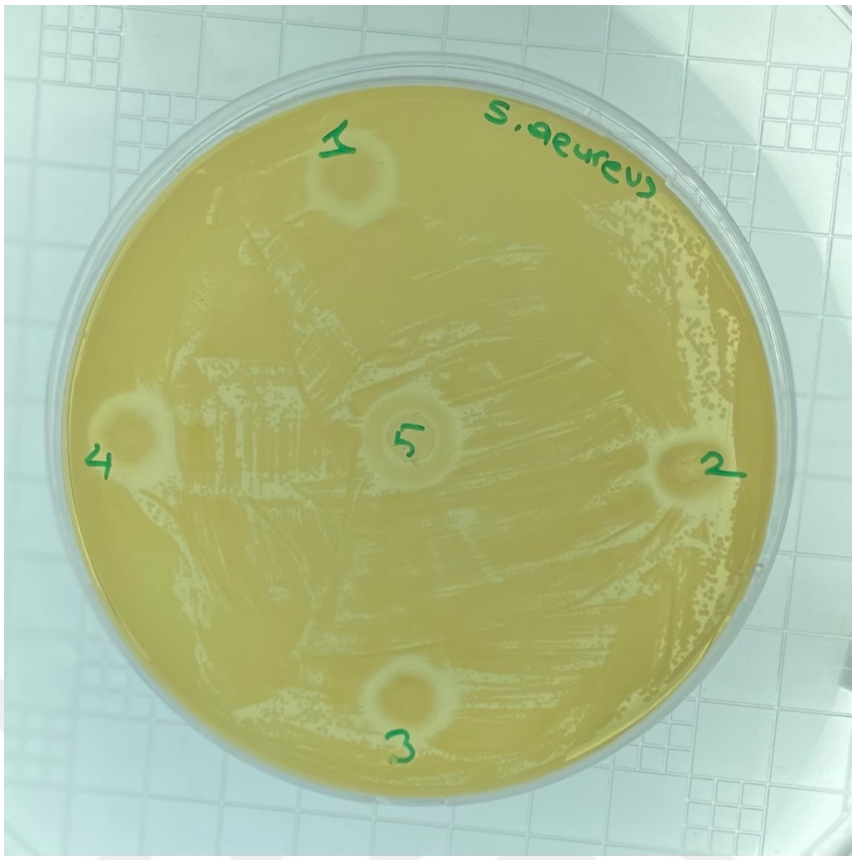
4.4. Ticari Linoleik Asitin Patojen Bakteriler Üzerine Antimikrobiyal Etkisi

Linoleik asitin antimikrobiyal etkisini incelemek amacıyla gerçekleştirilen 5 mg/ml ve 10 mg/ml stok konsantrasyonlarının *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Salmonella*

enterica, *Listeria monocytogenes* DSM215675, *Listeria monocytogenes* DSM219094, *Bacillus cereus* ATCC11778, *Escherichia coli* ATCC25922 patojen mikroorganizmaları üzerine etkileri petri kapları üzerinde gözlemlenmiş ve Lee ve ark. (2002)'nın 2µg/mL ve 50µg/mL arasındaki miktarlardaki linoleik asitin antibakteriyel çalışmaları ile benzerlik göstermektedir.

4.4.1. Linoleik Asitin *Staphylococcus aeureus* ATCC29213 üzerine Antimikrobiyal Etkisi

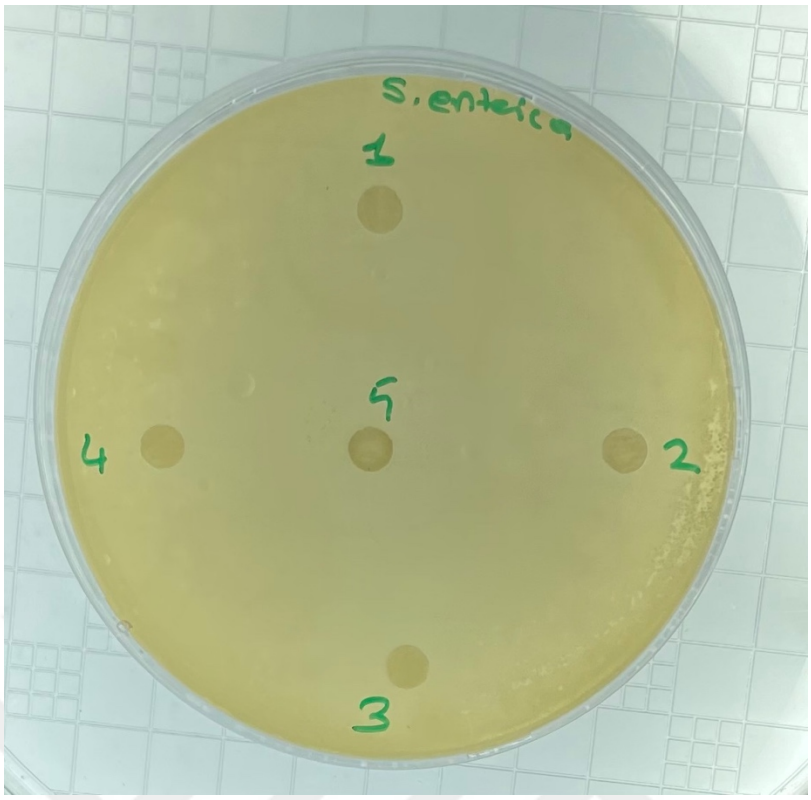
Linoleik asitin *S.aeureus* ATCC29213'nin üzerine antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi amacı ile disk yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin uygulanması amacı ile Nutrient Broth katı besi yeri üzerine 600 OD'de 0,1 konsantrasyondaki *Staphylococcus aeureus* ATCC 29213 içeren kültürden 1 ml eklenmiş ve dragaski ile yayma ekim yapılan örnekler üzerine lioleik asit içeren diskler yerleştirilip 35 °C'de 24 saat boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur (Detaylar için bknz 3.3.1). İnkübasyon sonrası petri üzerinde oluşan antimikrobiyal etkinin göstergesi olan zonlar dijital kumpas ile ölçülmüştür. Bu zonlar petri kabı içerisine linoleik asit emdirilmiş disklerin belirli bir çap alanda bakterilere etki etmesi sonucu bakterilerin bu çap alanda gelişim gösterememelerine göre oluşmaktadır. Etki alanı ne kadar geniş ise oluşan zonlara ait çaplar artmaktadır. Buna göre 10 mg/ml linoleik asit içeren disk 10.77 mm çapında etki alanı oluştururken, 20 mg /ml linoleik asit 11.666 mm çapında, 40 mg/ml linoleik asit 11.69 mm, 80 mg/ml linoleik asit 11.70 mm ve 100 mg/ml linoleik asit 11.82 mm çapındaki alanda *Staphylococcus aureus* ATCC29213 etki ederek bu alanda gelişimini engellemiş ve bu alan gelişim gösterememesi ile petri üzerinde mikroorganizma bulunmayan bir bölge oluşmuştur (Şekil 4.28). Linoleik asit konsantrasyonunu artması antimikrobiyal alana ait bölgelerin çaplarına etki etmiştir. Yani 10 mg/ml linoleik asit konsantrasyonun üzerinde ki her konsantrasyonda patojen *Staphylococcus aureus* ATCC29213 gelişimi engellenmiştir. *S.aureus* KTC1916 suşu ve ATC6538 suşları üzerine gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite çalışmasında Shin ve ark. (2006) 11-12 mm çapında etkili zon oluştuğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Ghavam ve ark. (2011) bitkilerden elde edilen yağ asitlerinin *S.aureus* için antimikrobiyal aktivite gösterdiğini petri kabında oluşan 11 mm çapta bir zon ile göstermişlerdir.



Şekil 4.28 Nutrient Broth Agar besi yerinde disk metodu Linoleik asitin antimikrobiyal etkisinin *S.aeureus* ATCC29213 üzerine etkisinin belirlenmesi (1: 10 mg/ml LA, 2: 20 mg/ml LA, 3: 40 mg/ml LA, 4:80 mg/ml LA 5: 100 mg/ml LA)

4.4.2. Linoleik Asitin *Salmonella enterica* üzerine antimikrobiyal etkisi

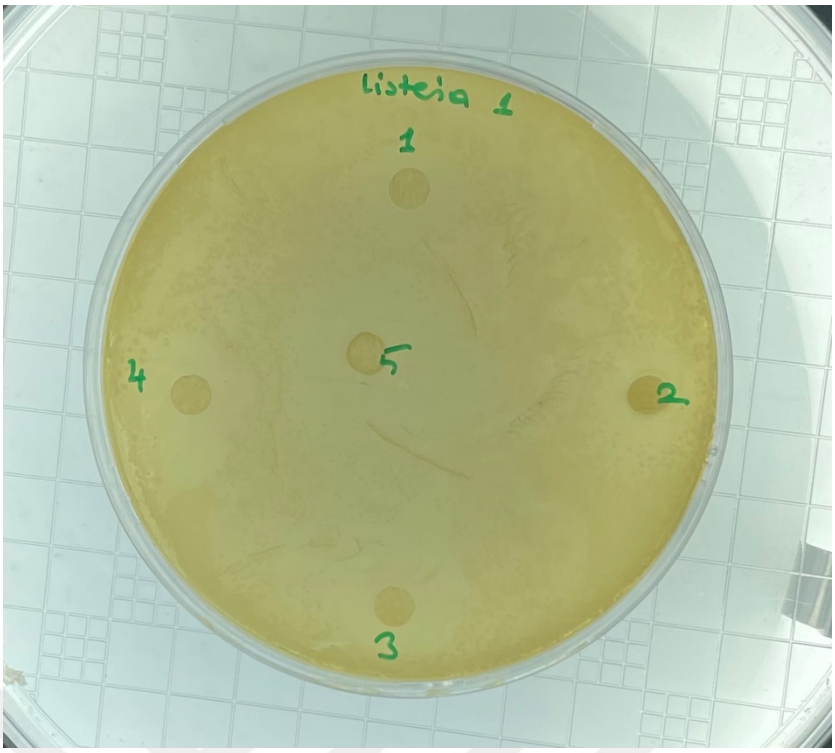
Belirli konsantrayonlarda linoleik asitin patojen bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkisi petri üzerinde disk yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.29) (Detaylar için bkz. 3.3.1) Diskler petri üzerinde numaralandırılmış bölgelere yerleştirilmiştir. Numaralandırılmış her bölge üzerinde bakteriyel gelişimin gözlenmediği alanlar oluşmuştur. Bu alanlar dijital kumpas ile ölçülerek linoleik asitin tüm konsantrasyonlarındaki etki alanları sırası ile 15.3 mm, 16.5 mm, 16.6 mm, 20 mm ve 21.3 mm olarak rapor edilmiştir.



Şekil 4.29 Nutrient Broth Agar besi yerinde disk metodu Linoleik asitin antimikrobiyal etkisinin *S.enterica* üzerine etkisinin belirlenmesi (1: 10 mg/ml LA, 2: 20 mg/ml LA, 3: 40 mg/ml LA, 4:80 mg/ml LA 5: 100 mg/ml LA)

4.4.3. Linoleik Asitin *Listeria monocytogenes* DSM215675 üzerine antimikrobiyal Etkisi

Linoeik asitin *Listeria monocytogenes* DSM215675 üzerinde belirli konsantrasyonlardaki antimikrobiyal etkisi Şekil 4.30'de gösterilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki etki alanları petri üzerinde numaralandırılmış olup sırası ile 10 mg/ml için 14mm, 20 mg/ml de 17 mm, 40 mg/ml için 19 mm, 80 mg /ml konsantrasyonda 22 mm ve 100 mg/ml konsantrasyonunda 29 mm çapında etki alanı ölçülmüştür. *Listeria monocytogenes* DSM215675 türü üzerinde her konsantrasyonda linoleik asitin antimikrobiyal etkisi olduğu belirlenmiştir. Yağ asitlerinin bakteriyel gelişimi yavaşlattığı ya da durdurduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir. Shin ve ark., (2006) *L.monocytogenes* gibi birkaç patojen mikroorganizma üzerinde yağ asitlerinin etki alanlarını belirlemek üzere yaptıkları çalışmada yağ asitlerinin 11-12 mm çapında antibakteriyel zon oluşturduğunu rapor etmiştir.

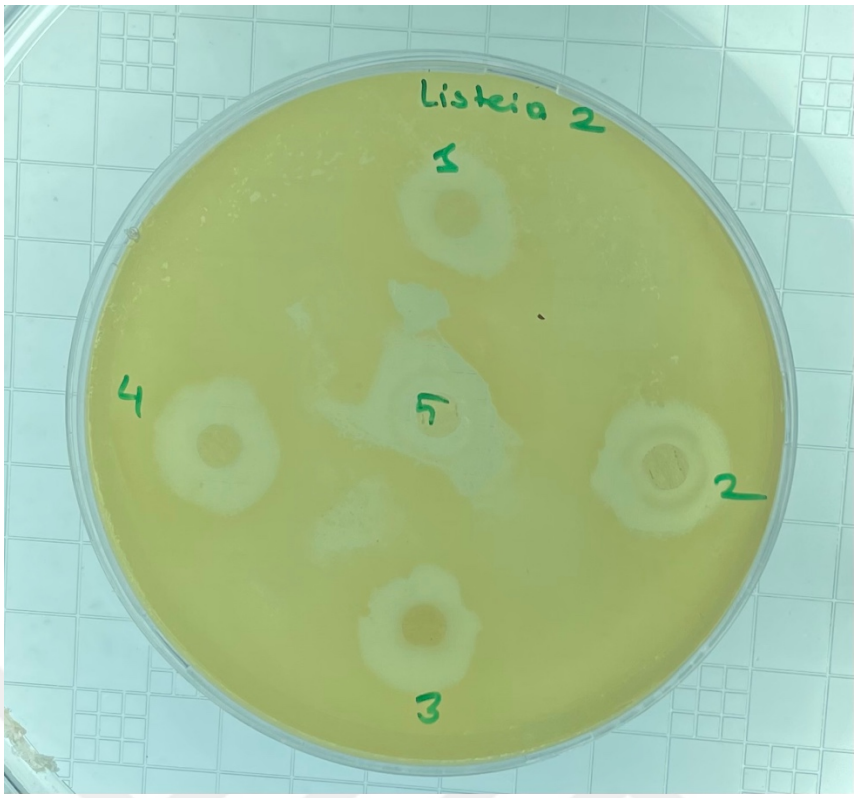


Şekil 4.30 *Listeria monocytogenes* DSM215675 için farklı konsantrasyonlarda Linoleik asitin (LA) antibakteriyel etkisi (1;10 mg/ml, 2; 20 mg/ml, 3; 40 mg/ml 4; 80 mg/ml 5; 100 mg/ml Linoleik asit)

4.4.4. Linoleik Asitin *Listeria monocytogenes* DSM219094 üzerine antimikrobiyal Etkisi

Listeria monocytogenes DSM219094 türü üzerine LA etkisinin belirlenmesi için farklı ikinci bir suş üzerinde linoleik asit konsantrasyonlarının antimikrobiyal aktivitesi denenmiş ve oluşan etki çapları dijital kumpas ile belirlenmiştir. Bu alanlar petri üzerinde linoleik asitin varlığı ile petride bakterilerin gelişememesi ile oluşmuştur. Linoleik asit konsantrasyonlarından 10 mg/ml için etki alanı 15.3 mm , 20 mg/ml konsantrasyonunda 16.5 mm, 40 mg /ml de 16.6 mm, 80 mg/ml için 17 mm ve en yüksek konsantrasyondaki 100 mg/ml için etki alanı 18.4 mm çapında ölçülmüştür(Şekil 4.31). Linoleik asit konsantrasyonu arttıkça petri üzerinde bakteriyel etkinlik alanıda artmaktadır.

L. plantarum, 2 adet *L. casei* türü üzerinde 0.5 mg/ml LA varlığında gelişimleri incelenmiş ve bu bakterilerin 48 saatlik gelişimlerinde LA'nın antimikrobiyal etkisinin olduğu gözlemlenmiştir (Renes ve ark. 2017). Linoleik asitin Gram-pozitif bakteri türleri üzerine inhibe edici özelliğinin olduğu Dilika ve ark. (2000) tarafından bildirilmiş olup bu bakteri için gelişimin durdurulmasında etkili olduğu görülmektedir.

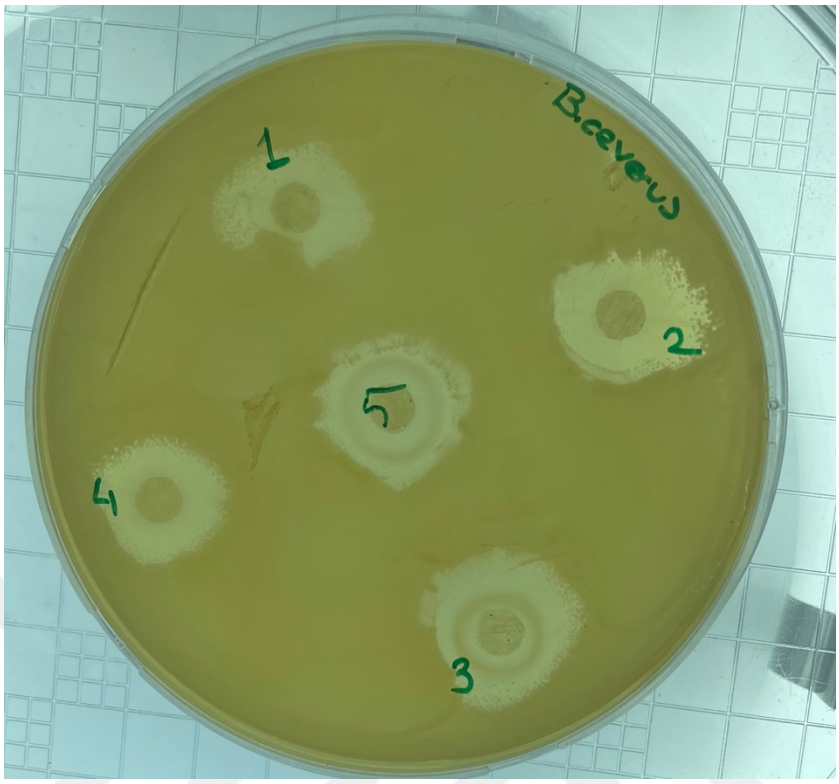


Şekil 4.31 *Listeria monocytogenes* DSM219094 için farklı konsantrasyonlarda Linoleik asitin (LA) antibakteriyel etkisi (1;10 mg/ml, 2; 20 mg/ml, 3; 40 mg/ml 4; 80 mg/ml 5; 100 mg/ml Linoleik asit)

4.4.5. Linoleik Asitin *Bacillus cereus* ATCC11778 üzerine antimikrobiyal etkisi

B.cereus ATCC11778 patojen bakterisi için LA'nın antimikrobiyal disk yöntemi ile etki alanlarını gösteren bölgeler numaralandırılmış ve bu bölgelerde oluşan zonlar dijital kumpas ile belirlenmiştir (Şekil 4.32). Linoleik asit bulunan disklerin petri kabı üzerine yerleştirilmesi ile *Bacillus cereus* gelişim sağlayamamış ve bu bölgede bakteri populasyounun olmadığı bir alan oluşmuştur. Etki alanları linoleik asit konsantrasyonlarının sırasına göre 18 mm, 18 mm, 19 mm, 19.4 mm ve 20 mm çapında olduğu gözlemlenmiştir. Dilika ve ark. (2000) linoleik asitin *Bacillus megaterium* üzerine 1mg/ml konsantrasyonda etki ettiğini rapor etmiştir. Benzer şekilde bu çalışmada da linoleik asit *Bacillus* cinsine ait bireyin gelişimi üzerine etki göstermiştir. Bir başka çalışma olan McGraw ve ark. (2002) ise bitkisel kaynaklı linoleik ve linolenik asitin antibakteriyel etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Debios ve Lowlar (2013) uzun zincirli yağasitlerinin patojen bakteriler üzerinde 32-1024 mg/L konsantrasyonda etki ettiğini göstermişlerdir. Dilika ve ark. (2000), linoleik asitin 1mg/ml konsantrasyonda *Bacillus*

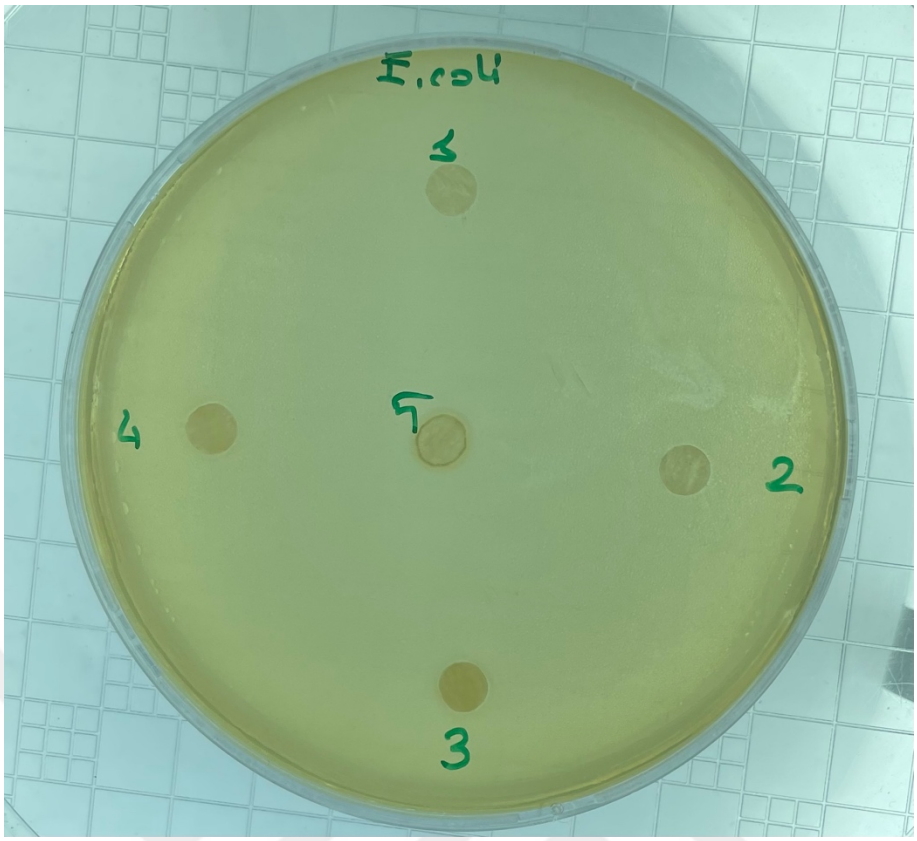
sp'nin gelişimini inhibe edici olarak rapor etmiştir. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda literatürde bildirilen antimikrobiyal etkiler ile benzerlik göstermektedir.



Şekil 4. 4.32 *B.cereus* ATCC11778 için farklı konsantrasyonlarda Linoleik asitin (LA) antibakteriyel etkisi (1;10mg/ml, 2; 20 mg/ml, 3; 40 mg/ml 4; 80 mg/ml 5; 100 mg/ml Linoleik asit)

4.4.6. Linoleik Asitin *Escherichia coli* ATCC25922 üzerine antimikrobiyal etkisi

E.coli ATCC25922 için linoleik asitin antimikrobiyal etkisi disk yöntemi ile belirlenmiştir. Buna göre *E.coli* ATCC25922 üzerine LA'in hiçbir konsantrasyonlarında antimikrobiyal etkisinin olmadığı etki alanı oluşturmaması ile belirlenmiştir (Şekil 4.33). Linoleik asitin *E.coli*'nin gelişimini inhibe edici etki göstermemesi yapılan çalışmalar ile uyuşmamaktadır. Ancak başka yağ asitlerinin de *E.coli* 'nin gelişimine karşı herhangi bir negatif etkisi olmadığı bildirilmiştir (Fischer ve ark.2012). Yağ asitlerinin antimikrobiyal etkileri ile ilgili Zheng ve ark. (2005)'nın yaptıkları çalışmada da Gram pozitif *E.coli* bakterisinin yağ asitlerinin antimikrobiyal aktivitelerinden etkilenmediklerini, Gram negatif bakterilerin bu aktiviteden etkilendiklerini rapor etmişlerdir. Jumina ve ark. (2019) bitkilerden elde ettikleri 100 mg/ml linoleik asit ve oleik asitin *E.coli* suşu üzerinde hiçbir antimikrobiyal etkinin bulunmadığını bildirmişlerdir.



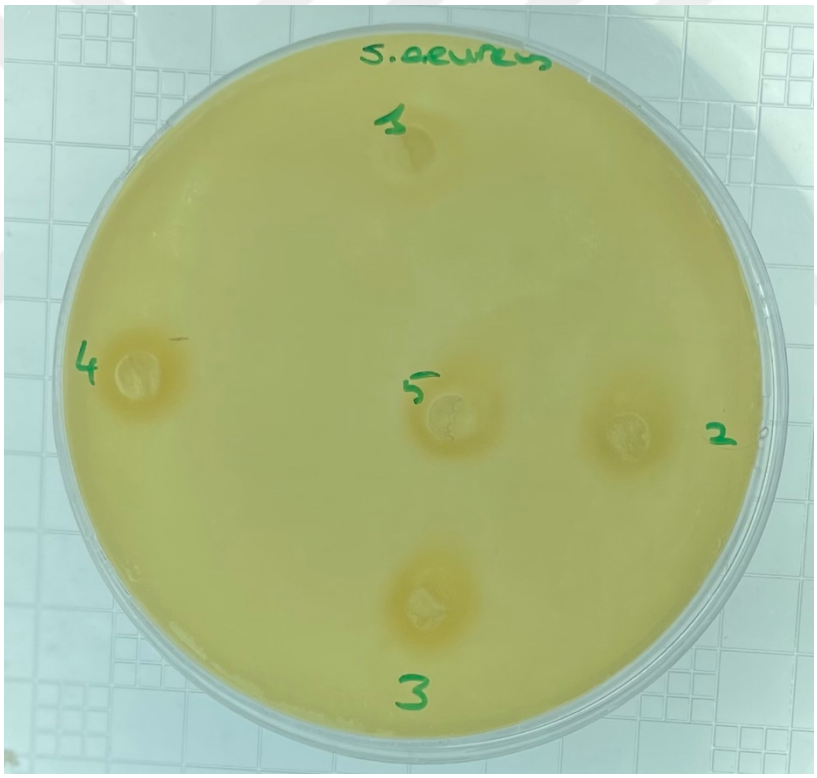
Şekil 4.33 *E.coli* ATCC25922 için farklı konsantrasyonlarda Linoleik asitin (LA) antibakteriyel etkisi (1;10mg/ml, 2; 20mg/ml, 3; 40 mg/ml 4; 80 mg/ml 5; 100 mg/ml Linoleik asit)

4.4.7. Ticari Konjuge Linoleik Asitin Antimikrobiyal Etkisi

Konjuge linoleik asitin patojen mikroorganizmalar üzerine etkisi linoleik asitin antimikrobiyal etkisinin araştırılmasında disk yöntemi kullanılmıştır. Petri üzerine patojenlerin yayma yöntemiyle ekiminden sonra belirlenen konsantrasyonlarda konjuge linoleik asit metil ester içeren diskler yerleştirilerek patojen bakterilerin gelişim sıcaklık istemlerine göre 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişimler incelenmiş ve etki alanları mm çap olarak dijital kumpas ile ölçülmüştür. Farklı beş patojen suş olan *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* DSM215675, *Listeria monocytogenes* DSM219094, *Bacillus cereus* ATCC11778, *Escherichia coli* ATCC25922 için farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 40, 80 ve 100 mg/ml son konsantrasyon olacak şekilde) etki alanları belirlenmiştir.

4.4.7.1. Konjuge Linoleik Asitin *Staphylococcus aeureus* ATCC29213 üzerine Antimikrobiyal Etkisi

Konjuge linoleik asit antimikrobiyal etki alanı *S.aeureus* ATCC29213 için incelenmiş ve Şekil 4.34'de gösterilmiştir. Etki alanları mm çap olarak ölçülmüş olup 10 mg/ml için 8mm, 20 mg/ml için 10mm, 40 mg/ml için 11mm, 80 mg/ml için 11,3 mm ve 100 mg/ml için 11,5 mm çapında etki ettiği belirtilmiştir. Benzer sonuç olarak Zheng ve ark., (2005) gerçekleştirdikleri linoleik asit metil esterlerinin *S.aeureus* FabI üzerine antimikrobiyal aktivitesi olduğunu ve gelişimini inhibe ettiğini göstermiştir. Aynı şekilde Cerderias ve ark.(2002) gerçekleştirdiği 9 µg/ml linoleik asitin *S.aeureus* üzerine inhibe edici etki gösterdiği belirtilmiştir. Bir başka çalışmada Lee ve ark. (2002) 20 mg/ml ve 50 mg/ml linoleik asitin inhibe edici olduğunu belirtmişlerdir.

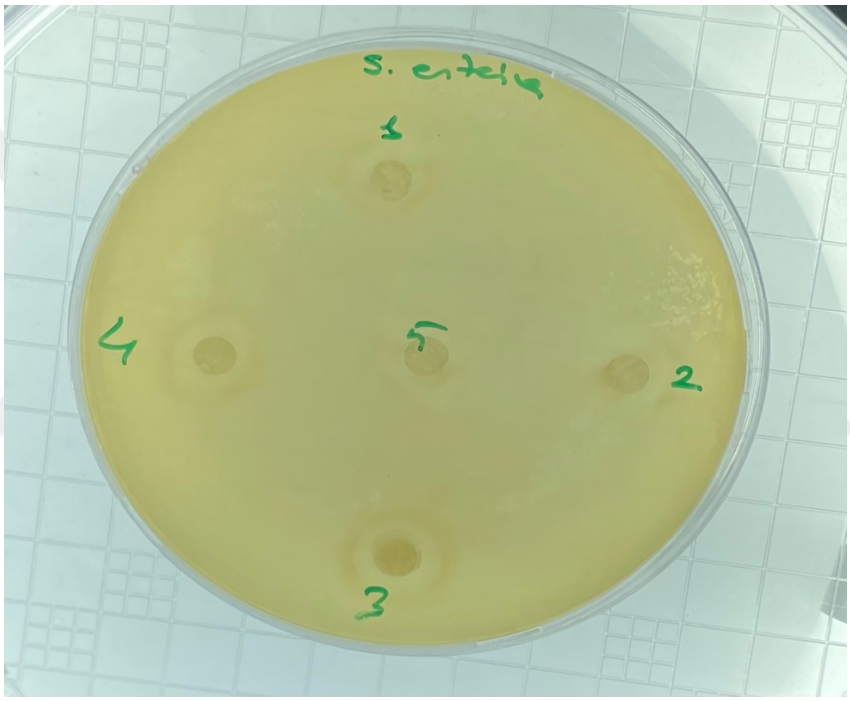


Şekil 4.34 *S. aeureus* ATCC29213 suşu üzerin KLA antimikrobiyal etki alanlarının gösterilmesi (1: 10 mg/ml, 2: 20 mg/ml, 3: 40 mg/ml, 4: 80 mg/ml, 5: 100 mg/ml KLA)

4.4.7.2. Konjuge Linoleik Asitin *Salmonella enterica* üzerine antimikrobiyal etkisi

KLA *S.enterica* üzerine antimikrobiyal etkisi disk metodu ile belirlenmiş ve etki alanları dijital kumpas ile ölçülmüştür. Farklı konsantrasyonlar olan 10, 20, 40, 80 ve 100 mg/ml KLA metil esterleri için sırası ile etki alanları 9.1 mm, 10 mm, 12 mm, 11 mm ve 7

mm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.35). Bu etki alanları bakteri popülasyonunun numaralandırılan bölgelerde bulunan belirli konsantrasyonlardaki konjuge linoleik asit varlığında gelişim gösterememeleri ile meydana gelmiştir. konjuge linoleik asit konsantrasyonu arttıkça etki alanı çapıda artış göstermiştir. Bu da etki alanının konsantrasyona bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Tabashsum ve ark. (2020) konjuge linoleik asit üretim kabiliyeti yüksek laktik asit bakterisi ile yaptıkları çalışmada *Salmonella enterica* ile *Lactobacillus casei* 'nin kokültür gelişimlerinde konjuge linoleik asit varlığında *Salmonella enterica*'nın gelişiminin inhibe edildiğini bildirmiştir. Peng ve ark. (2019) konjuge linoleik asitin antibakteriyel aktivitesinin olduğunu rapor etmiştir.



Şekil 4.35 *S. enterica* suşu üzerin KLA antimikrobiyal etki alanlarının gösterilmesi (1: 10 mg/ml, 2: 20 mg/ml, 3: 40 mg/ml, 4: 80 mg/ml, 5: 100 mg/ml KLA)

4.4.7.3. Konjuge Linoleik Asitin *Listeria monocytogenes* DSM219094 üzerine antimikrobiyal Etkisi

Listeria monocytogenes DSM219094 için KLA antimikrobiyal etki alanları farklı konsantrasyonlarda belirlenmiştir (Şekil 4.36). Buna göre konjuge linoleik asit etki alanlarına ait çap ölçümleri 11.2 mm, 10.3 mm, 12 mm, 11 mm ve 9 mm olarak belirlenmiştir. Bu alanlar petri üzerinde numaralandırılmıştır. Konjuge linoleik asit antimikrobiyal etki alanı bu suş için konsantrasyon arttıkça azalma eğilimi göstermiştir. Wang ve ark. (1991) sütte gelişen *Listeria monocytogenes* bireylerinin 50 mg/ml konjuge

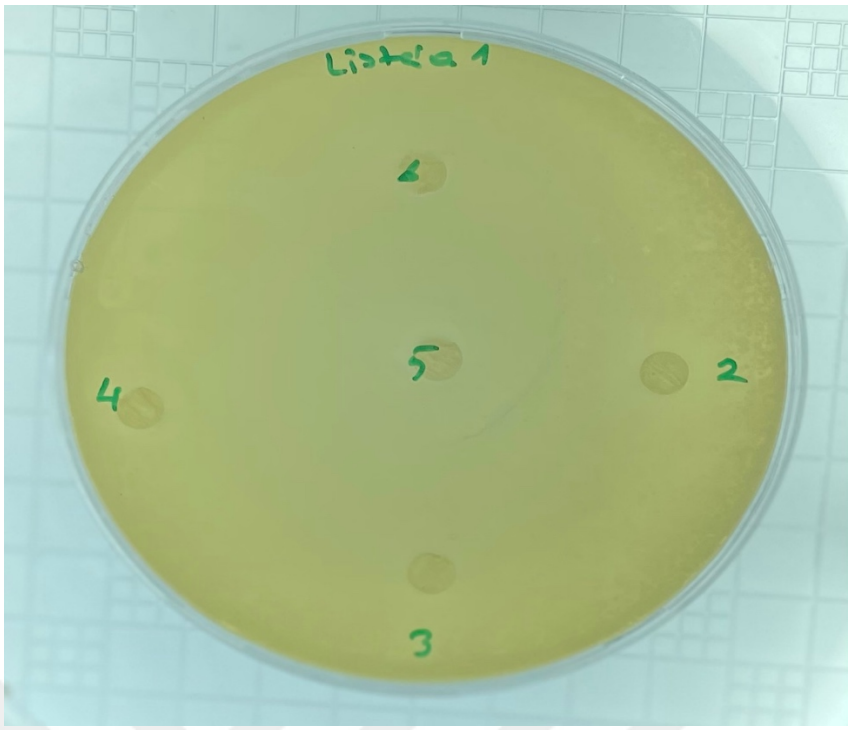
linoleik asit varlığında gelişimlerinin durduğunu ve daha sonra gelişim görülmediğini rapor etmiştir.



Şekil 4.36 *Listeria monocytogenes* DSM219094 suşu üzerin KLA antimikrobiyal etki alanlarının gösterilmesi (1: 10 mg/ml, 2: 20 mg/ml, 3: 40 mg/ml, 4: 80 mg/ml, 5: 100 mg/ml KLA)

4.4.7.4. Konjuge Linoleik Asitin *Listeria monocytogenes* DSM215675 üzerine antimikrobiyal Etkisi

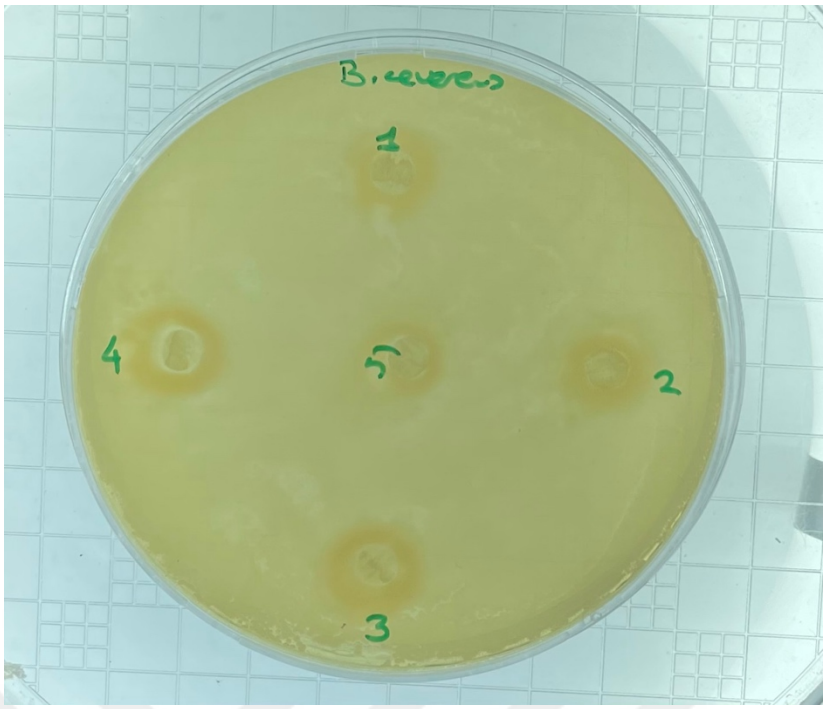
Listeria monocytogenes DSM215675 türüne ait bir başka suş üzerinde KLA konsantrasyonlarının antimikrobiyal etkileri disk yöntemi ile belirlenmiş ve oluşan etki alanları Şekil 4.37 de gösterilmiştir. Etki alanları mm çap olarak yalnızca 10 mg/ ml ve 100 mg/ml konsantrasyonlarında ölçülebilmiştir. Buna göre sırası ile 5 mm ve 8.7 mm etki alanlarına sahip oldukları gözlemlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan *Listeria monocytogenes* DSM219094 suşu ile karşılaştırıldığında bu suşa ait konjuge linoleik asit antimikrobiyal etki alanının daha düşük olduğu görülmüştür.



Şekil 4.37 *Listeria monocytogenes* DSM215675 suşu üzerin KLA antimikrobiyal etki alanlarının gösterilmesi (1: 10 mg/ml, 2: 20 mg/ml, 3: 40 mg/ml, 4: 80 mg/ml, 5: 100 mg/ml KLA)

4.4.7.5. Konjuge Linoleik Asitin *Bacillus cereus* ATCC11778 üzerine antimikrobiyal Etkisi

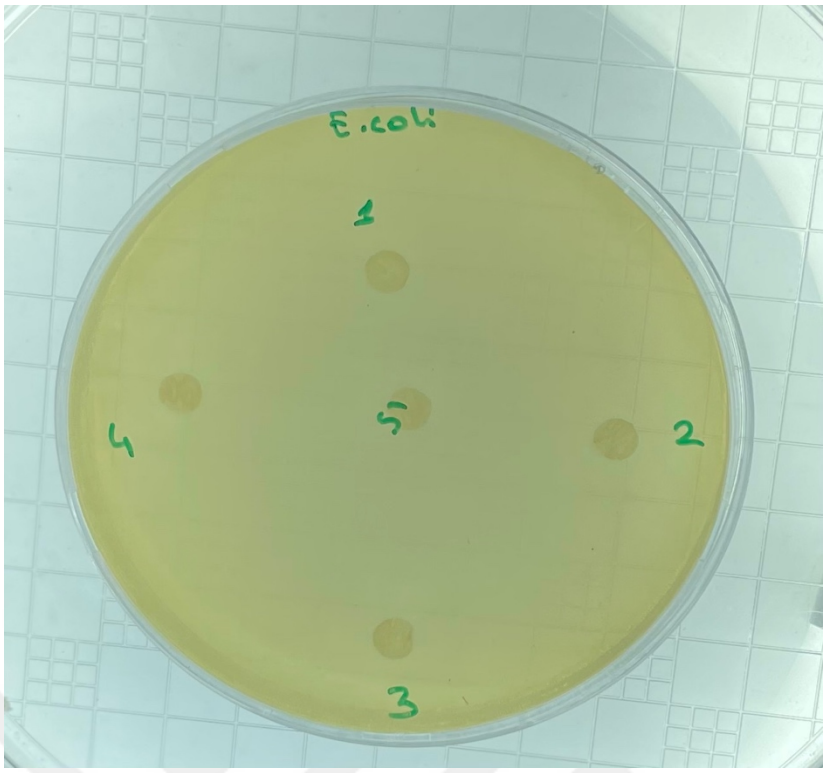
B.cereus ATCC11778 için KLA antimikrobiyal etki alanları Şekil 4.38'de gösterildiği gibidir. Sonuçlar incelendiğinde 10 mg/ml konsantrasyonlarındaki KLA için etki alanı 10.4 mm, 20 mg/ml KLA için 7.8 mm, 40 mg/ml KLA için 13.1 mm , 80 mg/ml KLA konsantrasyonunda 12.7 mm ve 100 mg/ml KLA konsantrasyonlarında 9.8 mm ölçülmüştür. Dilika ve ark.(2000) bakteriyel linoleik asitin *B.cereus* üzerine inhibe edici etki gösterdiğini belirtmiştir. Buna göre bu çalışmadaki etki ile paralellik gösterdiği belirenmiştir. Lee ve ark. (2002) 20 mg /ml ile 50 mg/ml linoleik asitin *B.cereus* gelişimi için inhibe edici etki olduğunu göstermiştir. Byeon ve ark. (2009) patojen bakteriler içerisindeki *Bacillus cereus* için konjuge linoleik asitin gelişim inhibe edici olduğunu bildirişlerdir.



Şekil 4.38 *B.cereus* ATCC11778 suşu üzerin KLA antimikrobiyal etki alanlarının gösterilmesi (1: 10 mg/ml, 2: 20 mg/ml, 3: 40 mg/ml, 4: 80 mg/ml, 5: 100 mg/ml KLA)

4.4.7.6. Konjuge Linoleik Asitin *Escherichia coli* ATCC 25922 üzerine antimikrobiyal etkisi

Konjuge linoleik asitin *E.coli* ATCC25922 suşu üzerinde antimikrobiyal etkisinin belirlenesi için yapılan disk yöntemi sonucuna göre *E.coli* ATC25922 suşununn KLA metil esterlerin her bir konsantrasyonu için direnç gösterdiği Şekil 4.39'de gösterilmiştir. Buna göre KLA *E.coli* suşu üzerinde etki alanı olışturmadığından dolayı etki alanının belirlenebileceği zon bölgeleri gözlemlenmediği için dijital kumpas ile ölçüm gerçekleştirilememiştir. Bu sonuçlar Zheng ve ark.(2005) çalışmaları ile paralellik göstermekte olup *E.coli* suşu üzerinde antibakteriyel etkisi olmadığını belirtmişlerdir.



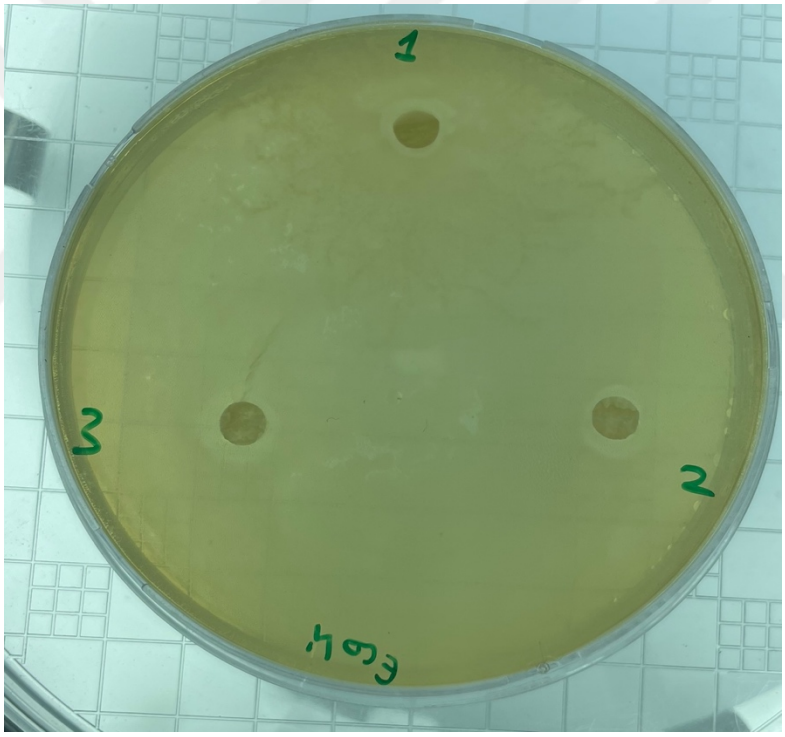
Şekil 4.39 *E.coli* ATCC24922 suşu üzerin KLA antimikrobiyal etki alanlarının gösterilmesi (1: 10 mg/ml, 2: 20 mg/ml, 3: 40 mg/ml, 4: 80 mg/ml, 5: 100 mg/ml KLA)

4.4.7.7. Bakteri Ve AGF'lerden Elde Edilen Yağ Asiti Kompozisyonunun Antimikrobiyal Etkisi

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizma kültürlerinin saf gelişimleri ve kombinasyonlu gelişimleri ile linoleik asit ilave edilmiş gelişimleri sonucu elde edilen yağ asiti kompozisyonlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amacı ile disk yöntemi kullanılmıştır. Yağ asiti metil ester kompozisyonları içerisinde linoleik asit, palmitik asit, stearik asit, oleik asit, konjuge linoleik asit gibi yağ asitleri bu kompozisyon içerisinde yer almaktadır. Yağ asiti kompozisyonunun *E.coli* ATCC24922, *S.enterica*, *S.aeureus* ATCC29213, *Listeria monocyogenes DSM215675, Listeria monocyogenes* DSM219094 ve *B.cereus* ATCC11778 suşları üzerine etkileri incelenmiştir.

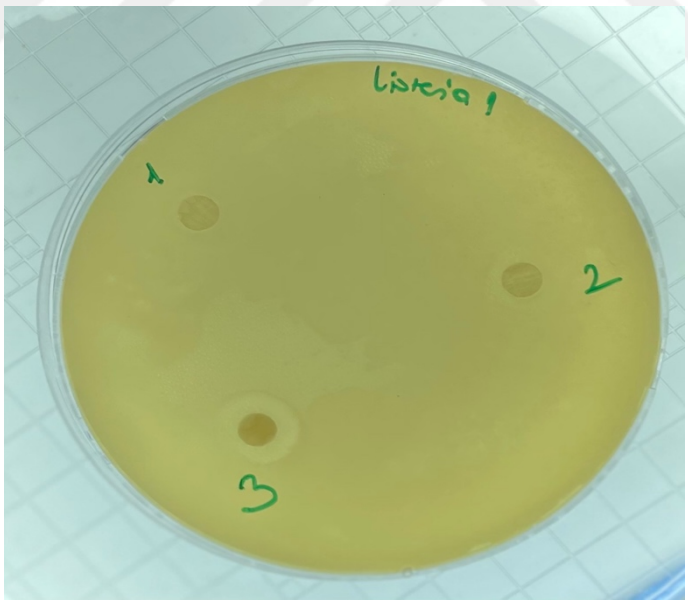
E.coli ATCC24922 üzerine *Ruminococcus albus* SY3+ *Piromyces sp* GMLF 202 1000 µl LA ilave edilmiş ve 36 saat inkübasyona bırakılmış kokültür gelişim sonucu elde edilen yağ asiti kombinasyonuna ait antimikrobiyal etki alanı petri üzerinde 1 nolu alanda gösterilmiştir (Şekil 4.40). Bu alanda bakteriyel gelişimin devam etmesi ve herhangi bir zon oluşumu tespit edilemediği için antimikrobiyal etkinin olmadığı bildirilmiştir. Ancak *B.fibrisolvens* JW11+ *Caecomyces sp* GMLF 77 1000 µl LA ilave edilip 36 saat inkübasyona bırakılıp yağ metil esterleri elde edilen örneklerin *E.coli* üzerine

antimikrobiyal etkisinin olduğu buna bağlı olarak petri üzerinde 2 nolu alanda zon oluşumu olduğu gösterilmiştir. Yağ asitleri metil esterlerinin antimikrobiyal etki alanı 9.4 mm çapı olarak ölçülmüştür. Son olarak *E.coli* ATCC24922 suşu üzerine *Caecomyces sp* GMLF 77+ *Feramyce sp* GMLF 30 izolatlarının 1000 µl LA ilave edilmiş ve 36 saat inkübasyon sonrası yağ asitleri metil esterleri elde edilen örneklerin antimikrobiyal etkileri 3 nolu alanda gösterilmiştir. Antimikrobiyal etki alanı çapı ise 13.4 mm olarak ölçülmüştür. Ticari linoleik asit ve konjuge linoleik asit metil esterlerinin *E.coli* üzerine herhangi bir antimikrobiyal etkisi bulunmazken örneklere ait yağ asiti kompozisyonlarının antimikrobiyal aktivitesi olduğu görülmüştür. McGaw ve ark. (2002) 3.13 mg/ml linoleik asitin *E.coli* üzerinde etkili olduğunu bilirmişlerdir. Elde edilen yağa asiti kompozisyonunun içerisinde bulunan linoleik asit miktarının bu değere yakın olduğu düşünülmektedir.



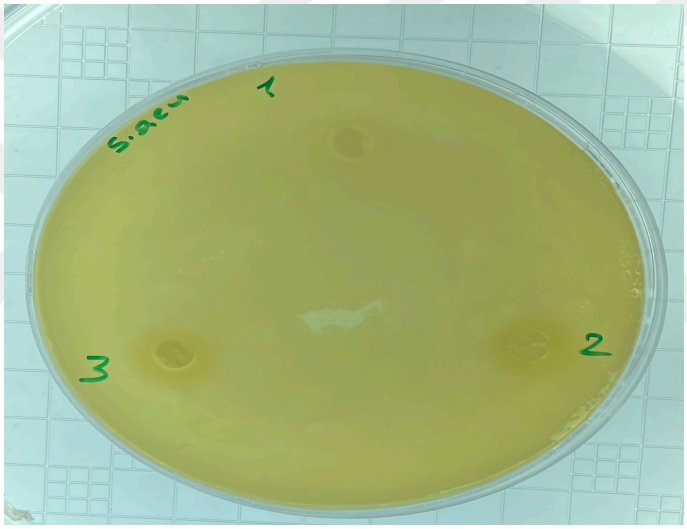
Şekil 4.40 Fungus-Fungus gelişim kombinasyonları sonucunda elde edilen yağ asiti metilester karışımlarının patojen *E.coli* ATCC29922 suşu üzerindeki antimikrobiyal etkilerini belirleyen bölge alanları (1; *Ruminococus albus* SY3+ *Piromyces sp* GMLF 202 kombinasyonlu gelişimi yağ asiti kompozisyonu, 2; *Butrivibrio fibrisolvens* JW11+ *Neocallimastix sp* GMLF 92 kombinasyonlu gelişimine ait yağ asiti kompozisyonu, 3*; Feramyces sp* GMLF 30+ *Caecomyces sp* GMLF 77 kombinasyonlu gelişim sonucu elde edilen yağ asiti kompozisyonu)

Listeria monocytogenes DSM215675 suşuna, izolatlara ait yağ asiti kompozisyonlarının antimikrobiyal etkisi disk yöntemi ile belirlenmiş ve *Ruminococcus albus* SY3+ *Piromyces sp* GMLF 202 linoleik asit ilavesiz 72 saate gelişimi sonucu elde edilen antimikrobiyal etki 1 nolu bölgede gösterilmiştir (Şekil 4.41). Buna göre bu alanda herhangi bir antimikrobiyal etki gözlemlenmemiştir. *Listeria monocytogenes* DSM215675 ya ait diğer yağ asiti kompozisyonu ise *Ruminococcus albus* SY3+ *Piromyces sp* GMLF 202 LA ilavesiz 36 saat gelişiminde 9.4 mm çapında bir antimikrobiyal etki alanı ölçülmüştür. Son olarak aynı patojen bakteri için *Ruminococcus albus* SY3+ *Piromyces sp* GMLF 202 besi yerine linoleik asit ilave edilmeden ve 0 saat gelişim gösteren örnekleri için elde edilen yağ asiti kompozisyonunun antimikrobiyal etkisinde 13.4 mm çapında bir alan ölçülmüştür. Bu alanlar yağ asiti kompozisyonunun bakteriyel gelişimi engellemesi ile oluşan alanlardır.Yağ asiti kompozisyonları içerisinde oleik asit, stearik asit, palmitik asit gibi yağ asitleri bulunmaktadır. Bu nedenle antimikrobiyal etkinin bu yağ asitlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Dilika ve ark. (2000) yağ asitlerinin antimikrobiyal etkilerini incelemiş ve oleik asitin 1mg/ml konsantrasyonda etkili olduğunu bildirmiştir.



Şekil 4.41 Yağ asiti metil esterlerin *Listeria monocytogenes* DSM215675 üzerindeki antimikrobiyal etki alanları (1;*Ruminococcus albus* SY3+ *Piromyces sp* GMLF 202 kombinasyonlu gelişimi sonucu elde edilen yağ asiti kompozisyonu, 2; *Ruminococcus albus* SY3+ *Piromyces sp* GMLF 202 kombinasyonlu gelişimi ile elde edilen yağ asiti kompozisyonu, 3; *Ruminococcus albus* SY3+ *Piromyces sp* GMLF 202 yağ asiti kompozisyonu)

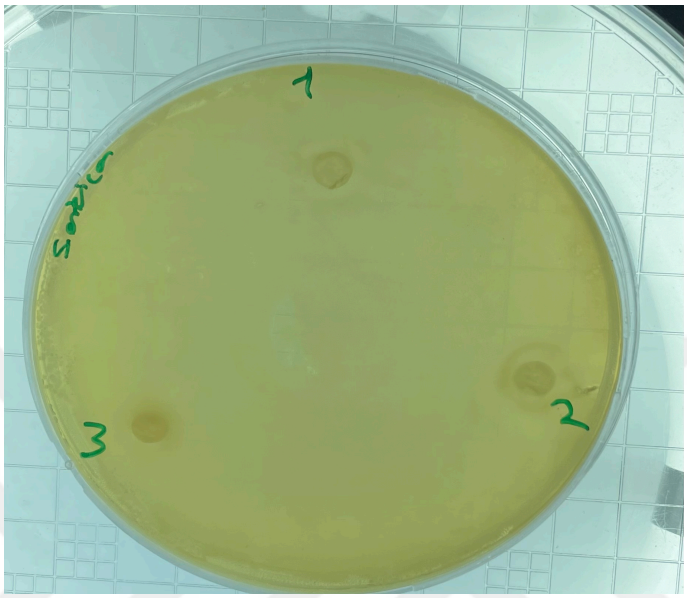
S.aeureus ATCC29213 suşu için yağ asiti kompozisyonunun antimikrobiyal etkileri incelendiğinde *Caecomyce sp* GMLF 77+ *Feramyces sp* GMLF 30 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 36 saat inkübasyon sonrası elde edilen yağ asiti kompozisyonunun antimikrobiyal etkisinin olmadığı petri üzerinde görülmüştür (Şekil 4.42). Aynı patojen için *Ruminococcus albus* SY3+ *Butrivibrio fibrisolvens* JW11 1000 µl ilave edilerek 36 saat geliştirilen ve yağ asiti kompozisyonları elde edilen örneklerin etki alanları Şekil 4. 62. l-2 numaralı alanlarda gösterilmiş ve etki alanları 10.3 mm olarak ölçülmüştür. Kombinasyonlu gelişim olan *Ruminococcus albus* SY3+ *Feramyces sp* GMLF 30 1000 µl linoleik asit ilave edilip 36 saate geliştirilen ve yağ asiti kompozisyonları elde edilen örneklerin etki alanı da Şekil 4.42. 3 numaralı alanda gösterilmiştir. Bu yağ asiti kompozisyonunun antimikrobiyal etki alanı 10.2 mm çap olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.42 *S.aeureus* üzerine antimikrobiyal etki (1; *Caecomyces sp* GMLF 77+ *Feramyces sp* GMLF 30 kombinasyonlu gelişimi metil esterleri, 2; *Ruminocuccus albus* SY3 + *Butrivibrio fibrisolvens* JW11 kombinasyonlu gelişim yağ asiti kompozisyonu, 3; *Ruminococcus albus* SY3+ *Feramyces sp.* GMLF 30 kombinasyonlu gelişim sonucu elde edilen yağ asiti kompozisyonu)

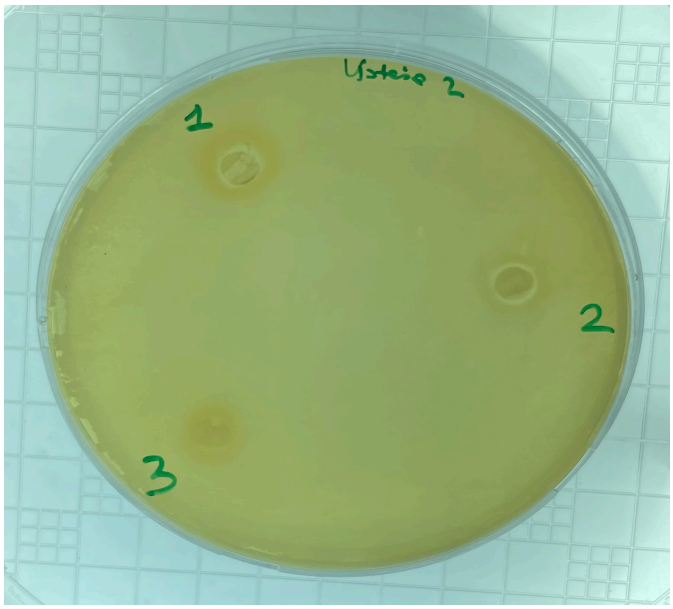
Besi yerine linoleik asit ilave (1000µl) edilerek 36 saat inkübasyon sonrası elde edilen *Ruminococcus albus* SY3+ *Piromyces sp* GMLF 202 numaralı örneklere ait yağ asiti kompozisyonunun *S. eterica* üzerine etkisi Şekil 4.43'de petri üzerinde 1 numaralı alanda gösterilmiştir. Antimikrobiyal etki alanı 8 mm çap olarak ölçülmüştür. Kombinasyonlu gelişimler içerisinde *Butrivibrio fibrisolvens* JW11+ *Neocallimastix sp* GMLF 92 suşlarının linoleik asit ilaveli (1000 µl) 36 saat gelişimi sonucu elde edilen yağ asiti kompozisyonlarının antimikrobiyal etki alanları Şekil 4.33 2'de gösterilmiş olup, 11 mm

çapında bir alan ölçülmüştür. *S.enterica* suşuna *Neocallimastix sp* GMLF 92+ *Feramyces sp* GMLF 30 suşlarından elde edilen (1000µl linoleik asit ilave edilmiş ve 36 saat inkübasyon sonrası) yağ asiti kompozisyonlarının ise antimikrobiyal etki alanları 6 mm çap olarak ölçülmüştür.



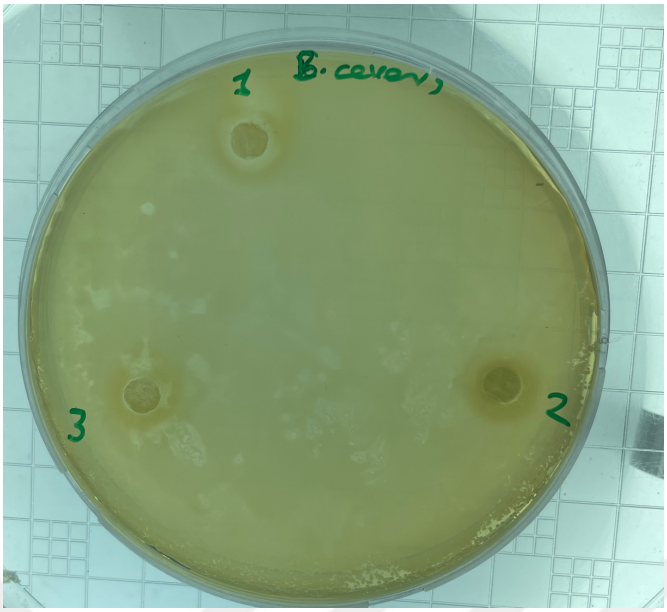
Şekil 4.43 *S.enterica* üzerine antimikrobiyal etki, 1; SY3+GMLF 202 kombinasyonlu gelişimi metil esterleri, 2; JW11 +GMLF 92 kombinasyonlu gelişim metil esterleri, 3; GMLF 77+ GMLF 30 kombinasyonlu gelişimi metil esterleri

Listeria monocytogenes DSM219094 nolu *Listeria* cinsine ait farklı suş üzerine elde edilen yağ asitlerinin antimikrobiyal etkisi incelenmiş ve Şekil 4.44.'de gösterilmiştir. Buna göre Şekil 4.44. 1 alanındaki antimikrobiyal etki çapı 12 mm olarak *Ruminococcus albus* SY3+ *Piromyces sp* GMLF 202 örneklerinin linoleik asit ilavesiz 72 saat inkübasyonu sonrası elde edilen yağ asiti kompozisyonlarına ait olduğu belirtilmiştir. Aynı kombinasona ait 36 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen yağ asiti kompozisyonlarının antimikrobiyal etki alanı ise 7mm olarak, 0. saatteki inkübasyondaki yağ asiti kompozisyonunun antimikrobiyal etkiside 8 mm çapında ölçülmüştür (Şekil 4.44.).



Şekil 4.44 *Listeria monocytogenes* DSM219094 1-2-3 *Ruminococcus albus* SY3+ *Piromyces sp* GMLF 202 metil esterleri

B.cereus için yapılan yağ kompozisyonlarının antimikrobiyal etkisi Şekil 4.45.'de gösterilmiştir. *Neocallimastix sp* GMLF 92'ye ait 1000 µl linoleik asit ilaveli ve 36 inkübasyon sonrası elde edilen yağ kompozisyonlarının antimikrobiyal etkisi sırası ile Şekil 4.45.'de 1, 2, 3 nolu alanlarda gösterilmiş olup *Neocallimastix sp* GMLF 92'den elde edilen yağ kompozisyonunun antimikrobiyal etki alanı 9 mm, *Piromyces sp* GMLF 202'nin 1000 µl linoleik asit eklenmiş ve 36 saat inkübasyona bırakılmış örneklere ait yağ asiti kompozisyonlarının antimikrobiyal etkisi etkisi 8 mm ve *Orpinomyces sp* GMLF 19 1000 µl linoleik asit ilave edilmiş ve 36 inkübasyon sonrası elde edilen yağ asiti kompozisyonlarının antimikrobiyal etki alanı ise 6 mm çapında ölçülmüştür. Kabara (1978) oleik asit, palmitik asit, stearik asit gibi yağ asitlerinin *Streptococcus* ve *Clostridium* cinslerine ait bireyler üzerinde antibakteriyel etkisi gözlemlediğini rapor etmiştir. Ouattara ve ark. (1997) palmitoleik asit ve laurik asitinde potansiyel bir antibakyeriyel olacağını bildirmiştir. Dilika ve ark. (2000) bakteriyel oleik asit ve linoleik asitin *B.cereus* gelişimi üzerine inhibe edici olduğunu göstermiştir. Tüm yağ asitlerinin antimikrobiyal aktivitesi olduğu önceki çalışmalarda da göreülmüştür. Benzer şekilde bu çalışmada ise mikrobiyal yağ asiti kompozisyonları içerisinde yer alan bu oleik asit, palmitik asit gibi yağ asitlerininde bakteriyel gelişimi engelleyerek antimikrobiyal etki göstermiş olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.45 Mikrobiyal yağ asiti kompozisyonlarının *B.cereus* üzerinde antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi (1; *Caecomyces sp* GMLF 77 yağ asiti kompozisyonu, 2; *Piromyces sp* GMLF 202 yağ asiti kompozisyonu 3; *Orpinomyces sp* GMLF 19 yağ asiti kompozisyonu)

Linoleik asit ve oleik asitin belirli konsantrasyonlarda (2.5,25,250µg/ml) patojen mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkilerin belirlenmesi çalışmasını gerçekleştiren Huang ve ark.(2010) 25µg/ml konsantrasyonlarından sonra patojen mikroorganizmalar üzerinde aktivite gösterdiğini belirtmiştir *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatından elde edilen yağ asiti kompozisyonları içerisinde linoleik asit ve oleik asit bulunduğu GC ile belirlenmiş olduğundan antimikrobiyal etkinin bu yağ asitlerinin varlığından olduğu düşünülmektedir..

Skrivanova ve ark. (2005) patojenler üzerinde 0 ile 5 mg/ml mistirik asit, oleik asit, linoleik asit, palmitik asit ve stearik asit konsantrasyonlarının antimikrobiyal etkisini incelemişler ve bu yağ asitlerinin inhibe edici etkileri olduğunu bildirmişlerdir Mikrobiyal yağ asiti kompozisyonları içerisinde çok geniş yağ asiti çeşitleri bulunmaktadır. Bu çalışmada kullanılan ve belirli koşullarda kombineli ve saf geliştirilen mikroorganizmalardan elde edilen yağ asiti kompleksleri içerisinde bu yağ asitlerininde bulunması patojen mikroorganizmalara etki etmelerini açıklamaktadır.

Bhattacharjee ve ark. (2005) palmitik asit, stearik asit, oleik asit gibi esansiyel yağ asitlerinin *S.aureus* suşu ve *E.coli* suşuna antimikrobiyal etki gösterdiğini belirtmiş

olduklarından mikrobiyal yağ asiti kompozisyonunun geniş içeriğinin bulunması antimikrobiyal etkinin sebebini göstermektedir.

Hendersen (1973) yağ asitlerinin ruminal bakteriler üzerinde etkili olduğunu belirtmiştir buna göre bu çalışmada linoleik asit ilave edilerek gerçekleştirilen geliştirmelerde yağ asitlerinin etkisinin daha geniş olabileceği bu yüzden de antimikrobiyal etkisinin linoleik asit ilave edilerek inkübasyona bırakılan ve daha sonra yağ kompozisyonu elde edilen örnekler için daha yüksek etki alanı olabileceği düşünülmektedir.

Oleik asit doymuş yağ asitleri içerisinde ruminal bakteriler üzerinde ve hatta ruminal olmayan bakterileri üzerinde en fazla toksik etki gösteren yağ asitleri içerisinde gösterilmektedir (Morounek ve ark., 2002,Galbraith ve ark., 1971). Elde edilen yağ asiti kompozisyonları içerisinde oleik asit mevcut ve hatta bazılarında yüzde alan oranı yüksektir. Bu nedenle patojen bakteriler üzerinde antmikrobiyal etki göstermiş olabileceği düşünülebilmektedir.

Wallace ve ark. (2008) 50 μg/ml linoleik asit ilaveli besi ortamında bakterilerin yaşamsal faaliyet göstermediklerini ancak 20 μg/ ml linoleik asit ilavesinde bakterilerin gelişim gösterdiklerini bildirmişlerdir. Buna bağlı olarak mikrobiyal yağ asiti kompozisyonları içerisindeki konsantrasyonlarında antimikrobiyal aktiviteye etkisi olduğu düşünülmektedir. Çünkü elde edilen mikrobiyal yağ asiti kompozisyonları içerisinde bazı kompozisyonların antimikrobiyal aktivite göstermediği görülmüş, bu kompozisyonlar içerisindeki yağ asiti konsantrasyonlarının düşük olabileceği düşünülmüştür. Bunun yanı sıra yağ asiti kompozisyonlarının yüksek konsantrasyonlarda olduğu denemelerde antimikrobiyal aktiviteninde etkili olduğu düşünülmektedir.

4.5. Linoleat İzomeraz Gen Bölgesi Tespiti

Linoleat izomeraz gen bölgesinin anaerobik gut funguslarında tespit edilebilmesi için referans olarak *Neocallimastix californiae* türüne ait DNA dizisi kullanılmıştır (Şekil 4.46). Linoleat izomeraz enziminden sorumlu gen bölgesinin anaerobik gut funguslarındaki varlığının gösterimi amacı ile daha önce bakteriler üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda belirtilen linoleat isomeraz enziminden sorumlu gen bölgeleri araştırılmış ve olası gen bölgeleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.47). Buna göre referans bakterilerdeki linoleat izomeraz gen bölgesine ait olduğu bilinen amino asit dizileri ile anaerobik gut funguslarından *Neocallimastix californiae* türüne ait linoleat izomeraz gen bölgesine ait

olduğu düşünülen amino asit dizileri karşılaştırılış ve ilk 88 amino asit dizisi içerisinde 57 amino asit birbirleri ile eşleşmiştir. Gen bölgelerinin amino asit dizilim benzerlikleri belirlendikten sonra amino asit dizilimi nükleotid dizisi formuna manuel olarak dönüştürülmüş ve elde edilen diziye göre primerler tasarlanmıştır.

Neocallimastix californiae strain G1 LY90scaffold_1, whole genome shotgun sequence

GenBank: MCOG01000001.1

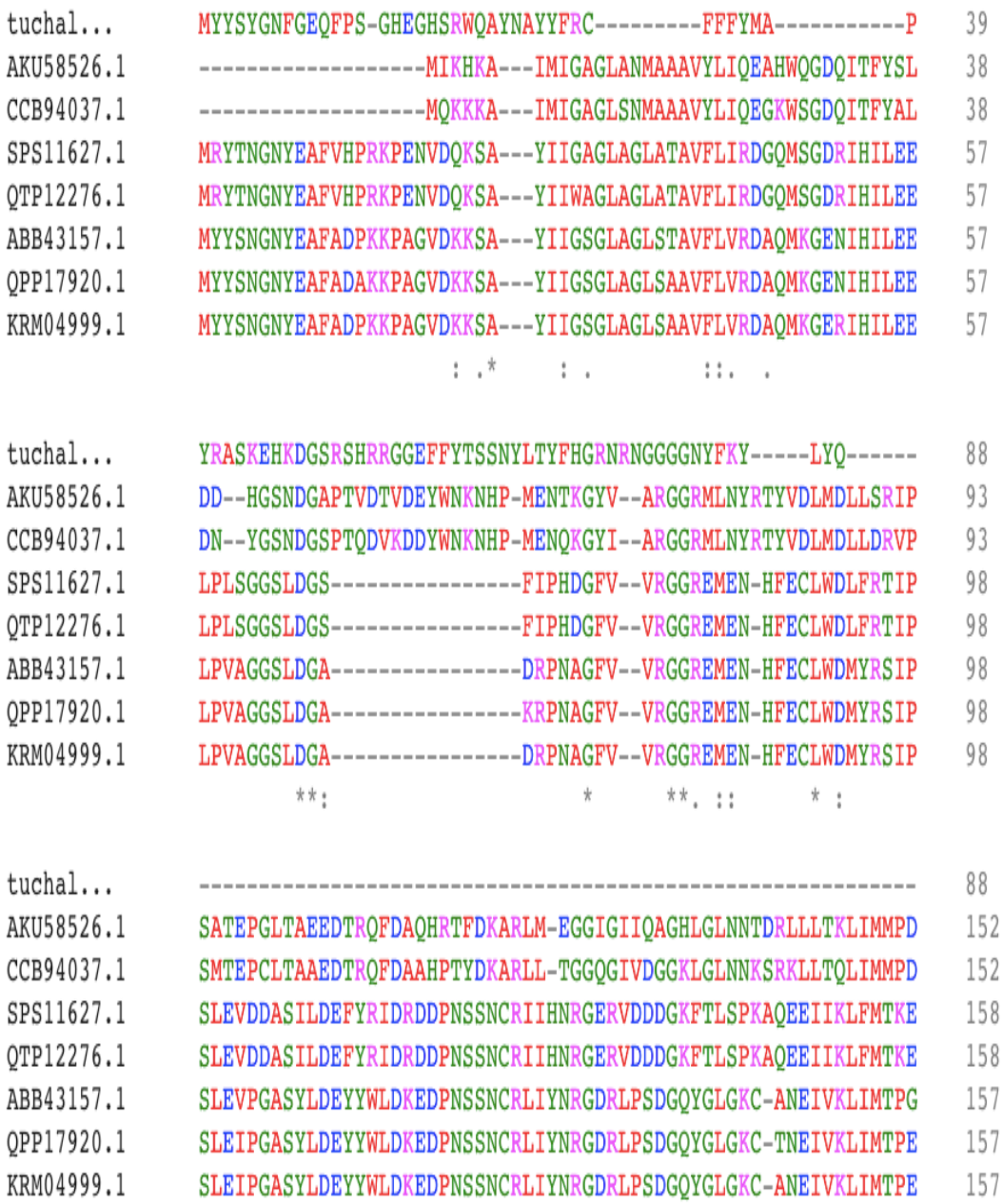
GenBank Graphics

```
>MCOG01000001.1 Neocallimastix californiae strain G1 LY90scaffold_1, whole genome
shotgun sequence


LOCUS       MCOG01000001          1837611 bp    DNA     linear   PLN 20-APR-2017
DEFINITION  Neocallimastix californiae strain G1 LY90scaffold_1, whole genome
            shotgun sequence.
ACCESSION   MCOG01000001 MCOG01000000
VERSION     MCOG01000001.1
DBLINK      BioProject: PRJNA262392
            BioSample: SAMN05428678
KEYWORDS    WGS.
SOURCE      Neocallimastix californiae
  ORGANISM  Neocallimastix californiae
            Eukaryota; Fungi; Fungi incertae sedis; Chytridiomycota;
            Chytridiomycota incertae sedis; Neocallimastigomycetes;
            Neocallimastigales; Neocallimastigaceae; Neocallimastix.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1837611)
  AUTHORS   Haitjema,C.H., Gilmore,S.P., Henske,J.K., Solomon,K.V., De
```

Şekil 4.46 *Neocallimastix californiae* tüm genom nükleotid dizisinin NCBI veri tabanındaki kaydı

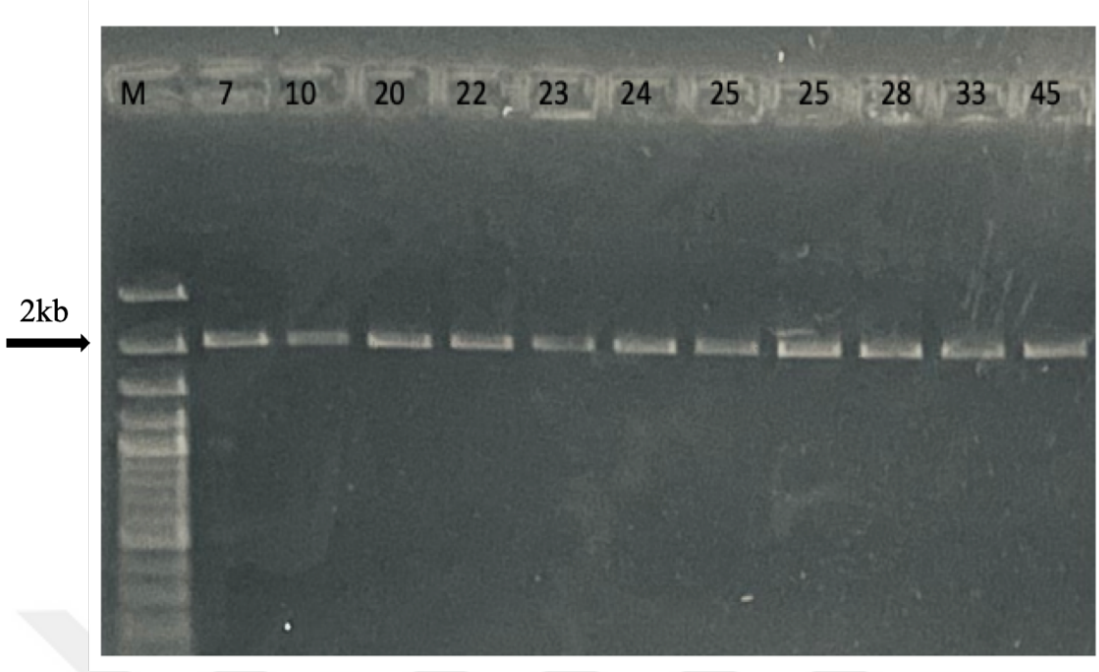
Referans diziler kullanılarak anaerobik gut funguslarına ait olası linoleat izomeraz gen bölgesi için ileri (F)ve geri primer (R) dizaynı yapılmıştır. Linoleat izomeraz gen bölgesi nükleotid dizilimi tasarlanan primerler ile belirlenmiş ve 2100 baz çifti olduğu görülmüştür



Şekil 4.47 Linoleat izomeraz gen bölgelerine ait amino asit (aa) dizilimleri (tuchal; *Neocallimastix californiae,* AKU58526.1; *Lactobacaseicillus paracasei,* CCB94037.1; *Streptococcus salivarius* CCHSS3, SPS11627.1; *Lactococcus lactis,* QTP122276.1; *Lactococcus lactis subsp.lactis*, ABB43157.1; *Lactobacillus acidophilus,* QPP17920.1; *Lactobacillus crispatus,* KRM04999.1; *Lactobacillus kitasatonis* linoleat izomeraz gen bölgesine ait amino asit dizileri.

4.5.1. Linoleate izomeraz Gen Bölgesinin Tanımlanması

Konjuge linoleik asitin sentezlenmesinde görev alan linoleat izomeraz enzimi için bakteriler referans alınarak linoleat izomeraz gen bölgesi çıkarılmıştır. Bu gen bölgesinin AGF üzerinde denenmesi üzerine 2100 baz çiftlik bir gen bölgesi elde edilmiş ve %0.7'lik 15 cm ebatındaki agaroz jele yükleme yapılarak yürütülmüştür. Daha sonra Et-Br (ethidium bromide) ile boyanarak UV ışık altında gözlemlenmesi tamamlanmıştır. Bu tanımlama metodunda kullanılan AGF 'ler BİGEM AGF kültür koleksiyonuna ait GMLF 7, GMLF 10, GMLF 20, GMLF 22, GMLF 23, GMLF 25, GMLF 33 ve GMLF 45 *Neocallimastix spp*. cinsine ait DNA'lar olurken, GMLF 24 izolatı *Orpinomyces sp*., GMLF 28 izolatı *Piromyces sp.'*ye cinslerine ait DNA'lardır. Bu çalışmada izole edilen GMLF 30, GMLF 66, GMLF 77, GMLF 92 ve GMLF 202 numaralı izolatları için linoleat izomeraz gen bölgesi taranmış ancak sonuç alınamamıştır. Sonuç elde edilememesinin DNA'nın saflık derecesi ile ilgili olabileceği gibi primerlerin uygun olmayabileceği ve DNA'ların saklanması sonucu oluşabilecek kırılmalardan kaynaklanabileceği öngörülmüştür. Linoleat izomeraz gen bölgesi için tasarlanan primerler ile gerçekleştirile PZR çalışmaları sonucunda GMLF 7, GMLF 10, GMLF 20, GMLF 22, GMLF 23, GMLF 24, GMLF 25, GMLF 28, GMLF 33 ve GMLF 45 numaralı izolatlarda linoleat izomeraz gen bölgesinin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.48). Bu sonuçlara göre linoleat izomeraz gen bölgesi *Neocallimastix sp* cinslerinde ve *Piromyces sp* cinsine ait izolatlarda mevcutken *Orpinomyces sp, Anaeromyces sp, Caecomyces sp*. ve *Feramyces sp.* cinslerine ait bireylerde rastlanmamıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları pozitif çıkan örneklere ait DNA dizileri bu gen bölgesinin ilerleyen çalışmaları için –20 ℃'de saklanmıştır.



Şekil 4.48 Linoleat izomeraz gen bölgesine göre gerçekleştirilen PZR sonuçları (M: Marker 100bç, Örnek numaraları 7:GMLF 7, 10:GMLF10, 20:GMLF 20, 22: GMLF 22, 23: GMLF 23, 24:GMLF 24, 25: GMLF 25, 28:GMLF 28, 33: GMLF 33, 45: GMLF 45)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Anaerobik gut funguslarının (AGF) izolasyonu gerçekleştirilirken on yılı aşkın -20 ^{0}C'de bekletilmiş dışkı örnekleri kullanılmış ve bu dışkıların uzun süreli muhafazaları sonrasında AGF kültürlerinin canlı kalabildikleri belirlenmiştir. Ayrıca bu dışkı örnekleri içerinde farklı cinslere ait türlerinde bulunduğu gözlemlenmiştir.

İzole edilen AGF'ler saflaştırılıp, morfolojik tanımlamaları yapıldıktan sonra moleküler tanımlamaları da yapılmıştır. Moleküler tanımlama ile elde edilen DNA dizileri NCBI veri tabanına taranmış ve günümüze kadar elde edilen cins bazında kaydedilmiş diziler ile karşılaştırılmıştır. Moleküler tanımlaması ITS bölgesine göre yapılan AGF'ler içerisinden *Feramyces sp* GMLF 30, *Neocallimastix frontalis* GMLF 66*, Caecomyces sp* GMLF 77, *Feramyces sp* GMLF 90, *Neocallimastix sp* GMLF 92 ve *Feramyces sp* GMLF 113 BİGEM anaerobik gut fungus kültürüne kazandırılmıştır. Aynı zamanda bu izolatların ITS bölgesine ait DNA dizileri NCBI veri tabanında kayıt altına alınarak GenBank'a da yeni diziler kazandırılmıştır. Bu izolatların günümüze kadar tanımlaması yapılan anaerobik gut fungusları ile moleküler düzeyde farklılıklar içerdiği tespit edilmiştir. Bu farklılıkların anaerobik gut funguslarına yeni türler katabileceği düşünülmekte olup ilerleyen çalışmalarda bu farklılıkların kaynaklarının incelenmesi yeni bakış açılarının, yeni metotların gelişmesine katıda bulunabilir.

Elde edilen anaerobik gut funguslarının uzun süreli muhafazaları üzerine çalışılmış ve muhafazasında sıklıkla sıkıntılar yaşanan küresel rizodial yapıya sahip anaerobik gut fungusu *Caecomyces sp* GMLF 77 için optimum muhafaza koşulları oluşturulmuştur. Muhafaza yöntemlerinin denenmesi amacı ile gerçekeştirilen denemede kontrol grubunu oluşturan GMLF 18 *(Orpinomyces spp.)* ve deney grubunu oluşturan GMLF 77 (*Caecomyces sp*) 'nin ilk olarak düşük sıcaklıklarda bekletilerek, daha sonra kademeli olarak daha düşük sıcaklıklarda muhafaza edilmesi hücrelerin daha yavaş donması sonucu hücre yapılarının bozulmasına dolayısı ile stok kültürlerde canlılık oranının düşmesine neden olduğu görülmüştür. Buna rağmen doğrudan yüksek sıcaklıklarda muhafaza edilen hücrelerin daha sonra stoktan çıkarılarak canlandırılması sonucu canlılık oranların zaman dilimine bağlı olarak azaldığı veya değişmediği gözlemlenmiştir. Yine aynı şekilde roll tüp ve eğik agar ile yapılan stok alma çalışmalarında her iki yöntemde de canlılıklar söz konusu olup eğik agar ile stok almada canlanma oranlarının roll tüp tekniğine göre daha verimli olduğu gözlemlenmiştir. Buradan yola çıkarak eğik agar yönteminde agarın hücreleri sarması ve düşük sıcaklıklara karşı hücre yapılarını koruyucu görev üstlendiği

düşünülmektedir. Her iki yönteme ek olarak agar ile alınan hücrelerin %15 gliserol içerisinde stok alınması ile de canlılık oranlarının arttığı gözlemlenmiştir. Stok kültür alma çalışmalarında iyileştirilmelerin gerçekleştirilmesi üzerine yapılan çalışmalar biyoteknolojik çalışmaların gelecek dönemleri için oldukça önem taşımaktadır. İyileştirme çalışmaları ile bir sonraki çalışmalara basamak oluşturulması sağlanabilir.

Anaerobik gut funguslarının selülolitik enzimleri sıklıkla çalışılan alanlardan biridir. Ancak yağ asiti üretimleri konusunda sınırlı çalışma bulunmakta ve bu sistemleri henüz yeteri kadar bilinmemektedir. Linoleik asitin konjuge linoleik asite dönüştürülmesi ve bu süreç tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışma ile anaerobik gut funguslarının yağ asiti kompozisyonları ve linoleik asitten konjuge linoleik asit üretimleri incelenmiştir. Linoleik asitten konjuge linoleik asit üretilmesini sağlayan linoleat izomeraz enzimidir. Anaerobik rumen bakterileri ve bazı bakteriler için bu enzim gen bölgesi bilinirken anaerobik gut funguslarnda bu bölge bilinmemekte olup bu çalışmada AGF'ler için bu enzimin varlığı araştırılmış ve enzim gen bölgesinin taraması yapılmıştır. Olası gen bölgesinin tanımlanması için bakterilere ait linoleat izomeraz gen bölgesinin amino asit dizilimi çıkartılmış ve bu bölgeye göre anaerobik gut funguslarının DNA dizilerinde karşılaştırılma yapılmıştır. Bu karşılaştırmalar sonunda 88 aminoasit dizisinden 57 amino asit dizisinin eşleşmesi gerçekleştirilmiş olup bu bölgeye uygun primerler dizayn edilmiştir. Bu primer dizileri ile PZR çalışmaları gerçekleştirilerek AGF cinsleri içerisinde bu gen bölgesinin varlığı tespit edilmiştir. AGF'ler için linoleat izomeraz gen bölgesi büyüklüğünün yaklaşık 2100 baz çifti uzunluğunda bir bölge olduğu belirlenmiş ve BİGEM kültür koleksiyonunda yer alan *Neocallimastix sp.*' ye ait GMLF 7, GMLF10, GMLF20, GMLF22, GMLF 23, GMLF 25, GMLF 33 ve GMLF 45 numaralı izolatların linoleat izomeraz gen bölgesine sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda *Piromyces sp* cinslerine ait olan GMLF 28 izolatınında linoleat izomeraz gen bölgesine sahip olduğu belirlenmişir. Bu çalışmada izole edilen anaerobik gut funguslarında da linoleat izomeraz gen bölgesi taraması yapılmış ancak PZR çalışmalarında pozitif sonuç alınamamıştır. Ancak bu izolatlara ait yağ asiti kompozisyonları incelendiğinde konjuge linoleik asitin var olduğu da belirtilmiştir.

Yağ ekstraksiyonları yapılan örnekler sırası ile GMLF 7, GMLF 19, GMLF 30, GMLF 39, GMLF 40, GMLF 66, GMLF 77, GMLF 90, GMLF 92, GMLF 113 ve GMLF 202 izolatlarıdır. Ancak yağ analizleri içeriside *Anaeromyces sp* GMLF 39 ve GMLF 40 numaralı örnekler linoleik asit varlığında varlığında gelişim gösteremedikleri için sonuç elde edilememiştir. Diğer izolatlar için yağ asitleri tek tek incelendiğinde ise saf kültür gelişimerinde en yüksek palmitik asit miktarına sahip fungus 36 saatlik inkübasyon sonucu

sonucu %76'lık oran ile *Orpinomyces sp* GMLF 19 izolatı olmuştur. Anaerobik gut funguslarının rumende birlikte yaşam sürdükleri düşünülerek Fungus-fungus kokültür gelişiminde ise *Caecomyces sp* GMLF 77 + *Neocallimastix sp* GMLF 92 izolatlarında Palmitik asit miktarı %32,3 ile 36 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek değere ulaşmıştır. Bakterilerin de rumen içerisinde funguslar ile birlikte yaşam sürmeleri düşünülerek bakteriler ile fungusların kokültür gelişimlerinde ise en yüksek palmitik asit değeri *Ruminococcus albus* SY3+ *Caecomyces sp* GMLF 77 kokültür gelişimlerinin 36 saat inkübasyon sonrasında % 34 olarak belirlenmiştir. Bakterilerin saf kültür gelişimlerinde en yüksek palmitik asit miktarına ise %74 oranı ile *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 sahiptir. Aynı zamanda bu suşun çalışmadaki en yüksek palmitik asit değerine sahip olduğuda belirlenmiştir.

Stearik asit üretimi en yüksek olan AGF ise 36 saat inkübasyon sonucu % 49 oranı ile *Feramyces sp* GMLF 30 olarak bulunmuştur. Fungus-fungus kokütür gelişiminde stearik asit miktarı 36 saatlik inkübasyon süresi sonunda *Feramyces sp* GMLF 30 + *Neocallimastix sp* GMLF 92 örneklerinde %60 ile, bakteri-fungus kokültür gelişiminde linoleik asit ilaveli 36 saat inkübasyon sonrası %44 olarak *Ruminococcus albu*s SY3 + *Caecomyces sp* GMLF 77 nin sahip olduğu belirtilmiştir.

Behenik asitin (BA) tüm örnekler için en düşük yağ asiti olduğu belirlenmiş olup yalnızca *Orpinomyes sp* GMLF 19 izolatında linoleik asit eklenmemiş 36 saatlik inkübasyonda %35 ile en yüksek seviyeye ulaştığı rapor edilmiştir.

Oleik asit (OA) , sıfır saatlik inkübasyonda *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatında %83 olarak maksimum seviyede ölçülmüştür. Bakteriler içerisinde ise %73 ile en yüksek oleik asit miktarına *Butrivibriyo fibrisolvens*'de sıfırıncı saatte gerçekleşmiştir. Oleik asitin en yüksek olduğu zaman dilimi çalışmada yer alan tüm mikrooraganizmalar için 0. saat 1000 µl linoleik asit ilave edilen gelişimlerde gözlemlenmiştir.

Bu çalışmanın amacı doğrultusunda önem taşıyan linoleik asit ise en yüksek bakterilerde 0.saatte %10,6 ile *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11'de olurken yine aynı bakteri en yüksek üretimi 36 saat 1000 linoleik asit ilave edilen besi yerlerinde %8,9 oranında üretmiştir. Fungus-fungus kokültürlerinde linoleik asitin miktarının en yüksek olduğu inkübasyon süresi 36. saat olarak belirlenmiş olup 500 µl linoleik asit bulunan ortamda %10 olarak belirlenmiştir. KLA miktarı ise en yüksek değere funguslarda 500 µl besi yerine linoleik asit ilaveli inkübasyonlarda 36 saatlik sürede %90 seviyesinde *Piromyces sp* GMLF 202 izolatındaa gözlemlenmiştir. Bakteri- fungus kokültür gelişimlerinde ise

Butrivibrio fibrisolvens JW11+ *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatının 36 saat 1000 µl linoleik asit ilave edilen besiyerinde inkübasyonları sonucunda ve bakterilerin kokültür çalışmasında ise %95 oranı ile 500 µl linoleik asit ilave edilerek 72 saatlik inkübasyonda görülmüştür.

Rumen mikroorganizmalarının bir arada ve saf kültür gelişimlerinin yağ asiti kompozisyonlarına olan etkisi incelenmiştir. Bu sonuçlara göre kombinasyonlu gelişimlerin hem pozitif yönde hem de negatif yönde yağ kompozisyonlarına etkisi olduğu belirlenmiştir. Çünkü *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 suşunun KLA üretiminden sorumlu olan mikroorganizmaların başında geldiği bilinmektedir ve saf kültür gelişimlerinde ürettiği miktar ile kokültür gelişimlerindeki miktarlar birbirinden farklı olup kokültür çalışmalarında miktar artmıştır. Bu yönü ile kokültür çalışmalarının KLA üretimine olumlu etkisi olduğu düşünülmektedir. Anca tek başına gelişiminde sorun olmayan ve maksimum KLA üretimini gösteren *Piromyces sp* GMLF 202 izolatı bakteri kokültürlerinde gelişim gösterememesi sebebi ile üretimi belirlenememiştir. Buda kokültür gelişimlerinin olumsuz etki yapabileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır.

Ruminant hayvanların ürünlerinin yağ asiti bileşenlerinin ayarlanabilmesine ihtiyaç varken bu kompozisyonu etkileyen faktörler hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bu nedenle yağ asiti kompozisyonlarının incelenmesi ve etki mekanizmalarının araştırılması oldukça önemlidir. Anaerobik gut funguslarının yağ asiti üretim miktarları oldukça geniştir. Bu yağ asitlerinin üretiminde etkin rol alan enzimler ve bu enzimlerin çalışma mekanizmalarının araştırılması enzim biyoteknolojisi açısından yeni bir çalışma alanının oluşturulmasına katkı sağlayabilir. Rumen mikroflorası zengin bir flora olup buradaki mikrobiyal yaşam hakkında halen yeterli bilgi bulunmamaktadır. Yağ asitleri kompozisyonunun belirlenmesi, bu yağ asitlerinin oluşum mekanizmaları hakkında elde edilen bilgiler çerçevesinde rumen mikrobiyolojisi hakkında daha fazla bilgi edinilebilecektir. Böylece buradaki mikroorganizmaların görevleri, etkinlikleri daha iyi anlaşılabilecektir.

Linoleik asit ve konjuge linoleik asitin mikroorganizmalar üzerine etkileri incelendiğinde 5, 10, 20, 40, 80 ve100 mg/ml linoleik asite ait tüm konsantrasyonlarının *Listeria monocytogenes* DSM219094, *Listeria mono*cytogenes DSM 215675 ,*Salmonella enterica*, *Straphylococcus aeureus, Bacillus ceverus* üzerine bakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu mikroorgnizmalar dışında kalan *E.coli* ise linoleik asitin hiçbir konsantrasyonundan etkilenmemiş ve gelişimini devam ettirmiştir.

Çalışmada kullanılan yağ asiti kompozisyonlarının antimikrobiyal aktivitesinin olduğu belirlenmiştir. Ancak bu yağ asiti kompozisyonları suşlara ait karışım halinde olması sebebi ile hangi yağ asitinin antimikrobiyal aktiviteyi gösterdiği bilinmemektedir. Ancak ticari olarak temin edilen ve içerisindeki konsantrasyonların belli olduğu LA ve KLA metil esterlerine yakın etki alanları göstermeleri de önem taşımaktadır. Yaklaşık 0,1 g yağ kompozisyonları içerisindeki palmitik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit, konjuge linoleik asit gibi yağ asitlerinin bulunduğu karışımın içerisindeki miktarlar ticari yağ asitlerine göre düşük olmasına rağmen etki alanları oldukça geniş olarak tespit edilmiştir. Bu suşlara ait yağ asiti komplekslerinin aktivitesinin güçlü olduğu belirlenmiştir. Yağ asiti kompozisyonlarındaki yağ asitlerinin izolasyonu ve saflaştırılması ile hangi yağ asitinin antimikrobiyal etkisinin daha geniş olduğunun belirlenmesi antibiyotik kullanımının alternatifi olabilecektir. Patojen mikroorganizmalarında yağ asitlerine karşı hassasiyetinin belirlenmesi ile antibiyotik direnci olan mikroorganizmalarda antibiyotik kullanımı yerine geçebilir.

Son dönemlerde bilimsel araştırma literatürleri KLA açısından oldukça dikkat çekici büyüme oranına sahiptir. Hayvansal çalışmalar ya da klinik çalışmaların da elde edilen sonuçlara göre KLA insan sağlığı üzerine yararlı gelişimler sağlamaktadır. Mikrobiyal üretim ile sentetik KLA üretimi ya da alınımı yerine mikrobiyal üretimin arttırılması saflaştırılması bu açıdan önem kazanmaktadır.

Anaerobik funguslarda linoleik asitten konjuge linoleik asit sentezini yapan sorumlu genin varlığı gösterilmiştir. Bakteriler kadar etkin görünmeselerde bu genin aktifliğinin daha iyi anlaşılması için *E.coli* gibi klonlamada sıklıkla kullanılan mikroorganizmalara aktarılması ile mikrobiyal linoleat izomeraz üretiminin ticari enzim üretimlerine alternatif bir yöntem olabileceği öngörülmektedir. Böylece insan sağlığı için önemli yeri olan KLA hayvanlara enzim takviyeleri ile daha fazla üretilmesini tetikleyebilirken aynı zamanda hayvansal gıdalardaki KLA miktarınında arttırılması sağlayabilir.

KAYNAKLAR

Akyol, İ., Çömlekcioğlu, U., Kar, B., Ekinci, M., Özkose, E. (2009). Cloning of a xylanase gene xyn2A from rumen fungus *Neocallimastix sp*. GMLF2 in Escherichia coli and its partial characterization. *Biologia, 64*(4), 664-670.

Alataş, M., Umucalılar, H. (2011). Rumenin Mikrobiyel Ekosistemindeki Bakteriler ve Rolleri. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, *6*(1), 71-83.

Alemu, S., Leykun, E. G., Ayelet, G., & Zeleke, A. (2006). Study on small ruminant lungworms in northeastern Ethiopia. *Veterinary Parasitology*, *142*(3-4), 330-335.

Anonim, http://biyolojih .weebly.com/huumlcrenin-yap305s305.html (13.01.2016)

Ascherio, A., & Willett, W. C. (1997). Health effects of trans fatty acids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *66*(4), 1006-1010.

Assisi, A., Banzi, R., Buonocore, C., Capasso, F., Di Muzio, V., Michelacci, F., & Garattini, S. (2006). Fish oil and mental health: the role of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in cognitive development and neurological disorders. *International Clinical Psychopharmacology*, *21*(6), 319-336.

Atanasova-Pancevska, N., & Kungulovski, D. (2017). Biodiversity of anaerobic fungi from ruminants in Republic of Macedonia. *Biodiversity International Journal*, *1*, 100-107.

Banni, S. (2002). Conjugated linoleic acid metabolism. *Current opinion in lipidology*, *13*(3), 261-266.

Banni, S., Angioni, E., Casu, V., Melis, M. P., Scrugli, S., Carta, G., Ip, C. (1999). An increase in vitamin A status by the feeding of conjugated linoleic acid, 53-57.

Barr, D. J. S., Kudo, H., Jakober, K. D., & Cheng, K. J. (1989). Morphology and development of rumen fungi: *Neocallimastix sp., Piromyces communis*, and *Orpinomyces bovis* gen. nov., sp. nov. *Canadian journal of botany*, *67*(9), 2815-2824.

Bauman, D. E., Corl, B. A., Baumgard, L. H., & Griinari, J. M. (2001). Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy cow. *Recent Advances in Animal Nutrition: 2001*, 221-250.

Baysal, A. (2007). Konjuge Linoleik Asit: Kronik Hastalıkların Önlenmesi Ve Tedavisi Yönünden Değerlendirilmesi. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, *35*(1), 5-7.

Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3), 326-338.

Beguin, P. (1990). Molecular biology of cellulose degradation. *Annual Review of Microbiology,* 44(1), 219-248.

Belury, M. A. (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annual Review of Nutrition*, *22*(1), 505-531.

Belury, M. A., Nickel, K. P., Bird, C. E., & Wu, Y. (1996). Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion, 149-157.

Bhattacharjee, I., Ghosh, A., & Chandra, G. (2005). Antimicrobial activity of the essential oil of *Cestrum diurnum* (L.)(Solanales: Solanaceae). *African Journal of Biotechnology*, 4(4), 371-374.

Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*(8), 911-917

Benoit-Gelber, I., Gruntjes, T., Vinck, A., Van Veluw, J. G., Wösten, H. A., Boeren, S., ... & De Vries, R. P. (2017). Mixed colonies of Aspergillus niger and Aspergillus oryzae cooperatively degrading wheat bran. *Fungal Genetics and Biology*, *102*, 31-37.

Breitbart, M., Hewson, I., Felts, B., Mahaffy, J. M., Nulton, J., Salamon, P., & Rohwer, F. (2003). Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *Journal of bacteriology*, *185*(20), 6220-6223.

Breton, A., Bernalier, A., Bonnemoy, F., Fonty, G., Gaillard, B., & Gouet, P. (1989). Morphological and metabolic characterization of a new species of strictly anaerobic rumen fungus: *Neocallimastix joyonii*. *FEMS Microbiology Letters*, 58(2-3), 309-314.

Breton, A., Bernalier, A., Dusser, M., Fonty, G., Gaillard-Martinie, B., & Guillot, J. (1990). *Anaeromyces mucronatus* nov. gen., nov. sp. A new strictly anaerobic rumen fungus with polycentric thallus. *FEMS Microbiology Letters*, 70(2), 177-182.

Breton, A., Dusser, M., Gaillard-Martinie, B., Guillot, J., Millet, L., & Prensier, G. (1991). *Piromyces rhizinflata* nov. sp., a strictly anaerobic fungus from faeces of the Saharian ass: a morphological, metabolic and ultrastructural study. *FEMS Microbiology Letters*, 82(1), 1-8.

Brownlee, A. G. (1989). Remarkably AT-rich genomic DNA from the anaerobic fungus Neocallimastix. *Nucleic Acids Research*, *17*(4), 1327-1335.

Bryant, M. P. (1973). Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. In *Federation Proceedings* (32), 1809-1813.

Bryant, M. P., & Robinson, I. M. (1961). An improved nonselective culture medium for ruminal bacteria and its use in determining diurnal variation in numbers of bacteria in the rumen. *Journal of Dairy Science*, *44*(8), 1446-1456.

Bryant, M. P., & Small, N. (1960). Observations on the ruminal microorganisms of isolated and inoculated calves. *Journal of Dairy Science*, *43*(5), 654-667.

Byeon, J. I., Song, H. S., Oh, T. W., Kim, Y. S., Choi, B. D., Kim, H. C., Ha, Y. L. (2009). Growth inhibition of foodborne and pathogenic bacteria by conjugated linoleic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(8), 3164-3172.

Cavalier-Smith, T., Lee, J. J. (1985). Protozoa as Hosts for Endosymbioses and the Conversion of Symbionts into Organelles 1, 2. *The Journal of protozoology*, *32*(3), 376-379.

Cerdeiras, M. P., Fernández, J., Soubes, M., Vero, S., Ferreira, F., Moyna, P., and Vázquez, A. (2000). A new antibacterial compound from *Ibicella lutea*. *Journal of Ethnopharmacology*, *73*(3), 521-525.

Chen, Y. C., Tsai, S. D., Cheng, H. L., Chien, C. Y., Hu, C. Y., & Cheng, T. Y. (2007). *Caecomyces sympodialis* sp. nov., a new rumen fungus isolated from Bos indicus. *Mycologia*, *99*(1), 125-130.

Cheng, K. J., Forsberg, C. W., Minato, H., & Costerton, J. W. (1991). Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. In *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism İn Ruminants* , Academic Press. 595-624

Chesson, A., Stewart, C. S., & Wallace, R. J. (1982). Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *44*(3), 597-603.

Chetverikova, E. P. (2009). The problem of stability of organisms after cryopreservation (fungi as example). *Biophysics*, *54*(5), 626-630.

Church, D. C. (1969). Digestive physiology and nutrition of ruminants, 224-238.

Clarke, R. (1977). Rumen Ecosystem. *Microbial Ecology of the Gut*, 251.

Coleman, G. S. (1975). The Interrelationship Between Rumen Ciliate Protozoa and Bacteria, IW McDonald ve ACI Warner. *Digestion and Metabolism in the Ruminant*, 149-164.

Coleman, G. S., & Hall, F. J. (1969). Electron microscopy of the rumen cilate *Entodinium caudatum,* with special referense to the engulfment of bacteria and other particulate matter. *Tissue and cell*, *1*(4), 607-618.

Collins, J. S., Brennan, F. N., Lee, R. J., & Love, A. H. (1986). Rumination in adults--a rare cause of gastro-oesophageal regurgitation in two patients. *The Ulster Medical Journal*, *55*(2), 178.

Coughlan, M. P., & Ljungdahl, L. G. (1988). Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. In *FEMS Symposium-Federation of European Microbiological Societies*.

Covington, M. (2004). Omega-3 fatty acids. *American family physician*, *70*(1), 133-140.

Çömlekçioğlu, U., Akyol, I., Özköse, E., Kar, B., & Ekinci, M. S. (2008). Carboxymethylcellulase production by the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix sp.* GMLF7. *Annals of Microbiology*, *58*(1), 115-119.

Çömlekçioğlu, U., Özköse, E., Akyol,İsmail, & Ekinci, M. S. (2010). Fatty acid analysis of anaerobic ruminal fungi *Neocallimastix*, *Caecomyces* and *Orpinomyces. International Journal of Agriculture Biol*gy *12*(4), 635-637.

Çömlekçioğlu, U., Özköse, E., Bülent, Kar., Akyol, İ., & Ekinci, M. (2011). Anaerobik Rumen Fungus *Caecomyces sp.* GMLF12'nin Linoleate Isomerase Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, *14*(4), 12-17.

Dehority, B. A. (1974). Rumen ciliate fauna of Alaskan moose (Alces americana), musk-ox (Ovibos moschatus) and Dall mountain sheep (Ovis dalli). *The Journal of Protozoology*, *21*(1), 26-32.

Dehority, B. A. (1991). Effects of microbial synergism on fibre digestion in the rumen. *Proceedings of the Nutrition Society*, *50*(2), 149-159.

Dehority, B. A. (1993). Microbial ecology of cell wall fermentation. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, 425-453.

Dehority, B. A. (1998). Microbial interactions in the rumen. *Revista de la Facultad de Agronomía LUZ*, *15*, 69-86.

Dehority, B. A., & Tirabasso, P. A. (2000). Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(7), 2921-2927.

Dehority, B. A. (2004). In vitro determination of generation times for Entodinium .exiguum, Ophryoscolex purkynjei and Eudiplodinium maggii. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *51*(3), 333-338.

Dilika, F., Bremner, P. D., & Meyer, J. J. M. (2000). Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: a plant used during circumcision rites. *Fitoterapia*, *71*(4), 450-452.

Domke, A. V. M., Chartier, C., Gjerde, B., Leine, N., Vatn, S., & Stuen, S. (2013). Prevalence of gastrointestinal helminths, lungworms and liver fluke in sheep and goats in Norway. *Veterinary parasitology*, *194*(1), 40-48.

Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. In *Molecular techniques in taxonomy*283-293. Springer, Berlin, Heidelberg.

Eadıe, J., Hobson, P. N., & Mann, S. O. (1959). A relationship between some bacteria, protozoa and diet in early weaned calves. *Nature*, *183*,624-625.

Eckburg, P. B., Lepp, P. W., & Relman, D. A. (2003). Archaea and their potential role in human disease. *Infection and İmmunity*, *71*(2), 591-596.

Ekinci, M. S., Özcan, N., & Özköse, E. (2000). Genetic manipulation of rumen bacteria for polysaccharide degradation. In *International Animal Nutrition Congress '2000* , 4-6.

Ekinci, M. S., Özköse, E., & Akyol, İ. (2006). Effects of sequential sub-culturing on the survival and enzyme activity of *Neocallimastix hurleyensis*. *Turkish Journal of Biology*, *30*(3), 157-162.

Firkins, J. L., & Yu, Z. (2006). Characterisation and quantification of the microbial populations of the rumen. *Ruminant physiology, digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*, 19-54.

Fischer, C. L., Drake, D. R., Dawson, D. V., Blanchette, D. R., Brogden, K. A., & Wertz, P. W. (2012). Antibacterial activity of sphingoid bases and fatty acids against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(3), 1157-1161.

Fondevila, M., & Dehority, B. A. (2001). In vitro growth and starch digestion by Entodinium exiguum as influenced by the presence or absence of live bacteria. *Journal of Animal Science*, *79*(9), 2465-2471.

Forsberg, C. W., Beveridge, T. J., & Hellstrom, A. (1981). Cellulase and xylanase release from *Bacteroides succinogenes* and its importance in the rumen environment. *Applied and Environmental Microbiology*, *42*(5), 886-896.

Frandson, R. D., Wilke, W. L., & Fails, A. D. (2009). Anatomy and physiology of the mammary glands. *Anatomy and physiology of farm animals, 7th wiley-blackwell, Iowa, USA*, *20*.

Franzolin, R., & Dehority, B. A. (1996). Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *Journal of Animal Science*, *74*(11), 2803-2809.
Franzolin, R., & Dehority, B. A. (1996). Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *Journal of Animal Science*, *74*(11), 2803-2809.
Friedman, N., Jami, E., & Mizrahi, I. (2017). Compositional and functional dynamics of the bovine rumen methanogenic community across different developmental stages. *Environmental Microbiology*, *19*(8), 3365-3373.

Galbraith, H., Miller, T. B., Paton, A. M., & Thompson, J. K. (1971). Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *Journal of Applied Bacteriology*, *34*(4), 803-813.

Gavino, V. C., Gavino, G., Leblanc, M. J., & Tuchweber, B. (2000). An isomeric mixture of conjugated linoleic acids but not pure cis-9, trans-11-octadecadienoic acid affects body weight gain and plasma lipids in hamsters. *The Journal of Nutrition*, *130*(1), 27-29.

Gold, J. J., Heath, I. B., & Bauchop, T. (1988). Ultrastructural description of a new chytrid genus of caecum anaerobe, *Caecomyces equi* gen. nov., sp. nov., assigned to the *Neocallimasticaceae*. *Biosystems*, *21*(3-4), 403-415.

Goyal, A., Ghosh, B., & Eveleigh, D. (1991). Characteristics of fungal cellulases. *Bioresource Technology*, *36*(1), 37-50.

Groleau, D., & Forsberg, C. W. (1981). Cellulolytic activity of the rumen bacterium *Bacteroides succinogenes*. *Canadian Journal of Microbiology*, *27*(5), 517-530.

Ha, Y. L., Grimm, N. K., & Pariza, M. W. (1987). Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, *8*(12), 1881-1887.

Ha, Y. L., Storkson, J., & Pariza, M. W. (1990). Inhibition of benzo (a) pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Research*, *50*(4), 1097-1101.

Hara, A., & Radin, N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, *90*(1), 420-426.

Harbige, L. S. (2003). Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n− 6 essentiality and the balance between n− 6 and n− 3. *Lipids*, *38*(4), 323-341.

Harfoot, C. (1997). Gp Hazlewood. *The Rumen Microbial Ecosystem*, 382.

Hartfoot, C. G., & Hazlewood, G. P. (1988). Lipid metabolism in the rumen. The Rumen Microbial Ecosystem. PN Hobson, ed.

Henderson, C. (1973). The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. *The Journal of Agricultural Science*, *81*(1), 107-112.

Henske, J. K., Gilmore, S. P., Knop, D., Cunningham, F. J., Sexton, J. A., Smallwood, C. R., and O'Malley, M. A. (2017). Transcriptomic characterization of *Caecomyces churrovis*: a novel, non-rhizoid-forming lignocellulolytic anaerobic fungus. *Biotechnology for Biofuels*, *10*(1), 1-12.

Hespell, R. B. (1987). Biotechnology and modifications of the rumen microbial ecosystem. *Proceedings of the Nutrition Society*, *46*(3), 407-413.

Hespell, R. B., & Cotta, M. A. (1995). Degradation and utilization by Butyrivibrio fibrisolvens H17c of xylans with different chemical and physical properties. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(8), 3042-3050.

Hespell, R. B., & O'Bryan, P. J. (1992). Purification and characterization of an α-L-arabinofuranosidase from *Butyrivibrio fibrisolvens* GS113. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(4), 1082-1088.

Hespell, R. B., & Whitehead, T. R. (1990). Physiology and genetics of xylan degradation by gastrointestinal tract bacteria. *Journal of Dairy Science*, *73*(10), 3013-3022.

Hespell, R. B., Wolf, R., & Bothast, R. J. (1987). Fermentation of xylans by *Butyrivibrio fibrisolvens* and other ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *53*(12), 2849-2853.

Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., and Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, *111*(5), 509-547.

Ho, Y. W., Abdullah, N., & Jalaludin, S. (1994). Orpinomyces intercalaris, a new species of polycentric anaerobic rumen fungus from cattle. *Mycotaxon*, *50*, 139-150.

Ho, Y. W., Barr, D. S., Abdullah, N., & Jalaludin, S. (1993). *Anaeromyce*s, an earlier name for *Ruminomyces*. *Mycotaxon*, *47*, 283-284.

Ho, Y. W., BARR, D. S., Abdullah, N., Jalaludin, S., & Kudo, H. (1993). *Neocallimastix variabilis,* a new species of anaerobic fungus from the rumen of cattle. *Mycotaxon*, *46*, 241-258.

Ho, Y. W., Barr, D. S., Abdullah, N., Jalaludin, S., & Kudo, H. (1993). *Piromyces spiralis*, a new species of anaerobic fungus from the rumen of goat. *Mycotaxon*, *48*(1), 59-68.

Ho, Y. W., Bauchop, T., Abdullah, N., & Jalaludin, S. (1990). *Ruminomyces elegans* gen. et sp. nov., a polycentric anaerobic rumen fungus from cattle. *Mycotaxon*, *38*, 397-405.

Hobson, P. N. (1969). Rumen bacteria. In *Methods in Microbiology* (Vol. 3, pp. 133-149). Academic Press.

Hobson, P. N., Wallace, R. J., & Bryant, M. P. (1982). Microbial ecology and activities in the rumen: Part I. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, *9*(3), 165-225.

Hobson, P. N., Wallace, R. J., & Bryant, M. P. (1982). Microbial ecology and activities in the rumen: Part II. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, *9*(4), 253-320.

Hofmann, R. R. (1989). Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. *Oecologia*, *78*(4), 443-457.

Huang, C. B., George, B., & Ebersole, J. L. (2010). Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. *Archives of Oral Biology*, *55*(8), 555-560.

Hungate, R. E. (1950). The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriological Reviews*, *14*(1), 1-49.

Hungate, R. E. (1969). Chapter IV A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In *Methods in Microbiology* (Vol. 3, pp. 117-132). Academic Press.

Hungate, R. E. (1975). The rumen microbial ecosystem. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 39-66.

Huws, S. A., Creevey, C. J., Oyama, L. B., Mizrahi, I., Denman, S. E., Popova, M., . & Morgavi, D. P. (2018). Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2161.

Imai, S., Oku, Y., Morita, T., & Ike, K. (2004). Rumen ciliate protozoal fauna of reindeer in Inner Mongolia, China. *Journal of veterinary medical science*, *66*(2), 209-212.

Ip, C., Banni, S., Angioni, E., Carta, G., McGinley, J., Thompson, H. J., and Bauman, D. (1999). Conjugated linoleic acid–enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *The Journal of Nutrition*, *129*(12), 2135-2142.

Ip, C., Chin, S. F., Scimeca, J. A., & Pariza, M. W. (1991). Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Research*, *51*(22), 6118-6124.

Ip, C., Chin, S. F., Scimeca, J. A., & Pariza, M. W. (1991). Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Research*, *51*(22), 6118-6124.

Iwakiri, Y., Sampson, D. A., & Allen, K. G. D. (2002). Suppression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by conjugated linoleic acid in murine macrophages. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *67*(6), 435-443.

Janssen, P. H., & Kirs, M. (2008). Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology,* 74(12), 3619-3625.

Jenkins, N. D., Housh, T. J., Miramonti, A. A., McKay, B. D., Yeo, N. M., Smith, C. M., and Cramer, J. T. (2016). Effects of rumenic acid rich conjugated linoleic acid supplementation on cognitive function and handgrip performance in older men and women. *Experimental Gerontology*, *84*, 1-11.

Jewell, K. A., McCormick, C. A., Odt, C. L., Weimer, P. J., & Suen, G. (2015). Ruminal bacterial community composition in dairy cows is dynamic over the course of two lactations and correlates with feed efficiency. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(14), 4697-4710.

Joblin, K. N. (1981). Isolation, enumeration, and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Applied and Environmental Microbiology*, *42*(6), 1119-1122.

Joblin, K. N., & Naylor, G. E. (1989). Fermentation of woods by rumen anaerobic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, *65*(1-2), 119-122.

Jump, D. B., Clarke, S. D., Thelen, A., Liimatta, M., Ren, B., & Badin, M. (1996). Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Progress in lipid research*, *35*(3), 227-241.

Kamra, D. N. (2005). Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, 124-135.

Kar, B., Özköse, E., & Ekinci, M. S. (2021). The comparisons of fatty acid composition in some anaerobic gut fungi *Neocallimastix*, *Orpinomyces, Piromyces*, and *Caecomyces. Anais da Academia Brasileira De Ciências*, *93*.

Karaca, E., & Aytaç, S. (2007). Yağ bitkilerinde yağ asitleri kompozisyonu üzerine etki eden faktörler. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, *22*(1), 123-131.

Karmali, R. A., Marsh, J., & Fuchs, C. (1984). Effect of omega-3 fatty acids on growth of a rat mammary tumor. *JNCI: Journal of The National Cancer Institute*, *73*(2), 457-461.

Kelly, G. S. (2001). Conjugated linoleic acid: a review. *Alternative Medicine Review*, *6*(4), 367-367.

Kemp, P., & Lander, D. J. (1984). Hydrogenation in vitro of α-linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *Microbiology*, *130*(3), 527-533.

Kepler, C. R., & Tove, S. B. (1967). Biohydrogenation of unsaturated fatty acids: III. Purification and properties of a linoleate Δ12-cis, Δ11-trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry*, *242*(24), 5686-5692.

Kepler, C. R., Hirons, K. P., McNeill, J. J., & Tove, S. B. (1966). Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry*, *241*(6), 1350-1354.

Kim, C. H., Lee, S. J., Ha, J. K., Kim, W. Y., & Lee, S. S. (2008). Effects of emulsified octadecanic acids on gas production and cellulolysis by the rumen anaerobic fungus, *Piromyces communis* M014. *Anaerobe*, *14*(1), 19-28.

Kim, Y. J., Liu, R. H., Bond, D. R., & Russell, J. B. (2000). Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(12), 5226-5230.

Koba, K., Akahoshi, A., Yamasaki, M., Tanaka, K., Yamada, K., Iwata, T., ... & Sugano, M. (2002). Dietary conjugated linolenic acid in relation to CLA differently modifies body fat mass and serum and liver lipid levels in rats. *Lipids*, *37*(4), 343-350.

Kobayashi, Y. (2006). Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: need for basic and applied science. *Animal Science Journal*, *77*(4), 375-385.

Koch, W. J. (1968). Studies of the motile cells of chytrids. IV. Planonts in the experimental taxonomy of aquatic Phycomycetes. *Journal of The Elisha Mitchell Scientific Society*, 69-83.

Koike, S., & Kobayashi, Y. (2001). Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*, *204*(2), 361-366.

Krause, D. O., & Russell, J. B. (1996). How many ruminal bacteria are there?. *Journal of Dairy Science*, *79*(8), 1467-1475.

Kreikemeier, K. K., Harmon, D. L., Brandt Jr, R. T., Nagaraja, T. G., & Cochran, R. C. (1990). Steam-rolled wheat diets for finishing cattle: Effects of dietary roughage

and feed intake on finishing steer performance and ruminal metabolism. *Journal of Animal Science*, *68*(7), 2130-2141.

Kreikemeier, K. K., Harmon, D. L., Peters, J. P., Gross, K. L., Armendariz, C. K., & Krehbiel, C. R. (1990). Influence of dietary forage and feed intake on carbohydrase activities and small intestinal morphology of calves. *Journal of Animal Science*, *68*(9), 2916-2929.

Latham, M. J., Sharpe, M. E., & Sutton, J. D. (1971). The microbial flora of the rumen of cows fed hay and high cereal rations and its relationship to the rumen fermentation. *Journal of Applied Bacteriology*, *34*(2), 425-434.

Lee, K. N., Kritchevsky, D., & Parizaa, M. W. (1994). Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, *108*(1), 19-25.

Lee, S. M., Guan, L. L., Eun, J. S., Kim, C. H., Lee, S. J., Kim, E. T., & Lee, S. S. (2015). The effect of anaerobic fungal inoculation on the fermentation characteristics of rice straw silages. *Journal of applied microbiology*, *118*(3), 565-573.

Li, J., Heath, I. B., & Bauchop, T. (1990). Piromyces mae and *Piromyces dumbonica*, two new species of uniflagellate anaerobic chytridiomycete fungi from the hindgut of the horse and elephant. *Canadian Journal of Botany*, *68*(5), 1021-1033.

Liew, C., Schut, H. A. J., Chin, S. F., Pariza, M. W., & Dashwood, R. H. (1995). Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis*, *16*(12), 3037-3043.

Lowe, S. E., Theodorou, M. K., & Trinci, A. P. (1987). Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose, and xylan. *Applied and Environmental Microbiology*, *53*(6), 1216-1223.

Lowe, S. E., Theodorou, M. K., & Trinci, A. P. (1987). Growth and fermentation of an anaerobic rumen fungus on various carbon sources and effect of temperature on development. *Applied and Environmental Microbiology*, *53*(6), 1210-1215.

Lock, A. L., & Garnsworthy, P. C. (2002). Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk. *Animal Science*, *74*(1), 163-176.

Maia, M. R., Chaudhary, L. C., Figueres, L., & Wallace, R. J. (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. Antonie Van Leeuwenhoek, 91(4), 303-314.

Maia, M. R., Chaudhary, L. C., Bestwick, C. S., Richardson, A. J., McKain, N., Larson, T. R., & Wallace, R. J. (2010). Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiology*, *10*(1), 1-10. *cience*, *74*(1), 163-176.

Marounek, M., Skřivanová, V., & Savka, O. (2002). Effect of caprylic, capric and oleic acid on growth of rumen and rabbit caecal bacteria. *Journal of Animal and Feed Sciences*, *11*(3), 507-516.

Marinsek-Logar, R., Nekrep, F. V., & Gasparic, A. (1998). Xylanolytic enzyme system of rumen bacterium *Prevotella bryantii* B14. *Kmetijstvo (Zootehnika)*.

McAllister, T. A., Rode, L. M., Major, D. J., Cheng, K. J., & Buchanan-Smith, J. G. (1990). Effect of ruminal microbial colonization on cereal grain digestion. *Canadian Journal of Animal Science*, 70(2), 571-579.

McGaw, L. J., Jäger, A. K., & Van Staden, J. (2002). Isolation of antibacterial fatty acids from Schotia brachypetala. *Fitoterapia,* 73(5), 431-433.

McGranaghan, P., Davies, J. C., Griffith, G. W., Davies, D. R., & Theodorou, M. K. (1999). The survival of anaerobic fungi in cattle faeces. *FEMS Microbiology Ecology,* 29(3), 293-300.

McSweeney, C. S., Dulieu, A., Katayama, Y., & Lowry, J. B. (1994). Solubilization of lignin by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix patriciarum. Applied and Environmental Microbiology*, 60(8), 2985-2989.

Meral, Y., & Biricik, H. (2013). Ruminantlarda metan emisyonunu azaltmak için kullanılan besleme yöntemleri. VII. Ulusal Hayvan Besleme Kongresi (Uluslararası katılımlı), 26-27.

Miron, J., & Ben-Ghedalia, D. (1993). Digestion of cell-wall monosaccharides of ryegrass and alfalfa hays by the ruminal bacteria *Fibrobacter succinogenes* and *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(8), 780-786.

Mir, P. S., McAllister, T. A., Scott, S., Aalhus, J., Baron, V., McCartney, D., and Mir, Z. (2004). Conjugated linoleic acid–enriched beef production. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(6), 1207S-1211S.

Milne, A., Theodorou, M. K., Jordan, M. G., King-Spooner, C., & Trinci, A. P. (1989). Survival of anaerobic fungi in feces, in saliva, and in pure culture. *Experimental Mycology,* 13(1), 27-37.

Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying; a review. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2), 183-193.

Morris, E. J., & Van Gylswyk, N. O. (1980). Comparison of the action of rumen bacteria on cell walls from Eragrostis tef. *The Journal of Agricultural Science,* 95(2), 313-323.

Moya-Camarena, S. Y., Heuvel, J. P. V., Blanchard, S. G., Leesnitzer, L. A., & Belury, M. A. (1999). Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPARα. *Journal of Lipid Research*, 40(8), 1426-1433.

Munn, E. A., Orpin, C. G., & Hall, F. J. (1981). Ultrastructural studies of the free zoospore of the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*. *Microbiology*, 125(2), 311-323.

Nagaraja, T. G., Towne, G., & Beharka, A. A. (1992). Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoa in cattle fed a high-grain diet. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8), 2410-2414.

Nagpal, R., Puniya, A. K., Sehgal, J. P., & Singh, K. (2012). Survival of anaerobic fungus *Caecomyces sp*. in various preservation methods: a comparative study. *Mycoscience*, 53(6), 427-432.

Nam, I. S., & Garnsworthy, P. C. (2007). Factors influencing biohydrogenation and conjugated linoleic acid production by mixed rumen fungi. Journal of *Microbiology*, 45(3), 199-204.

Nicolosi, R. J., Rogers, E. J., Kritchevsky, D., Scimeca, J. A., & Huth, P. J. (1997). Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. Artery, 22(5), 266-277.

Nordkvist, E. (1989). Composition and degradation of cell walls in red clover, lucerne and cereal straw.

Ogimoto, K., & Imai, S. (1981). Atlas of rumen microbiology. *Japan Scientific Societies Press.*.

Olcay, İ., Besler, H. T., Diyetisyeni, B. Ü. A. H. U., & Beslenme, H. Ü. (2012). Yeni doğanda beyin gelişimi ve omega-3 yağ asitleri. Danone Enstitüsü Türkiye Derneği, Sağlık İçin Beslenme.

Orpin, C. G., & Bountiff, L. (1978). Zoospore chemotaxis in the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis. Microbiology*, 104(1), 113-122.

Orpin, C. G. (1975). Studies on the rumen flagellate Neocallimastix frontalis. *Microbiology*, *91*(2), 249-262.

Orpin, C. G. (1977). Invasion of plant tissue in the rumen by the flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Microbiology*, 98(2), 423-430.

Orpin, C. G., & Joblin, K. N. (1997). The rumen anaerobic fungi. In The rumen microbial ecosystem (pp. 140-195). Springer, Dordrecht.

Orpin, C. G., & Munn, E. A. (1986). *Neocallimastix patriciarum* sp. nov., a new member of the *Neocallimasticaceae* inhabiting the rumen of sheep. Transactions of the British Mycological Society, 86(1), 178-181.

Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., & Anthony, S. (2009). Averrhoa bilimbi. *Agroforestry Database*, *4*, 1-5

Özdemir, N., & Denkbaş, E. B. (2003). Hayat veren yağlar: Omega yağları. *Bilim ve Teknik Dergisi*, *427*, 78-80.

Özköse, E., Ekinci, M. S., & Özcan, N. (2001). Physiological studies on the plant cell wall degrading enzymes of the rumen bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Turkish Journal of Biology, 25(2), 113-122.*

Özköse, E., Thomas, B. J., Davies, D. R., Griffith, G. W., & Theodorou, M. K. (2001). *Cyllamyces aberensis* gen. nov. sp. nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. *Canadian Journal of Botany*, 79(6), 666-673.

Özköse, E. (2001). Morphology and molecular ecology of anaerobic fungi (Doctoral dissertation, University of Wales).

Özköse, E., Akyol, I., Kar, B., Comlekcioglu, U., & Ekinci, M. S. (2009). Expression of fungal cellulase gene in *Lactococcus lactis* to construct novel recombinant silage inoculants. *Folia Microbiologica*, 54(4), 335-342.

Öztürk, S., & Çakır, İ. (2015). Mikroorganizma kültürlerinin korunmasında kullanılan kurutma yöntemleri. Akademik Gıda, 13(1), 94-100.

Panayotova-Pencheva, M. S. (2011). Species composition and morphology of protostrongylids (Nematoda: Protostrongylidae) in ruminants from Bulgaria. *Parasitology Research*, 109(4), 1015-1020.

Paillard, D., McKain, N., Chaudhary, L. C., Walker, N. D., Pizette, F., Koppova, I., and 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.

Paul, S. S., Bu, D., Xu, J., Hyde, K. D., & Yu, Z. (2018). A phylogenetic census of global diversity of gut anaerobic fungi and a new taxonomic framework. *Fungal diversity*, *89*, 253-266.

Parodi, P. W. (2004). Milk fat in human nutrition. *Australian Journal of Dairy Technology*, 59(1), 3.

Pariza, M. W., Park, Y., & Cook, M. E. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*, 40(4), 283-298.

Park, Y., Storkson, J. M., Albright, K. J., Liu, W., & Pariza, M. W. (1999). Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids,* 34(3), 235-241.

Park, Y., Albright, K. J., Liu, W., Storkson, J. M., Cook, M. E., & Pariza, M. W. (1997). Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids,* 32(8), 853-858.

Park, T., Wijeratne, S., Meulia, T., Firkins, J., & Yu, Z. (2018). Draft macronuclear genome sequence of the ruminal ciliate Entodinium caudatum. *Microbiology Resource Announcements*, *7*(1), e00826-18.

Peng, M., Tabashsum, Z., Patel, P., Bernhardt, C., Biswas, C., Meng, J., & Biswas, D. (2019). Prevention of enteric bacterial infections and modulation of gut microbiota composition with conjugated linoleic acids producing Lactobacillus in mice. *Biorxiv*, 571117.

Patapoff, T. W., & Overcashier, D. E. (2002). The importance of freezing on lyophilization cycle development. *Biopharm*, *15*(3), 16-21.,

Pittman, K. A., & Bryant, M. P. (1964). Peptides and other nitrogen sources for growth of Bacteroides ruminicola. *Journal of Bacteriology,* 88(2), 401-410.

Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie, 86*(11), 807-815.

Regensbogenova, M., Kisidayova, S., Michalowski, T., Javorsky, P., Moon-Van Der Staay, S. Y., Hackstein, J. H. P., & Pristas, P. (2004). Rapid identification of rumen protozoa by restriction analysis of amplified 18S rRNA gene.

Renes, E., Linares, D. M., González, L., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E., & Stanton, C. (2017). Production of conjugated linoleic acid and gamma-aminobutyric acid by autochthonous lactic acid bacteria and detection of the genes involved. *Journal of Functional Foods*, *34*, 340-346.

Russell, J. B., & Rychlik, J. L. (2001). Factors that alter rumen microbial ecology. Science, 292(5519), 1119-1122

Ryder, J. W., Portocarrero, C. P., Song, X. M., Cui, L., Yu, M., Combatsiaris, T., & Houseknecht, K. (2001). Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid: improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression. *Diabetes*, 50(5), 1149-1157.

Sarıçiçek, B. Z. (2007). Küçükbaş ve büyükbaş hayvan besleme. *OMÜ Ziraat Fakültesi Yayın,* (37).

Sawanon, S., & Kobayashı, Y. (2006). Synergistic fibrolysis in the rumen by cellulolytic *Ruminococcus flavefaciens* and non-cellulolytic *Selenomonas ruminantium*: evidence in defined cultures. *Animal Science Journal,* 77(2), 208-214.

Shareck, J., Nantel, A., & Belhumeur, P. (2011). Conjugated linoleic acid inhibits hyphal growth in *Candida albicans* by modulating Ras1p cellular levels and downregulating TEC1 expression. *Eukaryotic Cell*, *10*(4), 565-577.

Shin, S. Y., Bajpai, V. K., Kim, H. R., & Kang, S. C. (2007). Antibacterial activity of eicosapentaenoic acid (EPA) against foodborne and food spoilage microorganisms. *LWT-Food Science and Technology*, *40*(9), 1515-1519.

Singh, K. M., Pandya, P. R., Tripathi, A. K., Patel, G. R., Parnerkar, S., Kothari, R. K., & Joshi, C. G. (2014). Study of rumen metagenome community using qPCR under different diets. *Meta gene*, *2*, 191-199.

Skřivanová, E., Marounek, M., Dlouha, G., & Kaňka, J. (2005). Susceptibility of Clostridium perfringens to C2–C18 fatty acids. Letters in applied microbiology, 41(1), 77-81.

Stanley, D., Hughes, R. J., & Moore, R. J. (2014). Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Applied Microbiology and Biotechnology, 9*8(10), 4301-4310.

Stewart, C. S., Paniagua, C., Dinsdale, D., Cheng, K. J., & Garrow, S. H. (1981). Selective isolation and characteristics of Bacteriodes succinogenes from the rumen of a cow. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(2), 504-510.

Stewart, C. S., Flint, H. J., & Bryant, M. P. (1997). The rumen bacteria. In The rumen microbial ecosystem (pp. 10-72). Springer, Dordrecht.

St-Pierre, B., Bandarupalli, V., & Poudel, P. (2018). Rumen anaerobic fungi. J Bacteriol *Mycol Open Access,* 6(2), 73-74.

Stewart, C. S., Duncan, S. H., Richardson, A. J., Calder, A. G., & Dewey, P. J. (1995). The effect of the presence of glucose on the fermentation of mannose by the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* strain RE1. *FEMS microbiology letters,* 127(1-2), 57-63.

Stewart, Hobson, P. N., , C. S. (Eds.). (1988). *Rumen microbial ecosystem*. *Springer Science & Business Media*

Sumarmono, J., & Sulistyowati, M. (2015). Fatty acids profiles of fresh milk, yogurt and concentrated yogurt from peranakan etawah goat milk. *Procedia Food Science*, *3*, 216-222.

Sundset, M. A., Edwards, J. E., Cheng, Y. F., Senosiain, R. S., Fraile, M. N., Northwood, K. S., Wright, A. D. G. (2009). Rumen microbial diversity in Svalbard reindeer, with particular emphasis on methanogenic archaea. *FEMS microbiology ecology*, *70*(3), 553-562.

Şengül, M., Erkaya, T., & Ceyhun, A. (2011). Karın Kaymağı peynirinin yağ asidi kompozisyonu. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 42(1), 57-62.

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 and Environmental Microbiology*, 67(6), 2766-2774.

Tabashsum, Z., Peng, M., Bernhardt, C., Patel, P., Carrion, M., Rahaman, S. O., & Biswas, D. (2020). Limiting the pathogenesis of Salmonella Typhimurium with berry phenolic extracts and linoleic acid overproducing Lactobacillus casei. *Journal of Microbiology*, *58*(6), 489-498.

Theodorou, M. K., Davies, D. R., Jordan, M. G., Trinci, A. P., & Orpin, C. G. (1993). Comparison of anaerobic fungi in faeces and rumen digesta of newly born and adult ruminants. *Mycological Research*, 97(10), 1245-1252.

Theodorou, M. K., Gill, M., King-Spooner, C., & Beever, D. E. (1990). Enumeration of anaerobic chytridiomycetes as thallus-forming units: novel method for quantification of fibrolytic fungal populations from the digestive tract ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(4), 1073-1078.

Tvrzicka, E., Kremmyda, L. S., Stankova, B., & Zak, A. (2011). Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease-a review. part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical Papers of The Medical Faculty of Palacky University İn Olomouc,* 155(2).

Ünver, E., Ağma Okur, A., Tahtabiçen, E., Kara, B., & Şamlı, H. E. (2014). Tanenler ve hayvan besleme üzerine etkileri. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*.

Varel, V. H., & Dehority, B. A. (1989). Ruminal cellulolytic bacteria and protozoa from bison, cattle-bison hybrids, and cattle fed three alfalfa-corn diets. *Applied and Environmental Microbiology, 55(1), 148-153.*

Walkden-Brown, S. W., & Kahn, L. P. (2002). Nutritional modulation of resistance and resilience to gastrointestinal nematode infection-a review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,* 15(6), 912-924.

Wallace, R. J., & Mckaın, N. E. S. T. (1989). Analysis of peptide metabolism by ruminal microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology,* 55(9), 2372-2376.

Wallace, R. J. (2008). Gut microbiology–broad genetic diversity, yet specific metabolic niches. *Animal*, *2*(5), 661-668.

Wang, X., Liu, X., & Groenewald, J. Z. (2017). Phylogeny of anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota), with contributions from yak in China. Antonie Van Leeuwenhoek, 110(1),

Watkins, B. A., & Li, Y. (2002). Conjugated linoleic acids: Nutrition And Biology. Food Scıence And Technology-New York-Marcel Dekker-, 637-662. 87-103.

Webb, J., & Theodorou, M. K. (1991). *Neocallimastix hurleyensis* sp. nov., an anaerobic fungus from the ovine rumen. *Canadian Journal of Botany,* 69(6), 1220-1224.

Weimer, P. J. (1996). Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster?. *Journal of Dairy Science, 79(8*), 1496-1502.

Williams, A. G. (1986). Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiological Reviews*, 50(1), 25-49.

Williams, A. G., & Coleman, G. S. (1988). The rumen protozoa. In ''The Rumen Microbial Ecosystem'', ed. Hobson, PN.

Wong, K. K., Tan, L. U., & Saddler, J. N. (1988). Multiplicity of beta-1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews*, 52(3), 305-317.

Wonsil, B. J., Herbein, J. H., & Watkins, B. A. (1994). Dietary and ruminally derived trans-18: 1 fatty acids alter bovine milk lipids. *The Journal of Nutrition*, 124(4), 556-565.

Yokoyama, M. T., & Johnson, K. A. (1988). Microbiology of the rumen and intestine. The ruminant animal: *Digestive Physiology and Nutrition*, 125-144.

Yu, Y., Correll, P. H., & Heuvel, J. V. (2002). Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPARγ-dependent mechanism. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-*Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1581(3), 89-99.

Peng, S. S., Deng, M. D., Grund, A. D., & Rosson, R. A. (2007). Purification and characterization of a membrane-bound linoleic acid isomerase from Clostridium sporogenes. *Enzyme and Microbial Technology*, *40*(4), 831-839.

Kim, Y. J., Liu, R. H., Bond, D. R., & Russell, J. B. (2000). Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5226-5230.

Yarlett, N., Orpin, C. G., Munn, E. A., Yarlett, N. C., & Greenwood, C. (1986). Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum. Biochemical Journa*l, 236(3), 729-739.

Yang, B., Chen, H., Gu, Z., Tian, F., Ross, R. P., Stanton, C., ... & Zhang, H. (2014). Synthesis of conjugated linoleic acid by the linoleate isomerase complex in food-derived lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 117(2), 430-439.

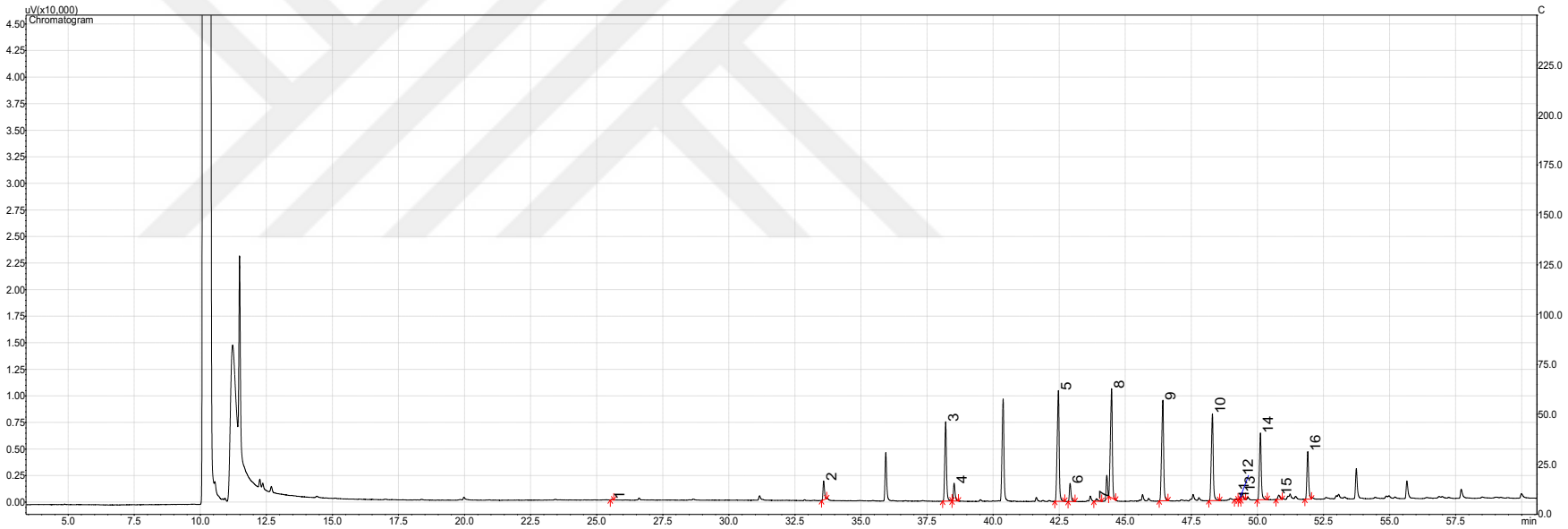
Yaquoob, P., Tricon, S., Burdge, G. C., & Calder, P. C. (2006). Conjugated linoleic acids (CLAs) and health. In Improving the fat content of foods. *Woodhead Publishing*. 82-209

Yang, B., Chen, H., Gu, Z., Tian, F., Ross, R. P., Stanton, C., ... & Zhang, H. (2014). Synthesis of conjugated linoleic acid by the linoleate isomerase complex in food-derived lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, *117*(2), 430-439.

Zheng, C. J., Yoo, J. S., Lee, T. G., Cho, H. Y., Kim, Y. H., & Kim, W. G. (2005). Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS letters*, 579(23), 5157-5162.

Ziolecki, A., & Briggs, C. A. E. (1961). The microflora of the rumen of the young calf: II. Source, nature and development. *Journal of Applied Bacteriology*, *24*(2), 148-163.

EKLER

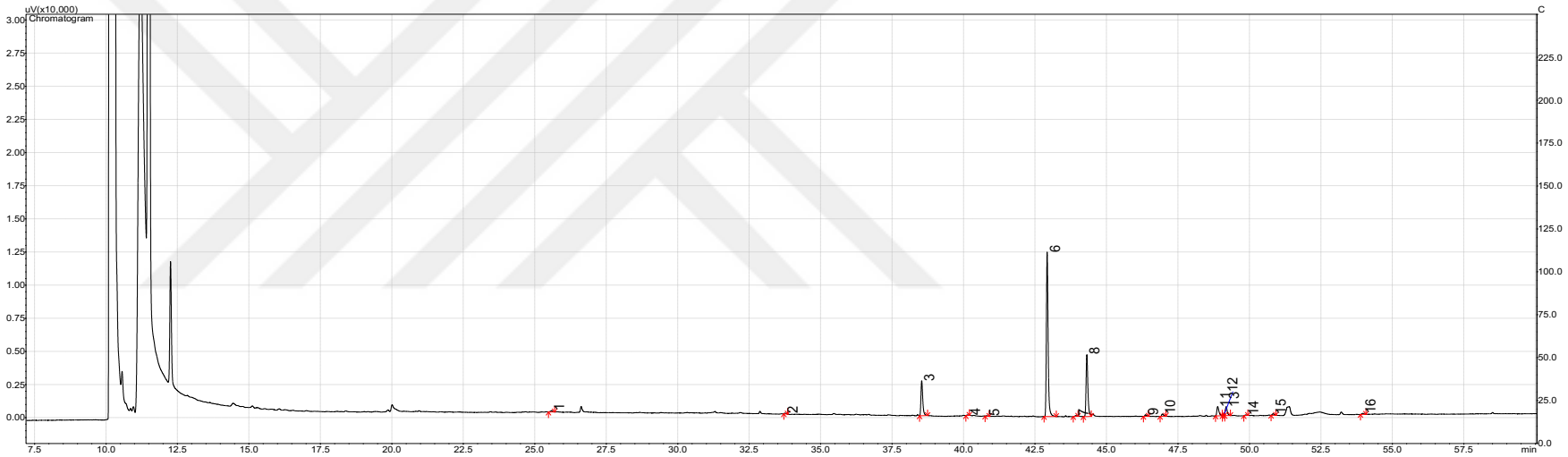


Ek Şekil 1. *Ruminococcus albus* SY3 ve *Caecomyces sp* GMLF77 besiyerine 500µl linoleik asit ilave edilerek 72 saat kombinasyonlu gelişimi sonucunda ortaya çıkan yağ asiti kompozisyonlarına ait en yüksek pikler

Peak#	Compound ID#	Compound Name	Ret.Time	Area%	Area
1	5	Undecanoic Acid (C11:0)	25.565	0.044	137.3
2	8	Myristic Acid (C14:0)	33.586	2.1861	6815.3
3	11	Cis-10 Pentadecanoic Acid (C15:1)	38.202	10.9961	34281.7
4	11	Palmitik Acid (C16:0)	38.522	2.3462	7314.5
5	15	Cis-10 Heptadecenoic Acid (C17:1)	42.467	17.3127	53974.6

6	16	Stearic Acid (C18:0)	42.91	2.3418	7301
7	17	Elaidic Acid (C18:1)	43.908	0.4248	1324.5
8	18	Oleic Acid (C18:1n9c)	44.481	16.8117	52412.5
9	20	Linoleic Acid (C18:2n6c)	46.42	15.8954	49555.9
10	23	Cis-11 Eicosenoic Acid (C20:1n9)	48.296	13.2957	41451
11	25	KLA	49.183	0.1135	353.7
12	25	KLA	49.35	0.2813	877.1
13	25	KLA	49.421	0.9553	2978.4
14	26	KLA	50.112	9.5759	29854
15	27	Behenic Acid (C22:0)	50.807	0.776	2419.3
16	28	Cis-8,11,14 Eicosatriedonic Acid (C20:3n6)	51.903	6.6434	20711.5

Ek Çizelge 1 *Ruminococcus albus* SY3 ve *Caecomyces sp* GMLF77 500µl linoleik asit ilave edilerek 72 saat kombinasyonlu gelişimi sonucunda ortaya çıkan yağ asiti kompozisyonları

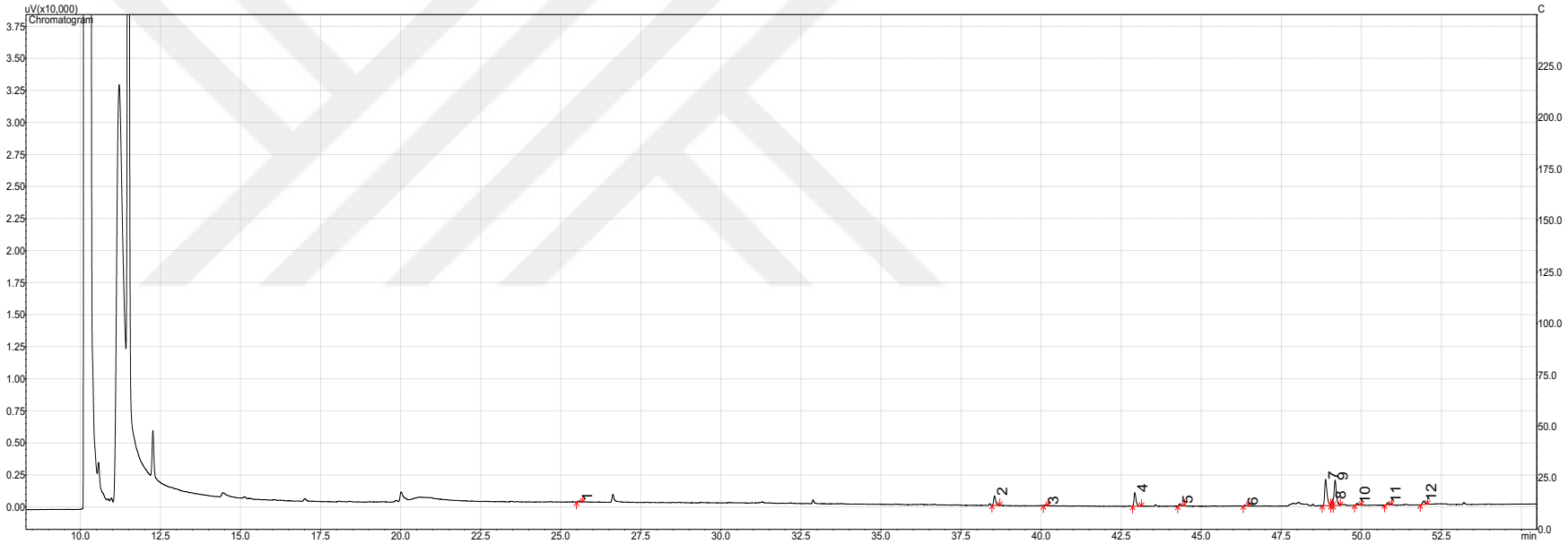


Ek Şekil 2. *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11ile *Caecomyces sp* GMLF 77 kombinasyonlu gelişimlerinde linoleik asit ilavesiz 36 saat gelişimi sonucu elde edilen en yüksek yağ asiti pikleri

Peak#	Compound ID#	Compound Name	Ret.Time	Area%	Area
1	5	Undecanoic Acid (C11:0)	25.585	0.5617	536.2
2	8	Myristic Acid (C14:0)	33.752	0.2268	216.6
3	11	Palmitik Acid (C16:0)	38.535	12.0304	11485.5
4	13	Palmitoleic Acid (C16:1)	40.131	0.1528	145.9
5	14	Heptadecanoic Acid (C17:0)	40.806	0.1651	157.6
6	16	Stearic Acid (C18:0)	42.923	54.9461	52457.4
7	17	Elaidic Acid (C18:1)	43.923	0.3151	300.8

8	17	Oleic Acid (C18:1n9c)	44.312	21.5852	20607.5
9	20	Linoleic Acid (C18:2n6c)	46.363	0.513	489.8
10	21	Arachidic Acid (C20:0)	46.957	0.8584	819.5
11	24	KLA	48.888	3.658	3492.3
12	25	KLA	49.131	0.4985	475.9
13	25	KLA	49.186	3.3147	3164.5
14	26	KLA	49.872	0.1956	186.8
15	27	Behenic Acid (C22:0)	50.827	0.5391	514.7
16	33	Cis-13,16 Docosadienoic Acid	53.968	0.4395	419.6

Ek Çizelge 2 *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11ile *Caecomyces sp* GMLF 77 kombinasyonlu gelişimlerinde linoleik asit ilavesiz 36 saat gelişimi sonucu elde edilen en yağ kompozisyonu içerisindeki yağ asitleri

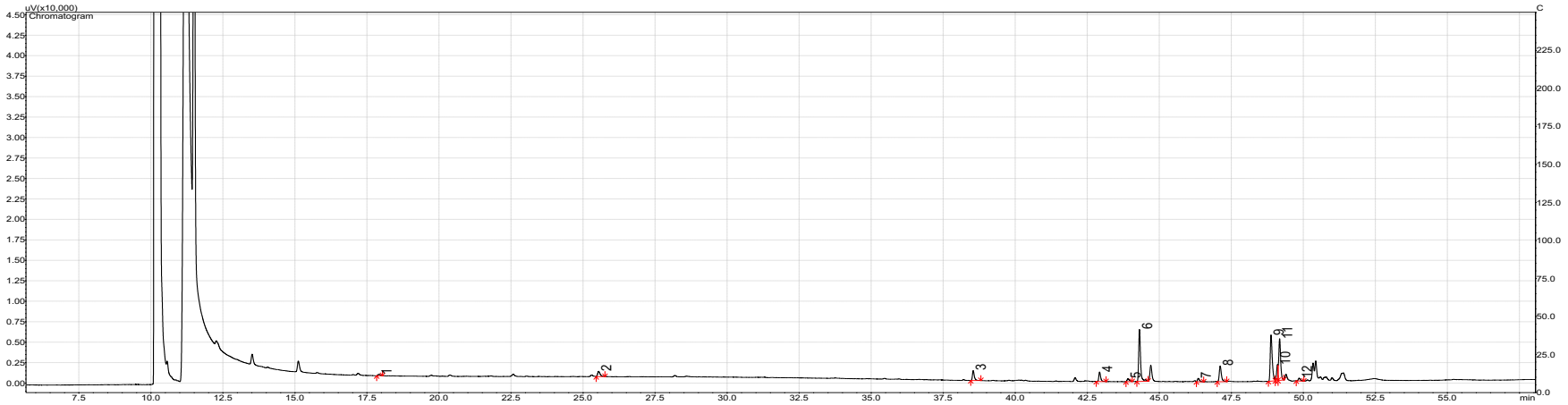


Ek Şekil 3 *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11ile *Caecomyces sp* GMLF 77 kombinasyonlu gelişimlerinde linoleik asit ilavesiz 72 saat gelişimi sonucu elde edilen en yüksek yağ asiti pikler

Peak#	Compound ID#	Compound Name	Ret.Time	Area%	Area
1	5	Undecanoic Acid (C11:0)	25.584	1.278	443.3
2	11	Palmitik Acid (C16:0)	38.543	9.8064	3401.6
3	13	Palmitoleic Acid (C16:1)	40.136	0.7841	272
4	16	Stearic Acid (C18:0)	42.926	13.9914	4853.3
5	17	Oleic Acid (C18:1n9c)	44.33	2.1827	757.1

6	20	Linoleic Acid (C18:2n6c)	46.364	0.8213	284.9
7	24	KLA	48.882	30.4523	10563.3
8	25	KLA	49.118	4.2354	1469.2
9	25	KLA	49.118	28.1941	9779.9
10	26	KLA	49.868	1.8525	642.6
11	27	Behenic Acid (C22:0)	50.828	2.262	784.6
12	28	Cis-8,11,14 Eicosatriedonic Acid (C20:3n6)	51.944	4.1398	1436

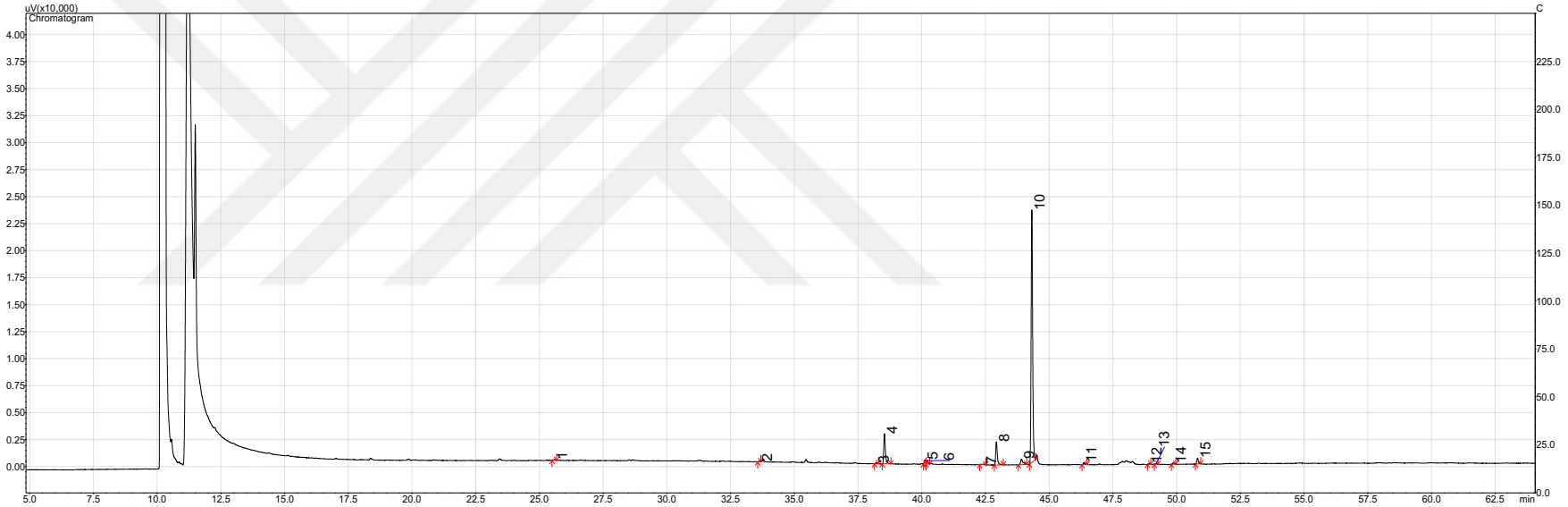
Ek Çizelge 3 *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11ile *Caecomyces sp* GMLF 77 kombinasyonlu gelişimlerinde linoleik asit ilavesiz 72 saat gelişimi sonucu elde edilen en yağ kompozisyonu içerisindeki yağ asitleri



Ek Şekil 4. *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 suşu ile *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatının besiyerleri içerisine 1000 µl Linoleik asit ilave edilerek 36 saat kombinasyonlu gelişimleri sonucunda elde edilen en yüksek yağ asiti pikleri

Peak#	Compound ID#	Compound Name	Ret.Time	Area%	Area
1	3	Caprylic Acid (C8:0)	17.911	0.7545	881.4
2	5	Undecanoic Acid (C11:0)	25.538	3.2014	3739.8
3	11	Palmitik Acid (C16:0)	38.54	4.7211	5515
4	16	Stearic Acid (C18:0)	42.925	4.4358	5181.8
5	17	Elaidic Acid (C18:1)	43.912	1.7215	2011
6	17	Oleic Acid (C18:1n9c)	44.311	24.2351	28311
7	20	Linoleic Acid (C18:2n6c)	46.351	1.791	2092.2
8	21	Arachidic Acid (C20:0)	47.112	8.3634	9770
9	24	KLA	48.878	23.6553	27633.6
10	25	KLA	49.102	5.5588	6493.7
11	25	KLA	49.176	20.0088	23373.9
12	26	KLA	49.853	1.5533	1814.5

Ek Çizelge 4 *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 suşu ile *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatının besiyerleri içerisine 1000 µl Linoleik asit ilave edilerek 36 saat kombinasyonlu gelişimleri sonucunda elde edilen yağ asiti kompozisyonu

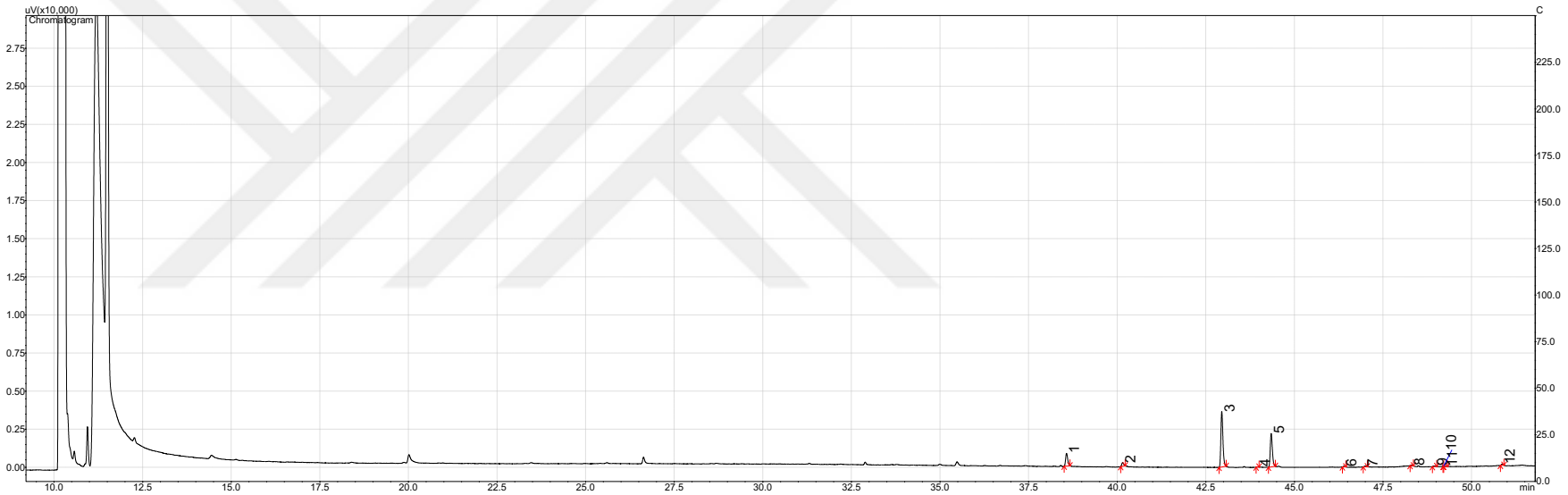


Ek Şekil 5 *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 suşu ile *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatının besiyerleri içerisine 1000 µl Linoleik asit ilave edilerek 72 saat kombinasyonlu gelişimleri sonucunda elde edilen yağ asitlerine ait pikler

Peak#	Compound ID#	Compound Name	Ret.Time	Area%	Area
1	5	Undecanoic Acid (C11:0)	25.591	0.2909	382
2	8	Myristic Acid (C14:0)	33.63	0.1381	181.4
3	11	Cis-10 Pentadecanoic Acid (C15:1)	38.21	0.2424	318.3
4	11	Palmitik Acid (C16:0)	38.535	9.2906	12199.2
5	13	Palmitoleic Acid (C16:1)	40.124	1.2161	1596.9
6	13	Palmitoleic Acid (C16:1)	40.21	1.1164	1465.9

7	15	Cis-10 Heptadecenoic Acid (C17:1)	42.423	0.3337	438.1
8	16	Stearic Acid (C18:0)	42.926	7.291	9573.7
9	17	Elaidic Acid (C18:1)	43.912	2.7001	3545.4
10	17	Oleic Acid (C18:1n9c)	44.318	73.9874	97150.7
11	20	Linoleic Acid (C18:2n6c)	46.358	0.5837	766.5
12	24	KLA	48.906	0.2481	325.8
13	25	KLA	49.202	0.2041	268
14	26	KLA	49.866	0.4784	628.1
15	27	Behenic Acid (C22:0)	50.82	1.8789	2467.2

Ek Çizelge 5. *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 suşu ile *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatının besiyerleri içerisine 1000 µl Linoleik asit ilave edilerek 72 saat kombinasyonlu gelişimleri sonucunda elde edilen yağ asiti kompozisyonu

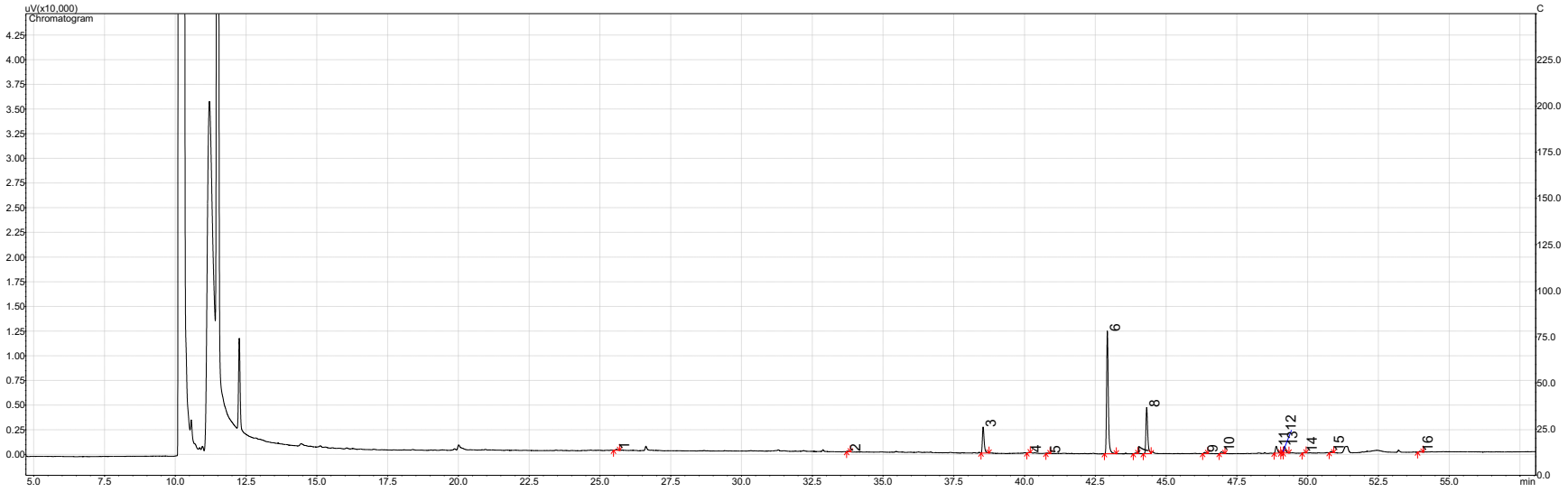


Ek Şekil 6 *Ruminocoocus albus* SY3 suşu ile *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 suşunun birlikte gelişimlerinde besiyerine 1000 µl Linoleik asit eklenerek 0 saatlik inkübasyon sonucuna göre yağ asiti kompozisyonlarını gösteren en yüksek pikler

Peak#	Compound ID#	Compound Name	Ret.Time	Area%	Area
1	3	Caprylic Acid (C8:0)	17.886	0.3496	2684.8
2	11	Palmitik Acid (C16:0)	38.488	0.2199	1688.5
3	15	Stearic Acid (C18:0)	42.861	0.4372	3357.9
4	17	Oleic Acid (C18:1n9c)	44.253	0.1947	1494.9
5	20	Linoleic Acid (C18:2n6c)	46.274	0.4009	3078.4
6	21	Arachidic Acid (C20:0)	47.051	1.2429	9545

7	24	KLA	48.822	45.7065	351008.5
8	25	KLA	49.032	7.0429	54086.9
9	25	KLA	49.123	40.1233	308132.2
10	25	KLA	49.762	3.8842	29829.3
11	26	Behenic Acid (C22:0)	50.72	0.398	3056.4

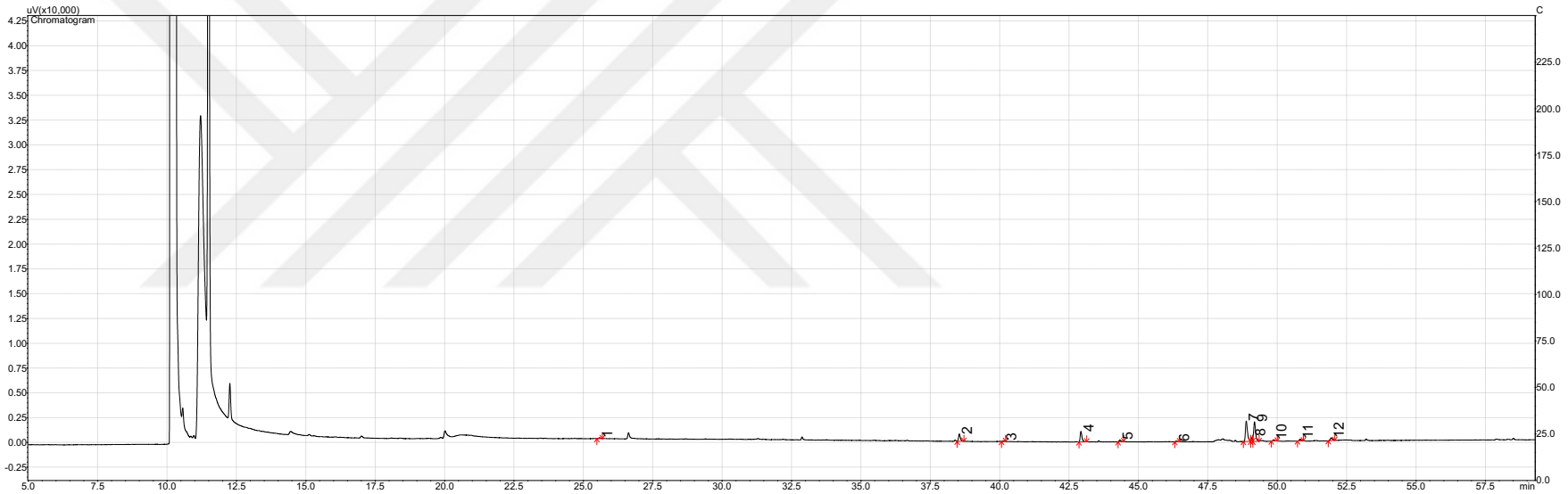
Ek Çizelge 6 *Ruminocoocus albus* SY3 suşu ile *Butrivibriyo fibrisolvens* JW11 suşunun birlikte gelişimlerinde besiyerine 1000 µl Linoleik asit eklenerek 0 saatlik inkübasyon sonucuna göre yağ asiti kompozisyonlarını gösteren en yüksek pikler



Ek Şekil 7 *Butrivibrio fibrisovens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77'nin linoleik asit ilave edilmeden 36 saatlik inkübasyon süresi boyunca kokültür gelişimleri sonucu elde edilen en yüksek yağ asiti pikleri

Peak#	Compound ID#	Compound Name	Ret.Time	Area%	Area
1	5	Undecanoic Acid (C11:0)	25.585	0.5617	536.2
2	8	Myristic Acid (C14:0)	33.752	0.2268	216.6
3	11	Palmitik Acid (C16:0)	38.535	12.0304	11485.5
4	13	Palmitoleic Acid (C16:1)	40.131	0.1528	145.9
5	14	Heptadecanoic Acid (C17:0)	40.806	0.1651	157.6
6	16	Stearic Acid (C18:0)	42.923	54.9461	52457.4
7	17	Elaidic Acid (C18:1)	43.923	0.3151	300.8
8	17	Oleic Acid (C18:1n9c)	44.312	21.5852	20607.5
9	20	Linoleic Acid (C18:2n6c)	46.363	0.513	489.8
10	21	Arachidic Acid (C20:0)	46.957	0.8584	819.5
11	24	KLA	48.888	3.658	3492.3
12	25	KLA	49.131	0.4985	475.9
13	25	KLA	49.186	3.3147	3164.5
14	26	KLA	49.872	0.1956	186.8
15	27	Behenic Acid (C22:0)	50.827	0.5391	514.7
16	33	Cis-13,16 Docosadienoic Acid	53.968	0.4395	419.6

Ek Çizelge 7 *Butrivibrio fibrisovens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77'nin linoleik asit ilave edilmeden 36 saatlik kokültür gelişimleri sonucu elde edilen yağ asiti kompozisyonları

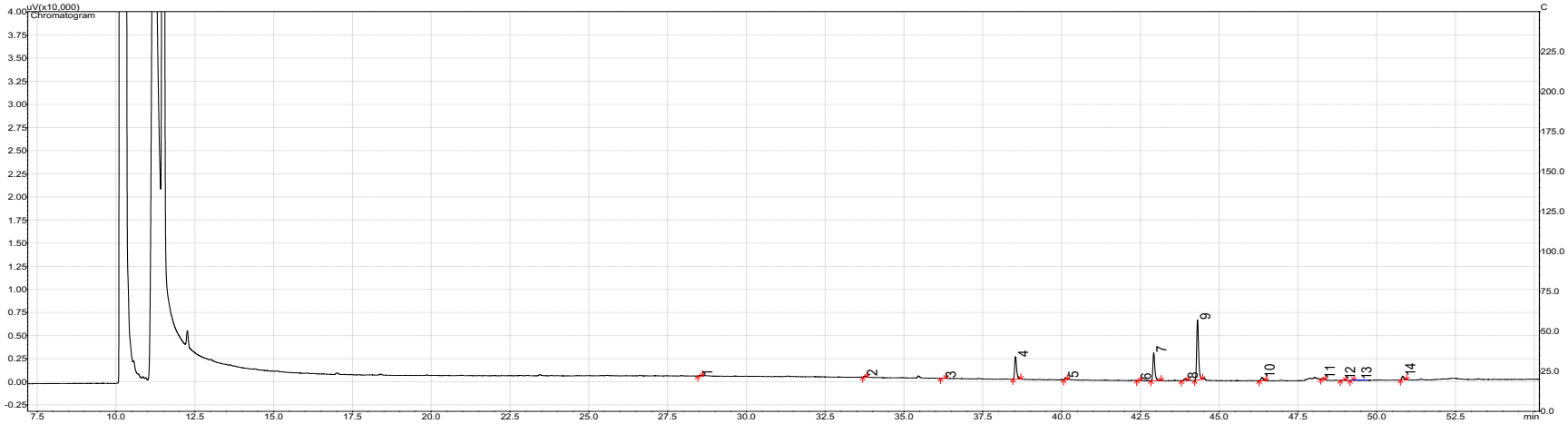


Ek Şekil 8 *Butrivibrio fibrisovens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77'nin linoleik asit ilave edilmeden 72saatlik kokültür gelişimleri sonucu elde edilen en yüksek yağ asiti pikleri

Peak#	Compound ID#	Compound Name	Ret.Time	Area%	Area
1	5	Undecanoic Acid (C11:0)	25.584	1.278	443.3
2	11	Palmitik Acid (C16:0)	38.543	9.8064	3401.6
3	13	Palmitoleic Acid (C16:1)	40.136	0.7841	272
4	16	Stearic Acid (C18:0)	42.926	13.9914	4853.3
5	17	Oleic Acid (C18:1n9c)	44.33	2.1827	757.1
6	20	Linoleic Acid (C18:2n6c)	46.364	0.8213	284.9

7	24	KLA	48.882	30.4523	10563.3
8	25	KLA	49.118	28.1941	1469.2
9	25	KLA	49.18	28.1941	9779.9
10	26	KLA	49.868	1.8525	642.6
11	27	Behenic Acid (C22:0)	50.828	2.262	784.6
12	28	Cis-8,11,14 Eicosatriedonic Acid (C20:3n6)	51.944	4.1398	1436

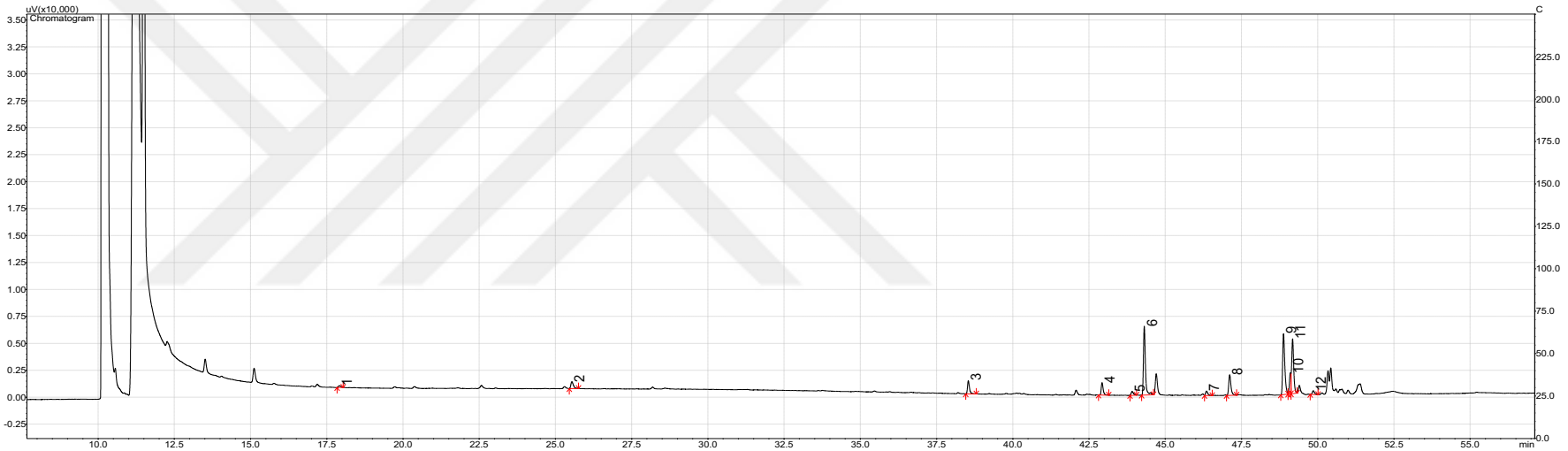
Ek Çizelge 8 *Butrivibrio fibrisovens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77'nin linoleik asit ilave edilmeden 72 saatlik kokültür gelişimleri sonucu elde edilen en yüksek yağ asiti kompozisyonu



Ek Şekil 9 *Butrivibrio fibrisovens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77'nin 500 µl linoleik asit ilave edilerek 72 saatlik kokültür gelişimleri sonucu elde edilen en yüksek yağ asiti pikleri

Compound ID#	Compound Name	Ret.Time	Area%	Area
1	Lauric Acid (C12:0)	28.517	0.4127	244.5
2	Myristic Acid (C14:0)	33.75	0.8316	492.7
3	Pentadecanoic Acid (C15:0)	36.24	0.3557	210.7
4	Palmitik Acid (C16:0)	38.536	17.6961	10484.4
5	Palmitoleic Acid (C16:1)	40.129	1.7485	1036
6	Cis-10 Heptadecenoic Acid (C17:1)	42.437	0.2548	151
7	Stearic Acid (C18:0)	42.922	22.421	13283.8
8	Elaidic Acid (C18:1)	43.917	2.0906	1238.6
9	Oleic Acid (C18:1n9c)	44.312	46.505	27552.8
10	Linoleic Acid (C18:2n6c)	46.355	2.9749	1762.5
11	Gamma Linolenic Acid (C18:3n6)	48.27	0.7375	437
12	KLA	48.909	0.4716	279.4
13	KLA	49.2	0.3045	180.4
14	Behenic Acid (C22:0)	50.821	3.1955	1893.2

Ek Çizelge 9 *Butrivibrio fibrisovens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77'nin 500 µl linoleik asit ilave edilerek 72 saatlik kokültür gelişimleri sonucu elde edilen en yüksek yağ asiti kompozisyonu



Ek Şekil 10 *Butrivibrio fibrisovens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77'nin 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 36 saatlik kokültür gelişimleri sonucu elde edilen en yüksek yağ asiti pikleri

Compound ID#	Compound Name	Ret.Time	Area%	Area
1	Caprylic Acid (C8:0)	17.911	0.7545	881.4
2	Undecanoic Acid (C11:0)	25.538	3.2014	3739.8
3	Palmitik Acid (C16:0)	38.54	4.7211	5515
4	Stearic Acid (C18:0)	42.925	4.4358	5181.8
5	Elaidic Acid (C18:1)	43.912	1.7215	2011
6	Oleic Acid (C18:1n9c)	44.311	24.2351	28311
7	Linoleic Acid (C18:2n6c)	46.351	1.791	2092.2

8	Arachidic Acid (C20:0)	47.112	8.3634	9770
9	KLA	48.878	23.6553	27633.6
10	KLA	49.102	5.5588	6493.7
11	KLA	49.176	20.0088	23373.9
12	KLA	49.853	1.5533	1814.5

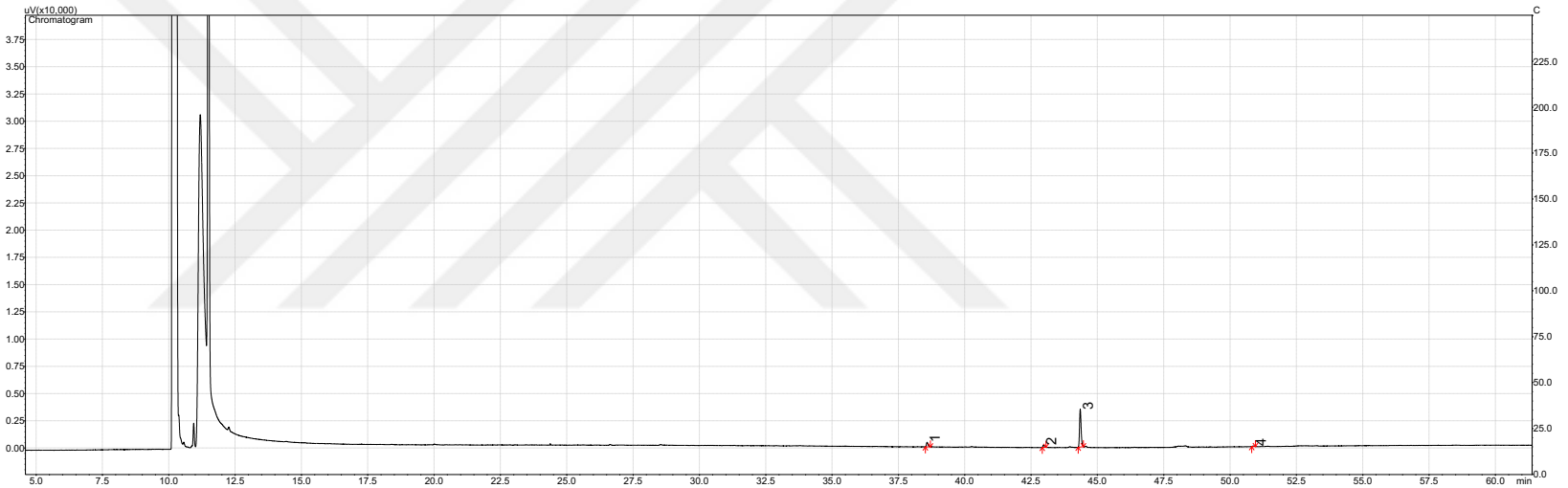
Ek Çizelge 10 *Butrivibrio fibrisovens* JW11 ve *Caecomyces sp* GMLF 77'nin 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 36 saatlik kokültür gelişimleri sonucu elde edilen en yüksek yağ asiti pikleri



Ek Şekil 11 *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatına ait linoleik asit ilave edilmeden 72 saat inkübasyon sonunda elde edilen yağ asiti pikleri

Compound ID#	Compound Name	Ret.Time	Area%	Area
1	Myristic Acid (C14:0)	33.767	0.9868	193
2	Palmitik Acid (C16:0)	38.557	13.267	2594.8
3	Stearic Acid (C18:0)	42.941	19.3762	3789.6
4	Oleic Acid (C18:1n9c)	44.337	11.9179	2330.9
5	Linoleic Acid (C18:2n6c)	46.373	1.6731	327.2
6	KLA	48.904	21.7083	4245.7
7	KLA	49.132	5.1599	1009.2
8	KLA	49.202	19.3794	3790.2
9	KLA	49.907	0.7555	147.8
10	Behenic Acid (C22:0)	50.842	5.7759	1129.7

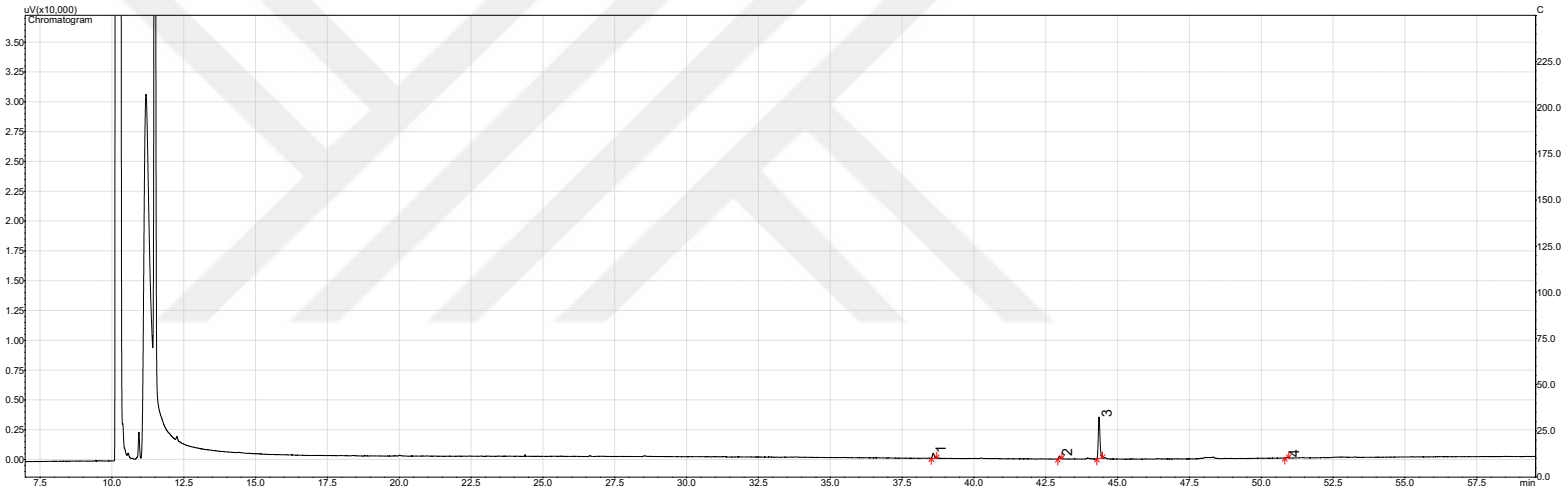
Ek Çizelge 11 *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatına ait linoleik asit ilave edilmeden 72 saat inkübasyon sonucu elde edilen yağ asiti kompozisyonu



Ek Şekil 12 *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatının 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 0 saat inkübasyon sonrasında elde edilen yağ asitlerine ait en yüksek pikler

Compound ID#	Compound Name	Ret.Time	Area%	Area
8	Myristic Acid (C14:0)	33.754	0.5111	146.6
11	Cis-10 Pentadecanoic Acid (C15:1)	38.55	21.8789	6273.4
16	Stearic Acid (C18:0)	42.938	19.0864	5472.7
17	Oleic Acid (C18:1n9c)	44.326	54.7173	15689.3
20	Linoleic Acid (C18:2n6c)	46.376	1.6166	463.5
27	Behenic Acid (C22:0)	50.84	2.1895	627.8

Ek Çizelge 12 *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatının 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 0 saat inkübasyon sonrasında elde edilen yağ asitleri

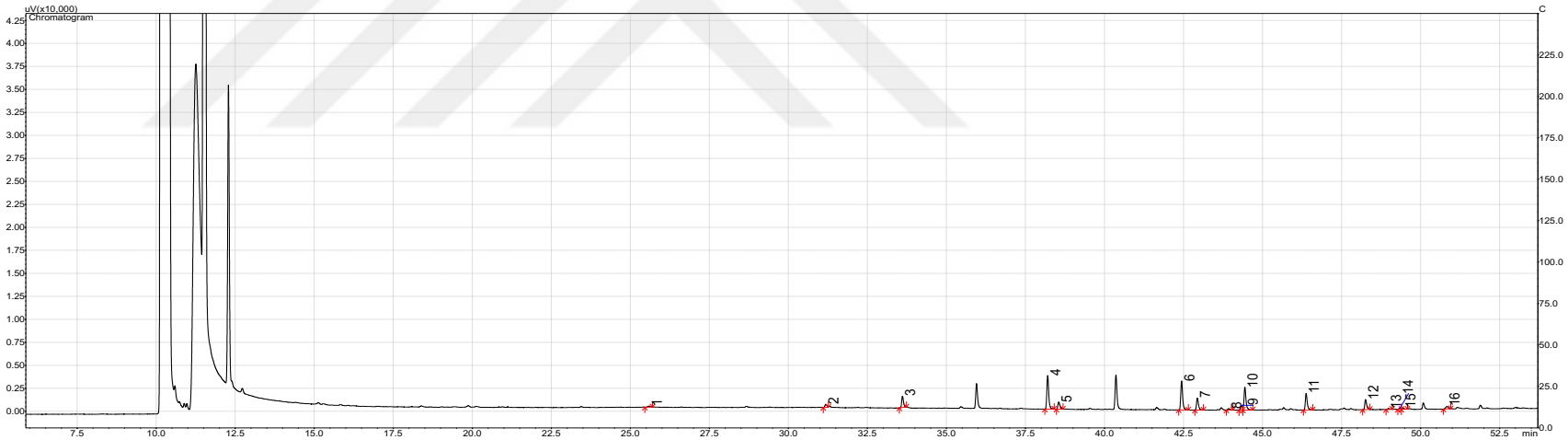


Ek Şekil 13 *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatının 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 72 saat inkübasyon sonrasında elde edilen yağ asitlerine ait en yüksek pikler

Compound ID#	Compound Name	Ret.Time	Area%	Area
11	Palmitik Acid (C16:0)	38.548	29.8995	7996.5
16	Stearic Acid (C18:0)	42.936	30.4324	8139
17	Oleic Acid (C18:1n9c)	44.33	17.7021	4734.3
20	Linoleic Acid (C18:2n6c)	46.371	2.792	746.7
24	KLA	48.909	5.1696	1382.6
25	KLA	49.155	0.6827	182.6
25	KLA	49.209	4.4904	1200.9
26	KLA	49.885	0.4142	110.8

27	Behenic Acid (C22:0)	50.841	3.7898	1013.6	

Ek Çizelge 13 *Caecomyces sp* GMLF 77 izolatının 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 72 saat inkübasyon sonrasında elde edilen yağ asitleri

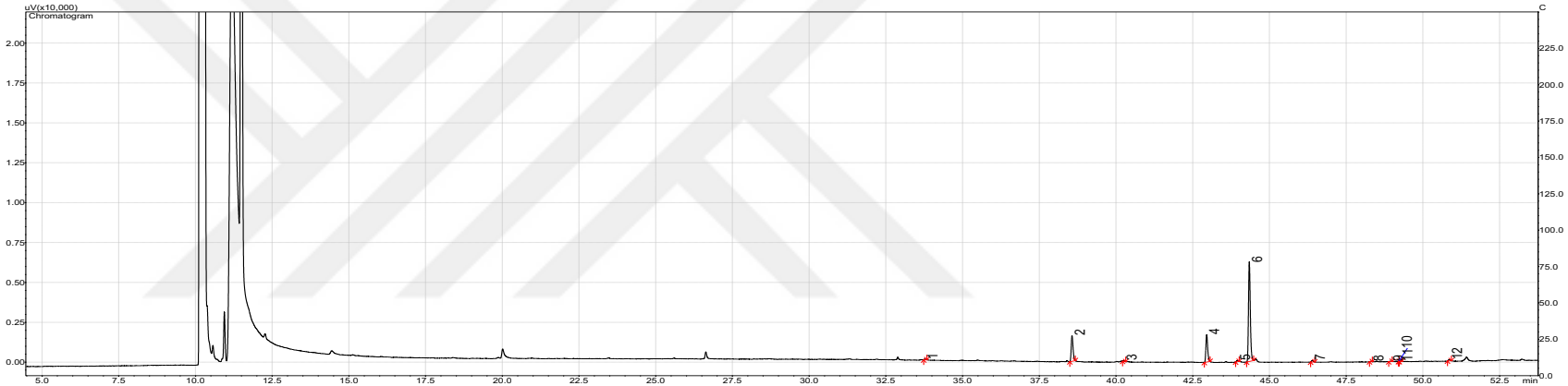


Ek Şekil 14 *Caecomyces sp* GMLF 77 ve *Neocallimastix sp* GMLF 92 izolatlarının 500 µl linoleik asit ilave edilerek 36 saat inkübasyonları sonucunda elde edilen yağ asitlerine ait en yüksek pikler

Peak#	Compound ID#	Compound Name	Ret.Time	Area%	Area
1	5	Undecanoic Acid (C11:0)	25.596	0.7321	533.5
2	7	Tridecanoic Acid (C13:0)	31.182	2.1527	1568.9
3	8	Myristic Acid (C14:0)	33.608	6.5701	4788.4
4	11	Cis-10 Pentadecanoic Acid (C15:1)	38.202	20.7034	15089.2

5	11	Palmitik Acid (C16:0)	38.551	4.6455	3385.7
6	15	Cis-10 Heptadecenoic Acid (C17:1)	42.438	17.7841	12961.5
7	16	Stearic Acid (C18:0)	42.936	7.696	5609
8	17	Elaidic Acid (C18:1)	43.926	0.877	639.2
9	17	Oleic Acid (C18:1n9c)	44.332	2.9075	2119.1
10	18	Oleic Acid (C18:1n9c)	44.44	14.6452	10673.8
11	20	Linoleic Acid (C18:2n6c)	46.377	10.2901	7499.7
12	22	Cis-11 Eicosenoic Acid (C20:1n9)	48.257	6.2135	4528.6
13	24	KLA	48.982	0.6993	509.7
14	25	KLA	49.353	0.9814	715.3
15	25	KLA	49.431	1.1361	828
16	27	Behenic Acid (C22:0)	50.833	1.9659	1432.8

Ek Çizelge 14 *Caecomyces sp* GMLF 77 ve *Neocallimastix sp* GMLF 92 izolatlarının 500 µl linoleik asit ilave edilerek 36 saat inkübasyonları sonucunda elde edilen yağ asitleri

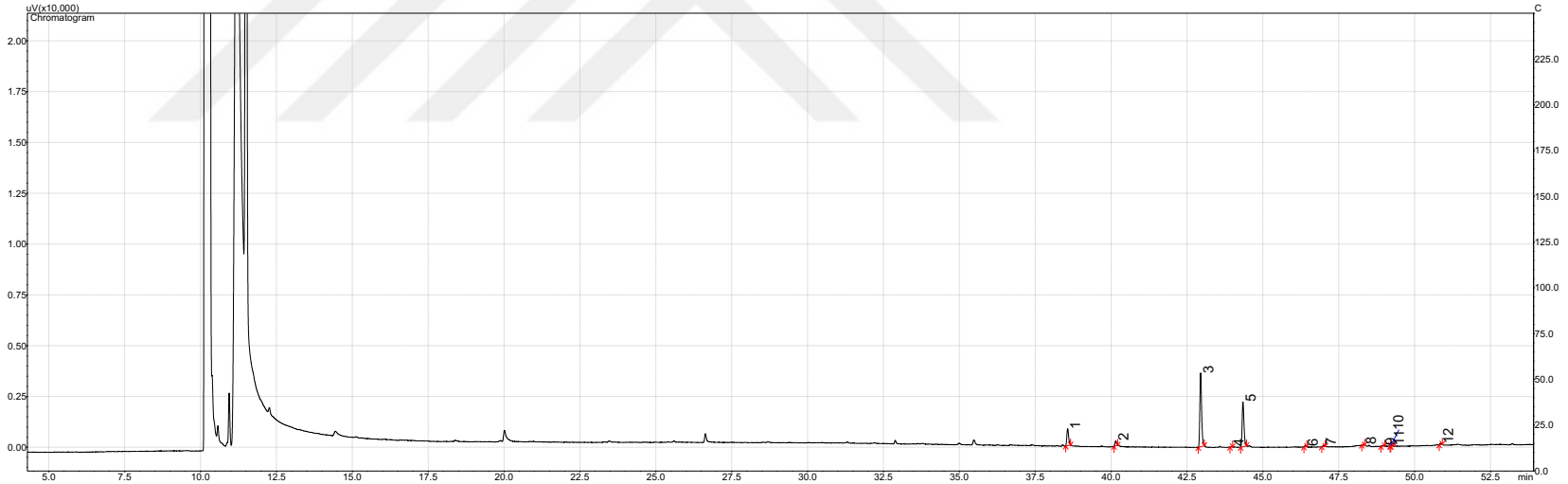


Ek Şekil 15 *Ruminococcus albus SY3* suşuna ait 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 0 saat inkübasyon sonrası yağ asitlerine ait pikler

Peak#	Compound ID#	Compound Name	Ret.Time	Area%	Area
1	8	Myristic Acid (C14:0)	33.771	0.4364	178.9
2	11	Palmitik Acid (C16:0)	38.565	16.0454	6576.4
3	13	Palmitoleic Acid (C16:1)	40.26	0.4827	197.9
4	16	Stearic Acid (C18:0)	42.953	16.9794	6959.2
5	17	Elaidic Acid (C18:1)	43.954	0.713	292.2
6	17	Oleic Acid (C18:1n9c)	44.342	62.6512	25678.3
7	20	Linoleic Acid (C18:2n6c)	46.396	0.9518	390.1
8	23	Cis-11 Eicosenoic Acid (C20:1n9)	48.302	0.277	113.5
9	24	KLA	48.947	0.3063	125.6
10	25	KLA	49.223	0.0647	26.5

11	25	KLA	49.243	0.2106	86.3
12	27	Behenic Acid (C22:0)	50.863	0.8814	361.3

Ek Çizelge 15 *Ruminococcus albus SY3* suşuna ait 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 0 saat inkübasyon sonrası yağ asitleri



Ek Şekil 16 *Ruminococcus albus SY3* suşuna ait 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 36 saat inkübasyon sonrası yağ asitlerine ait pikler

Peak#	Compound ID#	Compound Name	Ret.Time	Area%	Area
1	11	Palmitik Acid (C16:0)	38.57	11.8352	3449.4
2	13	Palmitoleic Acid (C16:1)	40.154	3.2278	940.8
3	16	Stearic Acid (C18:0)	42.95	50.2638	14649.7
4	17	Elaidic Acid (C18:1)	43.958	0.2183	63.6
5	17	Oleic Acid (C18:1n9c)	44.345	31.245	9106.5

6	20	Linoleic Acid (C18:2n6c)	46.392	0.5131	149.6
7	21	Arachidic Acid (C20:0)	46.988	0.6066	176.8
8	23	Cis-11 Eicosenoic Acid (C20:1n9)	48.304	0.399	116.3
9	24	KLA	48.953	0.5064	147.6
10	25	KLA	49.21	0.0275	8
11	25	KLA	49.229	0.3281	95.6
12	27	Behenic Acid (C22:0)	50.859	0.8292	241.7

Ek Çizelge 16 *Ruminococcus albus SY3* suşuna ait 1000 µl linoleik asit ilave edilerek 36 saat inkübasyon sonrası yağ asitleri