



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**PİYASADA SATIŞA SUNULAN ETLİK PİLİÇ
YEMLERİNİN BESİN KALİTESİ ÜZERİNE BAZI
RHIZOPUS TÜRLERİNİN ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Ahmed Adel Abdelfatah Hamza

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2023

EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

**PİYASADA SATIŞA SUNULAN ETLİK PİLİÇ
YEMLERİNİN BESİN KALİTESİ ÜZERİNE BAZI
RHIZOPUS TÜRLERİNİN ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ahmed Adel Abdelfatah Hamza

Danışman: Prof. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı

İZMİR

2023

KABUL ONAY SAYFASI

Ahmed Adel Abdelfatah Hamza tarafından Doktora Tezi olarak sunulan “Piyasada satışa sunulan etlik piliç yemlerinin besin kalitesi üzerine bazı *Rhizopus* türlerinin etkinliğinin araştırılması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 19.01.2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR

.....

Raportör Üye: Prof. Dr. Alev HALİKİ UZTAN

.....

Üye : Prof. Dr. Semra İLHAN

.....

Üye : Prof. Dr. Mustafa ATEŞ

.....

Üye : Prof. Dr. Fatih KALYONCU

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Piyasada satışa sunulan etlik piliç yemlerinin besin kalitesi üzerine bazı *Rhizopus* türlerinin etkinliğinin araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

19/ 01 / 2023

Ahmed Adel Abdelfatah Hamza

ÖZET**Piyasada satışa sunulan etlik piliç yemlerinin besin kalitesi üzerine bazı *Rhizopus* türlerinin etkinliğinin araştırılması**

Ahmed Adel Abdelfatah Hamza

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR

Ocak 2023, 158 sayfa

Etlik piliç üretim endüstrisinde en önemli ve pahalı unsur yemdir. Artan talep nedeniyle, ucuz ve etkili bir yem bulmak acil bir ihtiyaçtır. Etlik piliç yeminin probiyotik olarak kullanım potansiyeli olan funguslar ile fermantasyonu, patojenik büyümeyi önlerken besinin mevcudiyetini ve sindirilebilirliğini artırabilir.

Bu çalışmada daha önceki çalışmalarda farklı tarım topraklarından izole edilmiş ve bu çalışma kapsamında tavuk yemi ve dışkısından izole edilmiş *Rhizopus* genusuna ait izolatların probiyotik olarak kullanım potansiyelleri ve piliç beslenmesinde kullanılan yemleri fermantasyon kapasiteleri araştırılmıştır. Öncelikle izole edilmiş *Rhizopus* suşlarının endofungal bakteri içerip içermedikleri floresan mikroskobu ile incelenmiştir. Çalışmamızda endofungal bakteri içermediği saptanan toplam 94 izolat kullanılmıştır. Tüm izolatların bakteriyel ve fungal patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olup olmadığı araştırılmıştır. Geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite sergileyen suşların fenotipik ve genotipik identifikasyonu yapılmış ve izolatlar *Rhizopus oryzae* suşu olarak tanımlanmıştır. Yine geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip olanlar (toplam 10), gastrointestinal koşulları tolerans yetenekleri ve antioksidan aktivite göstermeleri açısından test edildi. 10 suşun tümü değişken gastrointestinal koşulları tolerans yeteneği ve antioksidan aktivite gösterirken, üçü (92/1, 236/2 ve 284) nispeten yüksek antioksidan aktiviteye sahip olarak saptanmıştır.

Bu potansiyel probiyotik suşların tavuk yemi üzerinde olumlu bir etkiye sahip olma yeteneklerini test etmek için, önce ticari yem örneği, ardından konvansiyonel olmayan yem örneği olan zeytin posası suşlar tarafından fermente edildi. Daha sonra kuru ağırlık, ham protein, ham yağlar, ham lifler, ham kül, şekerler ve nişastayı içeren kimyasal analizler yapılmış ve verilen değerlerden metabolize edilebilir enerji hesaplanmıştır.

Ticari yemin fungal suşlar ile fermentasyonun ardından, suşların fermentasyon kapasitesi incelenmiş ve fermente edilmemiş ticari yem ile sonuçlar kıyaslanmıştır. 92/1 izolatı ile 4 gün ve 236/2 izolatı ile 2 gün fermentasyondan sonra ham lif içeriğinde genel olarak %56'lık bir azalma gözlenmiştir. Ham protein içeriğindeki en yüksek artış (%14,5) 236/2 izolat ile 4 günlük fermentasyon sürecinden sonra meydana gelmiştir. Metabolize edilebilir enerjideki en yüksek artış, 2 günlük fermentasyondan sonra 284 izolat tarafından %8.64 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, üç suş iyi probiyotik özellik ve fermentasyon kapasitesi sergilemiştir. Dolayısıyla sonuçlar kümes hayvanları endüstrisi için faydalı olabilir.

Ayrıca, hem zeytinyağı değirmeni atıklarının (zeytin posası) üç potansiyel probiyotik *R. oryzae* (92/1, 236/2 ve 284) suşu ile fermentasyon sonrasında hem de ticari yemlerin fermente zeytin değirmeni atığı ile takviyesi üzerine kimyasal bileşimi ve metabolize edilebilir enerjisindeki değişiklikler incelenmiştir. Yalnızca geleneksel olmayan yem (zeytin posası) için, kimyasal bileşim fermentasyondan 7 ve 14 gün sonra analiz edildi. Hem ticari yem hem de zeytin posası fermentasyonunda en iyi sonuçları veren *R. oryzae* 284-suşu ile fermente edilmiş zeytin posası, ticari bir piliç yemine %20, %30 ve %40 katkı oranlarında eklenmiştir. Daha sonra katkısız ticari yem ile katkılı yemi karşılaştırmak için proksimal analizler yapıldı.

Fermente edilmemiş zeytin posasıyla karşılaştırıldığında en iyi sonuçlar, 7 günlük fermentasyondan sonra ham protein içeriğinde %23,4 artış, 14 gün sonra ham lif içeriğinde %9,8 azalma sağlayan *R. oryzae* 284-suşu tarafından elde edildi. 7 günlük fermentasyondan sonra metabolize edilebilir enerji de %3,6'lık artış gözlenmiştir. Ticari yem ile karşılaştırıldığında, %20, %30 ve %40 zeytin

posası ilave edilmiş örneğin ilave edilen zeytin posası oranına göre sırasıyla metabolize edilebilir enerjide %8,38, %2,83 artışa ve %4,27 azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Fermente zeytin posası, metabolize edilebilir enerjide herhangi bir azalmaya neden olmadan piliç yemi rasyonlarına %30'a kadar katılabilir. Gelecek vaat eden piliç üretkenliği ve sağlığı nın iyileştirmeleri amacı ile ucuz bir alternatif olarak kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: *Rhizopus oryzae* · Probiyotik aktivite · Etlik piliç yemi · Fermentasyon kapasitesi · Antimikrobiyal · Antioksidan · Tarımsal endüstriyel yan ürünler · zeytin posası



ABSTRACT

Investigation of the efficacy of some *Rhizopus* species on the nutritional quality of market broiler feed

Ahmed Adel Abdelfatah Hamza

Ph.D. in Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR

January 2023, 158 pages

The most crucial and expensive fragment in the broiler chicken production industry is the feed. Because of the rising demand, finding cheap and effective feed is an urgent necessity. Fermentation of broiler feed by probiotic fungal starters can enhance the nutrient's availability and digestibility while preventing pathogenic growth.

In this study different *Rhizopus* spp. that had been isolated from agricultural soils around Izmir, Turkey, in a previous study, as well as newly isolated *Rhizopus* strains from chicken feed and stool were tested for their probiotic potential and fermentative capacity. To prove their safety, the isolated *Rhizopus* strains first underwent microscopical fluorescent investigation to exclude endofungal bacterial presence, then, those without endofungal bacteria (totally 94) were tested for antimicrobial activity against bacterial and fungal pathogens. The ones with wide-spectrum antimicrobial activity (totally 10) were tested for gastrointestinal tolerance and antioxidant ability. Upon phenotypic and genotypic identification, the 10 isolates were found to belong to the *Rhizopus oryzae* species. While all 10 strains showed variable gastrointestinal tolerance and antioxidant activities, three of them (92/1, 236/2, and 284) had relatively high antioxidant activity.

To test the ability of these potential probiotic strains to have good effect on chicken feed, first commercial feed then non-conventional feed was fermented by them. Then chemical analyses including dry weight, crude protein, crude fats,

crude fibres, crude ash, sugars and starch were done, then metabolizable energy was calculated from the given values.

Upon fermentative capacity assay of commercial feed, compared to unfermented commercial feed, there was a general decrease in crude fiber content by 56% after fermentation by 92/1 isolate for 4 days and 236/2 isolate for 2 days. The highest increase in crude protein content (by 14.5%) occurred after a 4-day fermentation period by 236/2 isolate. The highest increase in metabolizable energy was 8.64%, by the 284 isolate after 2 days of fermentation. In conclusion, the three strains showed good probiotic properties and fermentative capacities hence can be beneficial for the poultry industry.

Also, the changes in chemical composition and metabolizable energy of both olive mill waste upon fermentation by the three potential probiotic *R. oryzae* (92/1, 236/2, and 284) strains and commercial feed upon its supplementation by fermented olive mill waste were investigated. The objective was to test whether there will be an enhancement in the nutritional value of olive mill waste after fermentation and/or commercial broiler feed upon supplementation by potentially probiotic filamentous fungi.

For the non-conventional feed (olive mill waste) only, the chemical composition was analysed after 7 and 14 days of fermentation. The fermented olive mill waste with the *R. oryzae* 284-strain, which gave the best results in both commercial feed and olive mill waste fermentation, was added to a commercial broiler feed at 20%, 30% and 40% supplementation ratios. Then proximal analyses were done to compare non-supplemented with supplemented commercial feed.

Compared to non-fermented olive mill waste, the best results were obtained by the *R. oryzae* 284-strain allowing an increase in crude protein content by 23.4% after 7 days of fermentation, a decrease in crude fibre content by 9.8% after 14 days of fermentation and an increase in ME by 3.6% after 7 days of fermentation. Compared to non-supplemented CF, the ME changes of 20%, 30% and 40% supplementation increased by 8.38%, 2.83% and decreased by 4.27%,

respectively. Fermented olive mill waste can be incorporated into broiler feed rations up to 30% without causing any decrease in metabolizable energy. It can be a cheaper alternative with promising productivity and chicken health improvements.

Keywords: *Rhizopus oryzae* · Probiotic activity · Broiler feed · Fermentative capacity · Antimicrobial · Antioxidant Agro-industrial by-products · olive mill waste



ÖNSÖZ

Dünya nüfusunun sürekli artışına ek olarak dünya çapında meydana gelen radikal ekonomik değişimler nedeniyle, ucuz doğal gıda kaynakları sağlamak için geleneksel olmayan çözümler her zaman araştırılmak zorundadır. Bu çalışmada, bazı *Rhizopus* suşlarının, ülkemizdeki pahalı yem sorununa alternatif sağlamak amacıyla hem probiyotik hem de fermantasyon başlatıcısı olarak tavuk yemi ve zeytin posasının verimliliğini artırma yetenekleri araştırılmıştır.

Tez konusunun belirlenmesinde ve çalışmanın tüm adımlarında benim yanımda olup, tecrübelerini benden esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR'a teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunarım.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (FDK-2019-21010). Bu nedenle, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkür ederiz.

İZMİR

Ahmed Adel Abdelfatah Hamza

19/01/2023

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY SAYFASI	v
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	vii
ÖZET	vii
ABSTRACT	x
ÖNSÖZ	xiii
İÇİNDEKİLER.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
TABLolar DİZİNİ.....	xx
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanatlı Endüstrisi.....	4
2.1.1. Türkiye'de Kanatlı Sektörü	5
2.1.2. Kanatlı sektörünün karşılaştığı zorluklar	7
2.2. Kanatlı yemi	8
2.3. Yem Üretiminde Tarımsal/Tarımsal-endüstriyel yan ürünlerin	9
2.3.1 Yemde zeytinyağı endüstriyel yan ürünleri	11
2.4. Probiyotikler	13
2.4.1. Probiyotiklerin tanımı.....	13

2.4.2. Probiyotik Organizmaların özellikleri.....	13
2.4.3. Kanatlı bağırsak mikrobiotası.....	14
2.4.4. Probiyotiklerin hayvanlara etki mekanizmaları.....	15
2.4.4.1. Gastrointestinal Sistem Mikrobiotasının Değişmesi: Uygun Gastrointestinal Sistem Mikrobiotasının Teşvik Edilmesi.....	17
2.4.4.2. Antimikrobiyal maddelerin üretimi.....	17
2.4.4.3. Patojenik mikroorganizmaların gen ekspresyonunda değişiklik	18
2.4.4.4. İmmünomodülasyon	18
2.4.4.5. Kolonizasyon Direnci.....	19
2.4.5. Hayvan yemlerinde probiyotikler.....	20
2.4.5.1. Yem katkı maddesi olarak probiyotikler.....	21
2.4.2. Hayvancılıkta Probiyotik Olarak Filamentli Fungusların Kullanımı ..	22
2.5. Fermentasyon	26
2.5.1. Katı Hal Fermentasyonu	28
2.5.2. Fermentasyon başlatıcılar olarak filamentöz funguslar.....	29
2.6. <i>Rhizopus spp.</i>	31
2.6.1. <i>Rhizopus oryzae</i>	32
2.7. Probiyotik özelliklerin taranması.....	34
2.7.1 Güvenlik.....	35
2.7.2. Antimikrobiyal etkinlik	38
2.7.3. Gastrointestinal sistem toleransı.....	39
2.7.4. Antioksidan kapasitesi.....	40

2.8. Yem özellikleri ve kimyasal bileşimleri	41
2.8.1. Kuru madde	42
2.8.2. Ham Protein	42
2.8.3. Ham Yağ	44
2.8.4. Ham Lif	45
2.8.5. Ham Kül	46
2.8.6. Nişasta	46
2.8.7. Şeker	47
2.8.8. Diyet enerjisi	47
3. GEREÇ VE YÖNTEM	50
3.1. Gereç	50
3.1.1. Çalışma Materyalleri	50
3.1.2. Antimikrobiyal Aktivite Test Organizmaları	50
3.1.3. Besiyerleri	51
3.1.5. DNA İzolasyonu Kiti (ZymoResearch Mini Prep-D6005)	59
3.1.6. Fermantasyon Substratları	60
3.1.7. Kullanılan Başlıca Cihazlar	60
3.2. METOD	61
3.2.1. Fungus İzolasyonu	61
3.2.2. Floresan Mikroskobu	62
3.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Testi	62
3.2.3.1. Antibakteriyal Aktivite Testi	63

3.2.3.2. Antifungal Aktivite Testi.....	63
3.2.4. Gastrointestinal koşullar tolerans tahlili	64
3.2.4.1. Ön Denemeler	64
3.2.4.2 Kantitatif testler	65
3.2.5. Antioksidan aktivite Tayini.....	65
3.2.5.1. Fungal Ekstrenin Hazırlanması.....	65
3.2.6. Fenotipik ve genotipik tanımlama	67
3.2.6.1. Fenotipik tanımlama.....	67
3.2.6.2. Genotipik tanımlama	68
3.2.7. <i>Rhizopus oryzae</i> suşlarının Fermentasyon kapasitesinin Araştırılması	71
3.2.8. İstatistiksel analizler	73
4. Bulgular.....	75
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	105
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	Error! Bookmark not defined.
KAYNAKLAR DİZİNİ	121
Ek I. <i>Rhizopus</i> suşlarının fenotipik özellikleri.....	155
Ek. II İzole edilen <i>Rhizopus</i> suşlarının fenotipik özellikleri.....	156
TEŞEKKÜR	157
ÖZGEÇMİŞ.....	158

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil

Sayfa

Şekil 3.1. RE100-Pro DLAB Rotary Vacuum evaporatör.	66
Şekil 4.1. Zeiss Axio Z1 floresan mikroskobu altında <i>Rhizopus</i> izolatının miselyumu.....	76
Şekil 4.2 a. <i>P. aeruginosa</i> ekilmiş petri (kontrol amacı ile kullanılmıştır) b. <i>P. aeruginosa</i> 'ya karşı inhibisyon zonu gösteren 92/1 kodlu <i>Rhizopus</i> izolatının antibakteriyel aktivitesi. c. <i>P. aeruginosa</i> 'ya karşı bir inhibisyon zonu gösteren 236/2 kodlu <i>Rhizopus</i> izolatının antibakteriyel aktivitesi. d. <i>A. flavus</i> ekilmiş petri (kontrol amacı ile kullanılmıştır). e. <i>A. flavus</i> 'a karşı 32 kodlu <i>Rhizopus</i> izolatının antifungal aktivitesini gösteren inhibisyon zonu. f. Tüm petride büyüyen ve <i>A. flavus</i> 'un büyümesini tamamen engelleyen 228 kodlu <i>Rhizopus</i> izolatının antifungal aktivitesi.....	77
Şekil 4.3. Simüle edilmiş mide suyu pH 2 ve safra solüsyonu %2 içinde 10 adet <i>R. oryzae</i> izolatının hayatta kalma süresi.....	86
Şekil 4.4. DPPH testinde farklı konsantrasyonlarda Pozitif kontrol ve 10 adet <i>R. oryzae</i> ekstrakt numunelerinin a. Absorbans değerlerinin ve b. serbest radikal temizleme yeteneğinin karşılaştırılması... Error! Bookmark not defined.	
Şekil 4.6. a. 7 gün, 25°C'de MEA üzerinde büyütülen 284 kodlu <i>Rhizopus</i> izolatın petri görüntüsü b. 400x büyütmede rhizoid şekli ve sporangioforlarının dallanması, c. 400x büyütmede sporangianın şekli, d. 1000x büyütme altında sporangiosporlarının şekli.	92
Şekil 4.7. 10 adet <i>Rhizopus</i> izolatının ITS1–5,8S–ITS2 PCR sonucu elde edilen ürünlerin jel görüntüsü. M: Molekül ağırlığı standardı K: Negatif kontrol,.....	93

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1 Kullanılan organizmalar	50
Tablo 3.2. Dichloran Glycerol Agar besiyerin Bileşimi.....	51
Tablo 3.3. Potato Dextrose Agar Besiyerin Bileşimi.....	52
Tablo 3.4. Malt Extract Broth besiyerin Bileşimi	53
Tablo 3.5. Yeast Malt Extract Agar besiyerin Bileşimi.....	53
Tablo 3.6. Plate Count Agar besiyerin Bileşimi	54
Tablo 3.7. Malt Extract Agar besiyerin Bileşimi.....	54
Tablo 3.8. Czapek Yeast Agar besiyerin Bileşimi	55
Tablo 3.9. DNA İzolasyonu Kitinin içindekileri.....	59
Tablo 3.10. ITS-PCR için reaksiyon bileşenleri ve miktarları.....	69
Tablo 3.11. ITS PCR amplifikasyon koşulları.....	70
Tablo 4.1. 10 <i>Rhizopus</i> izolatının 4 bakteri, 4 maya ve 2 küfe karşı antimikrobiyal aktivitesi, inhibisyon zon çapları..Error! Bookmark not defined.	
Tablo 4.2. 4 bakteri, 4 maya ve 2 filamentli fungusa karşı en yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren 10 <i>Rhizopus</i> izolatı, inhibisyon zonu.....Error! Bookmark not defined.	
Tablo 4.3. Asidite ve alkalilik ön denemelerin kalitatif sonuçları	85
Tablo 4.4. 10 <i>Rhizopus</i> suşunun safra tuzuna ve simüle edilmiş mide suyuna maruz bırakılmadan önce ve sonraki sonuçların karşılaştırılması ile elde edilen farkı ve önemini gösteren istatistiksel analiz.	87
Tablo 4.5. 10 <i>Rhizopus</i> suşunun IC ₅₀ 'sini Askorbik Asit kontrolü ile karşılaştırmanın farkını ve önemini gösteren istatistiksel analiz.	89

Tablo 4.6. Moleküler olarak tanılanan <i>Rhizopus</i> spp.'lerin i sonuçları.....	92
Tablo 4.7. Ticari yemin fermentasyonundan önce ve sonra test <i>Rhizopus</i> izolatlarının kuru maddeleri.....	94
Tablo 4.8. Fermentasyondan önce ve sonra ticari yemin (TY) kuru madde içeriği karşılaştırılmıştır. Farkı ve önemi gösteren istatistiksel analiz.	94
Tablo 4.9. Fermentasyon öncesi ve sonrası ticari yemin kimyasal bileşimi ve metabolize edilebilir enerjideki değişiklikleri gösteren tablo.Error! Bookmark not defined.	
Tablo 4.10. 3 <i>Rhizopus</i> suşu ile fermentasyondan önce ve sonra ticari yemin (TY) bileşimlerinin ve metabolize edilebilir enerji (ME) değişiminin karşılaştırılması ve önemini gösteren tablo.....	97
Tablo 4.11. ZP'nin fermentasyondan önce ve sonra test <i>R. oryzae</i> suşlarının kuru maddesi.....	98
Tablo 4.12. Fermentasyondan önce ve sonra zeytin posasının (ZP) kuru maddesini karşılaştırmanın farkını ve önemini gösteren istatistiksel analiz. 98	
Tablo 4.13. Fermentasyon öncesi ve sonrası zeytin posasının kimyasal bileşimi ve metabolize edilebilir enerjideki değişikliklerError! Bookmark not defined.	
Tablo 4.14. 3 <i>Rhizopus</i> suşu ile fermentasyondan önce ve sonra zeytin posasının (ZP) bileşimlerinin ve metabolize edilebilir enerji verilerinin karşılaştırılması ve önemini gösteren istatistiksel analiz.	101
Tablo 4.15. FZP ile takviyeli ve takviyesiz TY'nin kimyasal bileşimi ve takviyeden sonra metabolize edilebilir enerjideki değişiklikleri gösterilir.	Error! Bookmark not defined.

Tablo 4.16. 3 *Rhizopus* suşu ile fermente zeytin posası (FZP) ile takviyeden önce ve sonra ticari yemin bileşimlerinin ve metabolize edilebilir enerjisinin (ME) karşılaştırılmasının farkını ve önemini gösteren istatistiksel analiz. ..104

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
°C	Santigrat derece
g	gram
dk	Dakika
PDA	Potato Dextroz Agar
MEA	Malt Extract Agar
MEB	Malt Extract Broth
TBE	Tris Borik Asit Edta
µm	Mikrometre
m	Mililitre
mm	Milimetre
g/L	gram/Litre
TY	Ticari Yem
ZP	Zeytin Posası
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
USDA	United States Department Of Agriculture (Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı)
MMT	Milyon Metrik Ton
ZK	Zeytin Küspesi
ZDA	Zeytin Değirmeni Atığı
ZDAS	Zeytin Değirmeni Atıksuyu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
HCl	Hidroklorik Asit
GIT	Gastrointestinal Trakt
LAB	Laktik Asit Bakterileri
KHF	Katı Hal Fermantasyonu
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
GRAS	Genellikle Güvenli Olarak Kabul Edilir

CAC	Codex Alimentarius Komisyonu
ANF	Anti-Nutrisyonel Faktör
SCP	Tek Hücre Proteini
MBP	Mikrobiyal Biyokütle Proteini
LC-PUFA	Karbondan Oluşan Uzun Zincirli Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
ME	Metabolize Edilebilir Enerji
DG-18	Dichloran Glycerol Agar
YMA	Yeast Malt Extract Agar
PCA	Plate Count Agar
CYA	Czapek Yeast Agar
DPPH	2,2-Diphenylpicryl- Hydrazyl
PCR	Polymerase Chain Reaction
ITS	Dahili Transkripsiyonlu Ayırıcı
UV	Ultraviyole
nm	Nanometre
ATCC	American Type Culture Collection
IC50	50'de İnhibisyon Konsantrasyonu
FZP	Fermente Edilmiş Zeytin Posası
FTY	Fermente Edilmiş Ticari Yem
UZP	Fermente Edilmemiş Zeytin Posası
UTY	Fermente Edilmemiş Ticari Yem
SEM	Ortalamaların Standart Sapması
ANOVA	Analysis Of Variance
TP	Tam Plaka İnhibisyon Bölgesi
SGJ	Simüle Mide Suyu
BS	Safra Tuzu
P	Olasılık
IP	İnhibisyon Yüzdesi
ns	Önemi Yok

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun sürekli artması nedeniyle protein bazlı gıdalara büyük bir talep vardır. Tavuk eti, sindirilebilirliği yüksek, sağlıklı ve besleyici olmasının yanı sıra diğer protein kaynaklarına göre daha ucuz ve üretilmesi daha kolay olması nedeniyle bu talebin karşılanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Siegel, 2014; Kralik et al., 2018). Türkiye'de talep artışına rağmen kanatlı sektörü yem fiyatlarının yüksekliği nedeniyle bu talebi karşılayamamıştır (USDA, 2021). Etlik piliç üretiminde en büyük ve en pahalı girdi yemdir ve üretim girdisinin %65-70'ini oluşturmaktadır (FAS et al., 2015). Türkiye, toplam kanatlı yem ihtiyacının yaklaşık %40'ını ithal etmektedir (USDA, 2017). Bu nedenle, geleneksel olmayan yem kaynakları araştırılmalıdır. İyi özelliklere sahip yerel yem üretmenin güvenli ve etkili bir yolu, fermantasyon başlatıcıları olarak probiyotiklerin eklenmesidir (AD et al., 2018). Besinlerin sindirilebilirliği ve yiyeceklerin mevcudiyeti fungal fermantasyon ile arttırılabilir ve bu da potansiyel patojenlerin gelişimini engeller (Londoño-Hernández et al., 2017).

Tavuk yemlerine uygulanan en iyi çalışılmış probiyotikler, bazı bakteri türleri (Yudiarti et al., 2014) veya mayalardır (Rochell, 2018) ancak birçok filamentli fungusun da probiyotik potansiyeli olduğu kanıtlanmıştır (Sugiharto, 2019). Etlik piliç yemi fermantasyon başlatıcıları olarak *Rhizopus oryzae* suşları çalışılmış olmakla birlikte yapılan çalışmalar çok sınırlıdır (Sugiharto et al., 2015).

Tavuk yemine *R. oryzae* eklemede dikkat edilemesi gereken en önemli hususlardan biri güvenliğidir. Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), *R. oryzae*'nin genlerini, enzimlerini ve diğer bazı biyoaktif maddelerini GRAS (Generally Recognized As Safe) olarak kabul etmektedir ve yüzyıllardır insan tüketimi için kullanılmaktadır (Cantabrana et al., 2015; Londoño-Hernández et al., 2017; Karimi et al., 2019). Ayrıca bilimsel literatürde *R. oryzae* tarafından doğrudan toksin üretimi bildirilmemiştir. Ayrıca, birçok literatür, gıda toksinlerine karşı detoksifiye edici bir ajan olarak kullanıldığını bildirmektedir (Cantabrana et al., 2015).

Bununla birlikte, son çalışmalar, endofungal bakteri içeren suşlar ikincil metabolitler üretebildiğinden kullanılan *Rhizopus* suşlarının endofungal bakteri içerip içermediğinin araştırılmasının da çok önemli olduğunu göstermiştir. Bu toksinlerin en iyi bilinen örnekleri rhizoxin ve rhizonindir. Fungal sitozolde bulunan endofungal bakteriler tarafından üretilen bu toksinler önem kazanmıştır. Rhizoxin, *R. microsporus*'tan izole edilen endosimbiont bir bakteri olan *Burkholderia rhizoxinica* tarafından üretilir (Partida-Martinez and Hertweck, 2005; Partida-Martinez et al., 2007a; Schmitt et al., 2008; Lackner and Hertweck, 2011; Moebius et al., 2014). Rhizonin A ve B ilk olarak Mozambik yer fıstığından izole edilen toksin üreten *R. microsporus* suşundan (MRC 303) izole edilen *Burkholderia endofungorum* tarafından üretilir. Bakteriler toksin üretemese bile fungal miselyumundan bakteriyel endosimbiontlar salınırsa ciddi problemler ortaya çıkabilir (Dolatabadi et al., 2016; Birol ve Gunyar, 2021).

Bir mikroorganizmanın probiyotik olarak kullanılabilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekir; bunlardan biri antimikrobiyal aktivitedir. Sentetik antibiyotikleri hayvancılık sektöründe hastalıkları önlemek ve yaygın normal mikrobiyotanın yem nutrientlerini kullanmasını engelleyerek hayvanın yemden yararlanımını artırmak amacıyla 50 yılı aşkın bir süre kullanılmıştır. Ancak insanlar tarafından tüketilen hayvansal kökenli bu gıdalarda antibiyotik kalıntıları olduğu tespit edilmiş ve antibiyotik direnci sorununa katkıda bulunduğu için kullanımı artık yasaklanmıştır. Bu nedenle, sentetik antibiyotiklerin yerine geniş spektrumlu bir antimikrobiyal aktiviteye sahip probiyotik kullanımı, patojenlere karşı savaşta önemli rol alacaktır (Sugiharto et al., 2015). Bir diğer önemli özelliği ise tavuğun bağışıklığını artıran antioksidan aktivitedir (Smith et al., 2015). Ayrıca probiyotiklerin tavuk içinde üremesi ve metabolitlerini üretmesi için gastrointestinal sistem bileşiklerini tolere edebildiğini kanıtlaması gerekir (Kabir, 2009).

Funguslar tarafından yapılan fermentasyon karmaşık lignoselülozik materyaller daha erişilebilir ve daha basit formlara ayrıldığında, hayvan için yem maddesinin biyoyararlanımını artırmış olur (Shrivastava et al., 2014; Sugiharto et al., 2015; Y and , Muazu AJ , Jumare FI , Mahmuda A , Gani M , Hussaini H , Dagona AG, 2018; Olukomaiya et al., 2019). Ayrıca yemin protein içeriğini ve

toplam enerjisini arttırmada rol oynadığı (Ezekiel et al., 2010; Karimi et al., 2019; Dawood et al., 2020) ve dolayısıyla yem verimliliğini arttırdığı da rapor edilmiştir (Ab Jalil et al., 2014; Khempaka et al., 2014; Al-Harhi, 2016; Utama and Hanim, 2017; Sugiharto and Ranjitkar, 2019). Bu nedenle, fermentasyon geleneksel ticari yemin (TY) üretkenliğini arttırdığında, tavuğun uygun pazar ağırlığına ulaşması için daha az miktarlarda yem kullanılması mümkün olmaktadır.

Her ülke veya bölge, en uygun tarımsal sanayi atığının geleneksel olmayan bir yem bileşeni olarak verimliliğini araştırmayı hedefler. Türkiye'de Ege bölgesi, dünyanın zeytin ve zeytinyağı üretimine önemli bir katkı yapmaktadır (Gökçebağ vd., 2013; Büyükgök ve Saygin Gümüşkesen, 2017) . Sonuç olarak, her yıl yan ürün olarak büyük miktarlarda zeytin posası (ZP) elde edilir (El Hachemi et al., 2007). Türkiye'de yılda yaklaşık 200–250 bin ton ZP üretilmektedir (Guneser vd., 2017).

Bu çalışmada, tarım topraklarından izole edilen *Rhizopus* suşlarının endofungal bakteri içermediğinden emin olmak için ilk olarak test edilmiştir. Daha sonra, fungal izolatlarının antioksidan aktivitesine ek olarak antimikrobiyal aktivite, gastrointestinal koşullara toleransı gibi bazı ana probiyotik özellik yönünden tarama yapılmıştır. En yüksek probiyotik özelliklere sahip izolatların fenotipik ve genotipik olarak tanı yapılmıştır. Son olarak TY'nin ardından ZP'nın potansiyel probiyotik özelliklere sahip *R. oryzae* suşları ile fermentasyona tabi tutulmuştur. Yine TY ve fermente edilmiş ZP'nın farklı oranlardaki karışımları, fermentasyon sonrasında yemin kimyasal bileşimlerinde ve metabolize edilebilir enerjisinde bir gelişme olup olmadığını görmek için analiz edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanatlı Endüstrisi

Dünya nüfusu sürekli ve hızla artmaktadır ve 2050 yılına kadar 9,8 milyara ulaşması beklenmektedir (Kleyn and Ciacciariello, 2021). Bu hızlı artış, gıda ihtiyacının da artmasına neden olmaktadır. Hayvansal kaynaklı besinler beslenmemizde önemli bir rol oynamaktadır ve bir yetişkinin ihtiyaç duyduğu günlük proteinin önemli bir yüzdesini karşılamaktadır (Yenilmez vd., 2014). Dolayısıyla, hayvansal ürünlere yönelik küresel talebin %60 ila %70 oranında artacağı (Krysiak et al., 2021) ve bu artışta gelişmekte olan ülkelerin daha büyük bir paya sahip olacağı tahmin edilmektedir (Makkar, 2018). Kümes hayvanları endüstrisi, dünyadaki uygun fiyatlı hayvansal protein arzına önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (Nezih Okur vd., 2016). 2020 yılına gelindiğinde kanatlı sektörü dünya çapında 130 milyon ton piliç eti üretimine ulaşmış ve dünyada en çok tüketilen hayvan eti haline gelmiştir (Borda-Molina et al., 2018; Carrasco et al., 2019; Mota de Carvalho et al., 2021).

Küresel piliç eti tüketimi, diğer herhangi bir hayvansal protein kaynağından daha hızlı bir oranda artmıştır (Wu et al., 2019). Kanatlı sektörü, daha verimli hale gelerek ucuz ve güvenli ürünlere yönelik artan talebe uyum sağlamıştır. Tüketici açısından bakıldığında, kümes hayvanlarının diğer hayvansal protein formlarına göre birçok avantajı vardır. Bunlar arasında kolaylık, tutarlı ürün kalitesi, dini kısıtlamaların olmaması, sağlıklı görünen beyaz et, sürekli yenilikçi ürün akışı ve satın alınabilirlik sayılabilir (Kleyn and Ciacciariello, 2021). Beyaz et (kümes hayvanları eti), kırmızı ete (dana eti) kıyasla çok ucuzdur, bir kg hayvan etinin fiyatı 3-4 kg kanatlı etinin fiyatına eşittir (Wahyono and Utami, 2018). Buna ek olarak, kümes hayvanları, diğer hayvansal ürün formlarından daha iyi bir şekilde yemden gıdaya dönüşüm oranına ve üretilen et miktarı veya yumurta başına değerlendirildiği zaman kaynak kullanımı açısından daha az bir çevresel ayak izine sahiptir (Vaarst et al., 2015; Fry et al., 2018; Godfray et al., 2018). Yenilebilir porsiyon başına proteinden faydalanma açısından bakıldığında, kümes hayvanları geniş getiren hayvanlardan veya su ürünleri yetiştiriciliğinden çok daha verimlidir (Fry et al., 2018). Yine kanatlı

üretiminde kilogram başına 2 ile 2,5 kg yem gerekirken, bir kilogram kırmızı et üretiminde 7 kg'dan fazla yeme ihtiyaç vardır. Ayrıca kanatlı üretiminin üretim döngüsünün 7-8 hafta gibi kısa bir süre sürmesi nedeniyle ekonomik olarak daha avantajlıdır. Bu şekilde kanatlı hayvan üretimi sermaye döngüsünde yılda 7 kez tekrarlanabilir ve diğer hayvanlara göre daha küçük bir alana ihtiyaç duyar (Wahyono and Utami, 2018).

Kanatlı etinin yüksek talep görmesine ve buna bağlı olarak üretim artışına katkıda bulunan diğer faktörler arasında finansal gelir, kentleşme, sağlık-fayda ilişkisi (örn. obezite, kardiyovasküler hastalıklar ve tip 2 diyabet riskini azaltma) ve genel olarak kanatlı etinin belirli yaşlarda ve koşullarda (örn. hamilelik ve geriatric yaşta) kaliteli bir diyetle önemli bir destek olarak kabul edilmesi gibi faktörler de vardır (Allievi et al., 2015; Marangoni et al., 2015; Mottet and Tempio, 2017; Mota de Carvalho et al., 2021).

Yem endüstrileri, kesim endüstrileri, gıda dondurma ve paketlenme endüstrileri, et muhafaza endüstrileri, kanatlı üretimi için gerekli makineler ve teknik aletler üreten endüstriler gibi kanatlı üretimi ile bağlantılı endüstrilerin gelişimi yoluyla dolaylı olarak yeni iş alanlarının açılması ile kanatlı üretimi işsizlik sorununun çözümüne katkı sağlayabilir. Kanatlı hayvan üretimi, devletin gıda güvenliği politikasına ve stratejisine katkıda bulunabilir. Piliç eti de dahil olmak üzere kanatlı eti üretim hacimlerinin sürdürülebilir büyümesi uzun yıllardır tüm dünyada gerçekleşmektedir (Wahyono and Utami, 2018).

2.1.1. Türkiye'de Kanatlı Sektörü

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından “kümes hayvanları etleri” piliç eti, ördek eti, kaz ve beç tavuğu eti, hindi eti, güvercin ve diğer kuşlar olmak üzere beş grupta sınıflandırılmaktadır. Türk kanatlı sektörü sadece piliç ve hindi eti ile ilgilenmektedir (Nezih Okur vd., 2016). Dünyadaki gelişmelere paralel olarak Türkiye'de de organik kanatlı sektöründeki gelişmeler yaşanmıştır (Eleroğlu ve Yildirim, 2014).

Türk kanatlı sektörü özellikle piliç eti ve yumurta üretiminde yıllardır hızla gelişmektedir. Bu gelişmeler sonucunda Türk kanatlı sektörü bir endüstri

olarak tanınmaktadır. Modern tesisler ve üretim yöntemleri gibi avantajlara sahip olan sektör, uluslararası standartlar ve uluslararası pazarlara yakınlığı sayesinde tüm dünya ile rekabet edebilmektedir (Nezih Okur vd., 2016).

Türkiye'de tavukçuluk sektörünün gelişmesi için ilk adım 1930 yılında Ankara'da Merkez Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nün kurulmasıyla atılmıştır. 1960'lara kadar önemli bir gelişme olmamıştır. Tavukçuluk sektörü 1970 yıllarda pahalı ve sınırlı üretim kapasitesine sahip bir aile şirketi şeklinde hareket ederken, dünya standartlarına ayak uydurmayı başarmış ve önemli gelişmeler sonucunda sürekli üretim faaliyetleri ile bugünkü şeklini almıştır. 1980'li yıllarda entegre tavukçuluk tesislerinin sayısında gözlenen artış ve sözleşmeli üretim modelinin uygulanmasıyla yapısal bir değişime uğrayarak 1990'ların sonlarına doğru yatırıma başlamıştır (Yenilmez vd., 2014).

Etlik piliç üretimi (Broyler piliç üretimi), Türkiye'de üretilen baskın piliç etidir ve toplam üretimin yüzde 99'una sahiptir. Türkiye'deki toplam etlik piliç eti üretiminin yarısından fazlası Manisa, Balıkesir, Sakarya ve Mersin'de üretilmektedir (USDA, 2019). 1990 yılında 216.759 ton olan kanatlı eti üretim düzeyi, 2000'li yıllarda önemli ölçüde artarak 2010 yılında 1,5 milyon tona, 2014 yılında ise yaklaşık 2 milyon tona ulaşmıştır. Ardından, Türkiye İstatistik Kurumu'na göre, birkaç durgun yılın ardından. Türkiye'nin etlik piliç eti üretimi 2016'dan 2017'ye toparlanarak %4'e yükselmiştir (USDA, 2017) ve 2018'de yıl ortasında dolar krizi başlaması ile ve 2022'nin ilk yarısına kadar daha da arttı. Dolar karşısında kurdaki değer kaybının yanı sıra ithalata bağlı yüksek yem fiyatları, mezbaha kapasitesinin yetersizliği, Türkiye'de son dönemde yaşanan kuraklık ve Covid-19 pandemisi ekonomik aksamalar nedeni ile kanatlı eti üretimi 2018'den bu yana verimli bir şekilde büyüyememektedir (USDA, 2021a). Türk kanatlı üreticileri, Rusya ve Orta Doğu'dan gelen artan talep sonucu küresel fiyatların artması nedeni ile şu anda ithal damızlık stokları için daha yüksek fiyatlar ile karşılaşmıştır.

2022'de Rusya ile Ukrayna arasında patlak veren savaşın ardından, buğday ithalatındaki kıtlığa ek olarak, iç piyasaya kanatlı eti arzının kapasite yetersizliğinden dolayı azalması, bazı kanatlı üreticilerinin yüksek girdi

maliyetleri nedeniyle kapasitelerini %25-30 oranında azaltması nedeni ile Türkiye’de etlik piliç fiyatı da artmıştır.

Tahminlere göre 2022 yılı sonunda piliç eti ihracatının 2021'den yüzde 10 daha fazla olan 539.000 tona ulaşması beklenmektedir. Bu kesinlikle Türkiye'de kanatlı üretimi üzerinde daha fazla baskı yaratacaktır (USDA, 2021).

2.1.2. Kanatlı sektörünün karşılaştığı zorluklar

Ticari kanatlı yetiştiricileri artan gıda talebini karşılamak ve bu hayvanlardan mümkün olan en yüksek verimi en düşük maliyetle elde etmek amacıyla bazı uygulamalar geçmişlerdir. Örneğin hayvanların hızlı gelişimi desteklenmiş ve bu şekilde birim alan başına düşen hayvan sayısını artmıştır. Kontrolsüz bir şekilde gerçekleştirilen bu uygulamalar da insan sağlığı açısından bazı **gıda güvenliği sorunlarına** yol açmıştır (Yenilmez vd., 2014)

İyileştirilmiş stokla, piliç piliçleri beş ila altı hafta içinde 2-3 kg ağırlığa ulaşabilir. Ancak bu üretim kapasitesi, **kaliteli yem bulunmasına** ve **hastalık kontrolüne** bağlıdır. Hayvanlarda, büyüme destekleyicileri olarak ve sağlıklı hayvanların büyümesini hızlandırmak için yemlere antibiyotikler kullanılmakta idi. 1999'da Aarestrup tarafından yapılan bir araştırma, antibiyotiklerin veterinerlik amacıyla uzun süreli ve yaygın kullanımının ardından bakteri türlerinin veya suşlarının direnç kazandığını göstermiştir (Aarestrup, 1999). Bu direnci kodlayan genlerin daha önce duyarlı olan diğer bakterilere de aktarılabilceği ve böylece hem hayvan hem de insan sağlığına tehdit oluşturduğu kanıtlanmıştır (Montagne et al., 2003). Sonuç olarak, bazı ülkeler antibiyotiklerin hayvanlarda büyümeyi hızlandırma amacı ile yeme eklenmesini el yasaklamış (İsveç- Ocak 1986) veya sınırlandırmıştır (Avrupa Birliği-Ocak 2000, toplam geri çekme Ocak 2006) (Montagne et al., 2003; Ohimain and Ofongo, 2012). Mevcut durumda ise Avrupa ve Amerika'da kanatlı üretiminde antibiyotikli büyüme destekleyicilerinin kullanımının bırakılması örneğin patojenik bakterilerin neden olduğu enterik enfeksiyonların kontrolünü zorlaştırmaktadır. Bu tür enfeksiyonlar, kümes hayvanlarında büyüme oranlarının düşmesine ve devamında ciddi ekonomik kayıplara neden olmuştur.

Kanatlı üretimindeki diğer zorluk yem mevcudiyetidir. Şu anda ~800 milyon ton tahıl (toplam tahıl üretiminin üçte biri) hayvan yemlerinde kullanılıyor ve 2050 yılına kadar bunun 1,1 milyar tonun üzerine çıkacağı tahmin ediliyor. Yem talebindeki artışın çoğu, halihazırda birçok gıda güvenliği sorunuyla karşı karşıya olan gelişmekte olan ülkelerde olacaktır. Hayvansal ürünlere yönelik öngörülen artan talep için gerekli olan ek yem, tahıllar yoluyla karşılanırsa, bu ülkelerdeki gıda güvensizliğini daha da kötüleştirecektir. Ayrıca, küresel olarak, yem üretimi, işlenmesi ve nakliyesi, hayvancılık sektöründen kaynaklanan sera gazı emisyonlarının %45'inden sorumludur (Makkar, 2018).

2.2. Kanatlı yemi

Türk kanatlı sektörü, kanatlı işletmelerinin ana girdi maliyeti olan (toplam harcamanın yüzde 80'i) yem için yabancı kaynaklara bağımlıdır. USDA'ya göre 2017' de Türkiye yem ihtiyacının %40'ını ithal ediyordu. Etlik piliç yemi fiyatları son iki yıldır istikrarlı bir şekilde artarken, piliç eti üretiminde durgunluk gözlenmektedir. 2020 yılında etlik piliç yem fiyatları bir önceki yılın fiyatlarından yüzde 60 daha fazlaydı. Türkiye, kanatlı eti üretimi için 2020 yılında 5,4 MMT etlik piliç yemi üretmiştir. Türkiye'de etlik piliç yemi üretimi, genel üretimdeki benzer eğilime paralel olarak 2018'den bu yana hafif bir artış göstermektedir. Öte yandan, yumurta piliçleri için yem üretimi, genel yumurta üretimi trend çizgisi ile birlikte azalmaktadır.

Kanatlı hayvan yemi için ana girdiler ithal ürünler olan mısır ve soya fasulyesidir. Türkiye soya fasulyesi, mısır ve önemli miktarda buğday yetiştirmesine rağmen kanatlı sektörünün talebini karşılamamaktadır. Kanatlı hayvan üretiminde kullanılan mısırın yaklaşık yüzde 40'ı ve soyanın yüzde 97'si ithal edilmektedir. Türkiye mısır üretiminde de kendi kendine yeterli değildir ve kuraklık üretimi de olumsuz etkilemiştir.

Yem üretimde kullanılacak mısır, soya ve balık unu ithalatına bağımlılık ve kuluçkalık yumurta ve günlük civciv gibi ithal damızlık malzemelerinin gerekliliği, Türk kanatlı sektörünü diğer ülke kanatlı işletmelerine göre daha az rekabetçi hale getirmektedir.

Bu sebeplerden dolayı yem sorunlarına çözüm bulmaya çalışmak için alışılmışın dışında çözümler aranmak zorunda kalınmıştır. Bu tezde önerilen bu çözümlerden bazıları şunlardır: 1. Yemin piliçlere verilmeden önce probiyotik organizma(lar) tarafından fermente edilmesi, 2. Pahalı geleneksel yemin, probiyotik organizma(lar) tarafından fermente edilerek kalitesi artırılabilen tarımsal-endüstriyel yan ürünün uygun bir yüzdesi ile desteklenmesi.

2.3. Yem Üretiminde Tarımsal/Tarımsal-endüstriyel yan ürünleri

Tarıma dayalı endüstriler her yıl büyük miktarda atık üretir. Bu kalıntıların uygun bertaraf prosedürü olmadan çevreye salınması çevre kirliliğine ve insan ve hayvan sağlığına zararlı etkilere neden olabilir. Tarımsal-endüstriyel atıkların çoğu arıtılmamıştır ve yeterince kullanılmamaktadır, bu nedenle genellikle yakılarak, boşaltılarak veya plansız depolama yoluyla bertaraf edilmektedir (Sadh et al., 2018).

Tarımsal faaliyetlerden elde edilen ürünler saman, gövde, sap, yaprak, kabuk, baklagiller, küspe, kullanılmış tahıllar vb. içerir (Panesar et al., 2015). Örneğin, meyve suyu endüstrileri meyve kabuğu, kahve endüstrisi atık olarak kahve posası ve tahıl endüstrileri kabuk olarak büyük miktarda atık üretir. Bu tarımsal-endüstriyel kalıntılar bileşimleri itibari ile değerlidir, bu nedenle kalite kontrol için daha fazla dikkate alınırlar ve ayrıca tarımsal-endüstriyel yan ürünler olarak kategorize edilirler (Graminha et al., 2008; Sadh et al., 2018).

Çevre ve sağlık sorunlarına neden olan tarımsal-endüstriyel yan ürünlere rağmen, kimyasal veya kimyasal olmayan yollarla daha faydalı ürünlere dönüştürülebilecek ekonomik potansiyele sahiplerdir (Oduguwa et al., 2008; Fatmawati et al., 2013; Swain, 2017; Aldayyat et al., 2021; Doğan-Sağlamtimur et al., 2021). Genel olarak, tarımsal atıklar hala hayvan tüketimi için faydalı besin bileşenleri içermektedir. Tarımsal katı atıkların hayvan yemi potansiyeli hem çevreye hem de çiftçilere sağladığı fayda nedeniyle teşvik edilmelidir (Fatmawati et al., 2018).

Çeşitli araştırmalar, üzüm kabuğu, küspe ve kabuğu, nar kabuğu, limon kabuğu ve yeşil ceviz kabuğu gibi farklı atık türlerinin doğal antimikrobiyal ve

antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceğini bildirmiştir (Delgado Adámez et al., 2012; Shen et al., 2020). Organik bileşiklerden kaynaklanan atıklar gıda maddesi olarak yenilebilir makrofungusların üretiminde, biyoenerji ve biyogübreler gibi biyo-tabanlı ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Tarımsal artıkların bir kısmı ayrıca hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Ancak bu tür atıklar, çok miktarda protein, şeker ve mineraller gibi faktörler yönünden değişkenlik gösterirler. Yüksek besinsel bileşimleri nedeniyle bu kalıntılar “atık” olarak tanımlanmaz, ancak nadiren diğer ürün oluşumu ve geliştirmeleri için hammadde olarak kabul edilir. Bu besin maddelerinin ham maddelerdeki mevcudiyeti, mikroorganizmaların büyümesi için uygun ortamlar sunar. Bu mikroorganizmalar, fermantasyon süreçleri ile hammaddeleri kullanırlar. Tarımsal-endüstriyel atıklar, farklı faydalı ürünlerin üretiminde katı hal fermantasyon denemelerinde katı destek olarak kullanılır (Sadh et al., 2018). Ayrıca gıda ürünleri bazında üretim maliyetini düşürerek fermente olabilen şekerlerin üretimine de yardımcı olur (Nguyen et al., 2010). Ayrıca, doğal hammaddeler ve endüstrinin yan ürünleri, ortam bileşenleri toplam üretim maliyetinin %38 ila 73'ünü karşılayabildiği için üretim maliyetinin düşmesine neden olur. Fermantasyon süreçlerinde kültür ortamı olarak geniş bir kullanıma sahiptir. Bu nedenle, katma değerli ürünlerin (proteinler, organik asitler, ikincil metabolitler, enzimler, oligosakkaritler, vb.) üretiminde mikrobiyal gelişim için substrat olarak tarımsal endüstriyel kalıntıların kullanımı önemli hale gelmiştir (Sánchez, 2009; Panesar et al., 2015).

Beslenme uzmanları son zamanlarda özellikle tek mideli hayvanlar için hayvan beslenmesinde tarımsal-endüstriyel atıkların araştırılmasına odaklanmıştır (Mandey et al., 2018). Tarımsal-endüstriyel yan ürünler, hayvan beslemesi için yem bileşenleri olarak büyük öneme sahiptir (AD et al., 2018).

Her ülke veya bölge, geleneksel olmayan bir yem bileşeni olarak verimliliğini incelemek için en ucuz ve en uygun tarımsal endüstriyel atığı bulur; örneğin, manyok (cassava) ve yan ürünleri Nijerya, Malezya, Tayland ve Endonezya'da incelenmiştir (Aro, 2008; Ramin et al., 2011; Khempaka et al., 2014; Sugiharto et al., 2015), Malezya'da öğütülmüş sago özü (Ab Jalil et al., 2014), Endonezya'da muz kabukları, ananas atığı, hurma çekirdeği keki ve pirinç kepeği (Yana Sukaryana, 2015; Fatmawati et al., 2018; Mandey et al., 2018),

Avustralya'daki şaraphane biyokütle atıkları (Jin et al., 2016), Nijerya'daki *Terminalia catappa* meyvesi ve *Mangifera Indica* Seed Kernels (Apata, 2011; Lawan Binta, 2018), Hindistan'da kolza (Jannathulla et al., 2019), Kore'de deniz yosununun (Choi et al., 2014) yem bileşeni olarak verimliliği incelenmiştir.

2.3.1 Yemde zeytinyağı endüstriyel yan ürünleri

Zeytin ağacı meyvesinden (*Olea europaea* L.) elde edilen zeytinyağı, Akdeniz diyetinin önemli bir parçasıdır. Birkaç çalışma, zeytinyağı tüketiminin kardiyovasküler hastalık ve kanser gibi belirli hastalıkların daha düşük riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Cárdeno et al., 2013; Scoditti et al., 2014). Zeytinyağının insan sağlığı üzerindeki bu faydalı etkilerinin çoğu, güçlü antioksidan özelliklere sahip polifenolik bileşiklerine (örneğin tirozol, hidroksitirozol, oleuropein ve pinoresinol) atfedilir (Gerasopoulos et al., 2015).

2015 yılında dünya çapında yılda yaklaşık 2×10^6 ton zeytinyağı üretilmiştir (Gerasopoulos et al., 2015) ve şimdi 2021/22 mahsul yılında yaklaşık 3×10^6 tona ulaştı (International Olive Council, 2022). Akdeniz bölgesinde zeytin ağaçları bol miktarda bulunur ve bu bölgedeki çoğu ülke çok miktarda zeytinyağı üretir ve bu da zeytin posası (ZP), zeytin küspesi (ZK), zeytin değirmeni atığı (ZDA) veya zeytin değirmeni atıksuyu (ZDAS) gibi farklı isimlerle zeytinyağı yan ürünlerinin birikmesine neden olur. ZK, küçük parçalara ezilmiş zeytin çekirdeği kabuğunu, ezilmiş küspeyi ve kabuğu içerir. ZK'nin çekirdeği yoktur. ZDA, ZP'nin başka bir genel ismidir ancak ZDAS, esas olarak yağ üretiminin çeşitli aşamaları için kullanılan sudan ve meyveden gelen sebze suyundan elde edilen ve 1000 kg zeytin başına 0,5-3,25 m³ miktarındaki sıvı bir atıktır (Kapellakis et al., 2012). ZDAS, koyu kahverengi bir renge ve yüksek organik içeriğe sahiptir. Bu nedenle, aerobik arıtma, anaerobik çürütme ve kompostlaştırma gibi herhangi bir arıtma olmaksızın kanalizasyon sistemine büyük miktarlarda atılması mümkün değildir (Gerasopoulos et al., 2015).

Mısır'da, zeytin ağaçları bulunan yaklaşık 118.382 dönüm ve 96.810 dönüm verimli alan, 3.25 ton/akr'ı temsil eden yaklaşık 314.450 ton zeytin üretilmektedir. Temel olarak 100 kg zeytinden yaklaşık 35 kg ham ZP elde edilmiştir (Fadel and El-Ghonemy, 2015).

Endülüs bölgesinde (İspanya) zeytinyağı sezonunda yılda bir ila 2,5 milyon ton üretim yapılmıştır. Yunanistan, İspanya ve İtalya'dan sonra dünyanın en yüksek zeytinyağı üreten üçüncü ülkesidir. Yılda $3-4 \times 10^5$ ton zeytinyağı üretilmektedir (Valta et al., 2015). Yunanistan'da yaklaşık 3500 zeytin değirmeni faaliyet göstermektedir ve 1000 kg taze zeytinden 214 kg zeytinyağı, 496 kg ham zeytin küspesi, 40 kg yaprak ve 1633 kg zeytin değirmeni atık suyu (ZDAS) üretilmektedir (Christodoulou et al., 2007)

Türkiye'de Ege bölgesi, dünyanın zeytin ve zeytinyağı üretimine önemli bir katkı yapmaktadır (Gökçebağ vd., 2013; Büyükgök ve Saygin Gümüşkesen, 2017) . Sonuç olarak, her yıl yan ürün olarak büyük miktarlarda zeytin posası (ZP) elde edilmektedir (El Hachemi et al., 2007). Türkiye'de yılda yaklaşık 200–250 bin ton ZP üretilmektedir (Guneser vd., 2017).

ZK, tohum parçaları içermediğinden ZDA'dan farklıdır. Yaklaşık %18-25 gibi iyi bir yağ yüzdesi ve yüksek düzeyde esansiyel yağ asitleri (%73 oleik asit, %13 palmitik asit ve %7 linoleik asit) ile karakterize edilir (Chiofalo et al., 2004). Kanatlılar için %8-12.8 oranında yeterli protein içeriğine sahiptir ve arginin ve glisin bakımından zengindir (Zarei et al., 2011). ZK aynı zamanda makul seviyelerde manganez ve çinko ile iyi bir kalsiyum, bakır ve kobalt kaynağı olarak kabul edilir, bu da onu kanatlı besleme için ekonomik bir bileşen alternatifi yapar (Al-harhi et al., 2009) ve kısmi bir bileşen olarak kullanılabilir (AD et al., 2018).

Gerçekten de ZDA, en az iki nedenden dolayı piliç beslenmesi için elverişli olabilir. Bir yandan, artık yağ seviyesi (%6,8) tamamlayıcı bir enerji kaynağı oluşturabilir. İkincisi, doymamış yağ asitlerinin bileşimi (%62,4 oleik asit, %18,2 linoleik asit, %1,1 linolenik asit ve %2,7 palmitoleik asit) hayvanın yaşamı boyunca çeşitli vücut bölümlerinde yağ asitlerinin birikimini etkileyebilir ve bu nedenle etin kalitesi üzerinde belirli bir etkiye sahip olabilir (El Hachemi et al., 2007).

Zeytin yan ürünlerinin hayvan yemi olarak kullanılması, onları geri dönüştürmenin iyi bir yoludur. Bununla birlikte, büyük oranda hücre duvarı bileşenleri içerir, bu da onu tatsız ve geviş getiren hayvanlar için zayıf sindirilebilir hale getirir. Bu nedenle, farklı kimyasal ajanlar aracılığıyla zeytin yan ürünlerinin besleyici değerini iyileştirmeye yönelik girişimlerde

bulunulmuştur, ancak sonuçlar az çok tatmin edici olmuştur (Rowghani et al., Seradj, 2008). Kimyasalların yanı sıra biyolojik arıtma, daha fazla substrat ve reaksiyon özgülüğü, daha düşük enerji gereksinimleri, daha düşük kirlilik üretimi ve daha yüksek istenen ürün verimi gibi kimyasal/fiziksel işlemlere göre potansiyel avantajları nedeniyle çok dikkat çekmektedir (Fadel and El-Ghonemy, 2015).

2.4. Probiyotikler

2.4.1. Probiyotiklerin tanımı

Probiyotikler, “insan veya hayvanlara uygulandığında, sahip oldukları özelliklerini geliştirerek konakçıyı faydalı bir şekilde etkileyen canlı mikroorganizmaların tek veya karışık kültürü” olarak tanımlanmıştır. Crawford probiyotikleri “hem yararlı hem de patojenik organizmaların bağırsak popülasyonlarının etkili bir şekilde birlikteliğini sağlamak için hayvana implante edilen spesifik canlı mikroorganizmaların (öncelikle *Lactobacillus* spp.) kültürü” olarak tanımlamıştır. Fuller daha sonra probiyotiklerin bir tanımını "konakçı hayvanın bağırsak mikrobiyal dengesini geliştirerek faydalı bir şekilde etkileyen canlı bir mikrobiyal yem takviyesi" olarak yapmıştır. ABD Ulusal Gıda Maddeleri Birliği (The US National Food Ingredient Association), probiyotik (direkt mikrobiyal besini), doğal olarak oluşan mikroorganizmaların kaynağı olarak sunmuştur ve buna bakteri, filamentli fungus ve maya dahildir). FAO/WHO tarafından şu anda benimsenen tanıma göre, probiyotikler: "yeterli miktarlarda uygulandığında konakçıya sağlık açısından yarar sağlayan canlı mikroorganizmalardır" (FAO/WHO, 2001). Dahası, probiyotikler, sindirim yoluyla uygulandığında konağın sağlığı için elverişli olan, kesinlikle patojenik olmayan ve doğası gereği toksik olmayan canlı mikroorganizmalardır (Kabir, 2009).

2.4.2. Probiyotik Organizmaların özellikleri

Probiyotik mikroorganizmaların insan sağlığına olumlu etkileri arasında laktoz intoleransının hafifletilmesi; viral, bakteriyel ve antibiyotik veya

radoterapinin neden olduğu ishallerin önlenmesi ve tedavisi; immünomodülasyon; antimitojenik ve antikanserojenik etkiler; ve hatta kan kolesterolünün düşürülmesi yer almaktadır (Wright, 2005).

Ayrıca, probiyotik kullanımı, bağırsak mikrobiyotası üzerine olumlu etkisi de gösterilmiştir. Bununla ilgili iki ana etki mekanizması öne sürülmüştür: (a) toksik maddeler üreten metabolik reaksiyonların azaltılması, var olan enzimlerin uyarılması ile vitamin ve antimikrobiyal maddelerin üretimi ile karakterize edilen beslenme etkisi; ve (b) kolonizasyon direncinde bir artış ile mukozal bağışıklık sistemi üzerindeki olumlu etkileri; "bağırsak mikrobiyotasının biyo-düzenleyicileri" olarak işlev görmesi ve konakçının doğal savunmasını güçlendirmesidir. Bu nedenle probiyotikler hem bağırsak bariyerini güçlendirerek hem de doğrudan bağışıklık sistemini uyararak (Anadón et al., 2006), akut ve antibiyotik ilişkili ishal ve kanser gibi hastalıkların önlenmesi yoluyla patojenik ajanlara karşı direnci artıran bağırsak mikrobiyota dengesinde bir role sahip olacaktır. Probiyotik gıdalar için 2009'dan 2014'e kadar ekonomik olarak %10'dan fazla tahmini bir büyüme olduğu yansıttığı gibi, yaygın bir kabul ve popülerlik kazanmıştır. Sağlığı iyileştirmek için doğal (ilaç dışı) yaklaşımlara yönelik artan tüketici talebi nedeniyle, probiyotik bakteriler, özellikle probiyotik içeren yoğurt, peynir, süt ve dondurma gibi süt ürünleri çok sayıda gıda ürününe dahil edilmiştir (Wong et al., 2015).

2.4.3. Kanatlı bağırsak mikrobiotası

Çoğu araştırmacı, normal, sağlıklı, stresli olmayan kümes hayvanları için bağırsaktaki yararlı ve zararlı bakterilerin kararsız bir dengesi olduğuna inanmaktadır. Bir denge olduğunda, piliç maksimum verimine ulaşır, ancak stres uygulanırsa, faydalı mikrobiyota, özellikle laktobasiller, sayıca azalma eğilimi gösterir ve faydalı olmayanların aşırı çoğalması meydana gelir. Bu oluşum, açık hastalığa, yani ishale yatkın hale getirebilir veya subklinik olabilir ve büyüme, yem verimliliği vb. üretim parametrelerini azaltabilir. Bağırsakta koruyucu biota çok stabildir, ancak bazı diyet ve çevresel faktörlerden etkilenebilir. Bunlardan en önemlileri aşırı hijyen, antibiyotik tedavisi ve strestir. Vahşi doğada piliç, annesinin dışkısından tam bir bağırsak biotası alır ve sonuç olarak enfeksiyona

karşı korunur. Bununla birlikte, ticari olarak yetiştirilen piliçler, temiz olan ve genellikle piliç bağırsağında yaygın olarak bulunan organizmaları içermeyen kuluçka makinelerinde yumurtadan çıkar. Fakat bağırsak mikrobiota özelliklerini etkileyebilecek kabuk kaynaklı mikrobiyolojik kontaminasyonunun bir etkisi vardır. Ayrıca inkübasyonun 18. gününde başlayan HCl gastrik sekresyonu da mikrobiota seçimini derinden etkiler. Bu nedenle, doğumda probiyotik takviyesinin hemen kullanılması, piliç türlerinde diğer hayvanlara göre daha önemli ve faydalıdır. Piliç, annesiyle veya diğer yetişkinlerle teması olmayan ve bu nedenle koruyucu bağırsak mikrobiyotasını yenilemek için tasarlanmış mikrobiyal takviyelerlerden faydalanması muhtemel olan genç bir hayvanın ekstrem bir örneğidir (Kabir, 2009).

2.4.4. Probiyotiklerin hayvanlara etki mekanizmaları

Kolonizasyon direncinin artırılması ve/veya patojenlere karşı doğrudan inhibitör etkileri ile probiyotikler hastalıkların insidansını ve süresini azalttığı belirtilmektedir. Probiyotik suşların patojenik bakterileri hem in vitro hem de in vivo olarak birkaç farklı mekanizma yoluyla inhibe ettiği gösterilmiştir (Kabir, 2009).

Kümes hayvanlarında probiyotiklerin etki şekli şunları içerir: (i) rekabetçi dışlama ve antagonizma yoluyla normal bağırsak mikrobiyotasının korunması; (ii) sindirim enzimi aktivitesini artırarak ve bakteriyel enzim aktivitesini ve amonyak üretimini azaltarak metabolizmayı değiştirmek; (iii) yem alımını ve sindirimi iyileştirmek ve (iv) bağışıklık sisteminin uyarılması. Kanatlı hayvanlarda endemik ve zoonotik ajanları kontrol etmek için bir yöntem olarak probiyotik ve rekabetçi dışlama yaklaşımları kullanılmıştır. Geleneksel terimlerle, kümes hayvanlarında rekabetçi dışlama, kuluçkahaneye yerleştirilmeye hazır civcivlerde ve kümes hayvanlarında doğal olarak oluşan bağırsak mikroorganizmalarının kullanılması anlamına gelmektedir (Ezema, 2013).

Tüketim üzerine probiyotikler, birçok laktik asit bakterisini gastrointestinal sisteme iletir. Bu mikroorganizmaların bağırsak ortamını değiştirdiği ve enzimleri ve diğer faydalı maddeleri bağırsaklara ilettiği bilinmektedir. Piliçlere *L. acidophilus* veya *Lactobacillus* kültürlerinin bir

karışımının eklenmesi, 40 günlük beslenmeden sonra amilaz seviyelerini önemli ölçüde arttırmıştır. Bağırsakta kolonize olan laktobasiller enzimi salgılayarak bağırsak amilaz aktivitesini artırabildiği belirtmektedir. Probiyotiklerin, bağırsak enzimlerinin artan aktivitesini ve besinlerin sindirilebilirliğini desteklemek için gastrointestinal pH ve biotayı değiştirdiği iyi bilinmektedir. Ayrıca, *Aspergillus oryzae*'nin yumurta piliçlerinde makro besin metabolizması üzerindeki etkisi gözlenmiştir. *Aspergillus oryzae*'de bulunan aktif amilolitik ve proteolitik enzimlerin sindirilmiş besinleri etkileyebileceğini düşünülmektedir. Benzer şekilde kuru maddenin sindirilebilirliğindeki artışın maya tarafından salınan enzimlerle yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca probiyotikler, bağırsaklardaki amonyak üretimini azaltarak piliçlerin durumlarının iyileştirilmesine katkıda bulunabilir (Kabir, 2009).

Probiyotiklerin uygulanması yoluyla bağırsak mikrobiyotasının manipülasyonu, bağışıklık tepkisinin gelişimini etkiler. Probiyotiklerin immünomodülatör mekanizmaları arasında; substratlar ve bağırsak adezyon bölgeleri için patojenlerle rekabet, şekerlerin inhibe edici özelliklere sahip fermentasyon ürünlerine biyolojik olarak dönüştürülmesi, konakçı için vitaminler gibi büyüme substratlarının üretimi, antimikrobiyal peptit üretimi yoluyla patojenlerin doğrudan antagonizmi, iltihabın azaltılması ve bağışıklık hücrelerinin uyarılması gibi biyodönüşümü yer almaktadır. Ayrıca probiyotikler, sitokinleri üretmek için bağışıklık sistemi hücrelerinin farklı alt kümelerini uyarır ve bu da bağışıklık tepkisinin indüklenmesinde ve düzenlenmesinde rol oynar. Probiyotikler, özellikle laktobasiller, piliçlerde antijenlere karşı sistemik antikor yanıtını modüle edebilir (Kabir, 2009).

Probiyotiklerin önerilen birkaç eylem modu vardır. Bu mekanizmaların bazıları enterik patojenik mikroorganizmaların inhibisyonu ile bağlantılıyken, diğerleri hayvan performansının artmasından sorumludur. Farklı probiyotikler benzer etki modlarına sahip olabilirken, belirli bir suş birden fazla mekanizma yoluyla işlev görebilir. Örneğin, birkaç probiyotik suş, mide-bağırsak mikrobiyal popülasyonu üzerinde benzer etkilere sahiptir. Bununla birlikte, spesifik probiyotiklerin etki biçimleri genellikle anlaşılmamıştır. Probiyotiklerin performans üzerindeki etkileriyle ilgili çalışmaların çoğunda probiyotiklerin tam etki şekli tam olarak anlaşılamamıştır. Yakından ilişkili probiyotik

mikroorganizmalar farklı etki biçimlerine sahip gibi görüldüğünden, mekanizmaların duruma göre incelenmesi gerekir. Probiyotiklerin etkileri, konakçı ve probiyotik mikroorganizma arasındaki etkileşimin sonucudur. Bu nedenle, konakçı-mikrop etkileşimi üzerine daha fazla çalışma, probiyotik etki modunu aydınlatılabilir. Mikrobiyal ekolojiyi incelemek için kullanılan moleküler yöntemler ve DNA dizinlemesindeki hızlı gelişmeler, probiyotiklerin çalışma şeklini anlamamızı büyük ölçüde kolaylaştıracaktır (Yadav et al., 2016).

2.4.4.1. Gastrointestinal Sistem Mikrobiotasının Değişmesi: Uygun Gastrointestinal Sistem Mikrobiotasının Teşvik Edilmesi

Probiyotikler, yararlı ve zararlı mikroorganizmaların dengesindeki bir kayma nedeniyle nihayetinde daha uygun bir mikrobiyal popülasyon oluşturarak gastrointestinal trakt GIT'deki mikrobiyal popülasyon dinamiklerini değiştirebilir (Mountzouris et al., 2007). GIT'deki sağlıklı mikrobiyal popülasyonlar, genellikle daha verimli sindirim ve gelişmiş bağışıklığı yansıtan gelişmiş hayvan performansı ile ilişkilendirilir (Niba et al., 2009; Hung et al., 2012). GIT'deki patojenik mikroorganizmalardaki azalma, antimikrobiyal maddelerin üretimine (Shim et al., 2012) ve probiyotik mikropların bağırsak epiteline yapışmasına, dolayısıyla patojenleri rekabetçi bir şekilde dışlamasına veya bağışıklık sistemi tepkisini indüklemeye bağlanabilir.

2.4.4.2. Antimikrobiyal maddelerin üretimi

Bazı probiyotikler, bağırsakta patojenik mikroorganizmaların büyümesini engelleyebilecek antimikrobiyal maddeler üretir. Laktik asit bakterileri (LAB) (Flynn et al., 2002), bifidobakteriler (Cheikhyoussef et al., 2008) ve basil (Le Marrec et al., 2000) dahil olmak üzere birçok bakteri türü, çeşitli termostabil bakteriyosinler (Cotter Hill and Ross, 2005) üretebilir. Bu tip bakteriyosinler *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Listeria* ve *Salmonella* türleri de dahil olmak üzere bir dizi potansiyel hayvan patojenine karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Rea et al., 2007).

LAB tarafından üretilen bakteriyosin (örneğin Nisin), bakteri yüzeyinde por oluşumu ile hücre duvarı sentezini engelleyerek patojenik

mikroorganizmaların büyümesini engeller (Wiedemann et al., 2001; Hassan et al., 2012). Bunu başarmak için bakteriyosin, hücre duvarı öncüsü olan lipid II'yi bağlayarak bakteri hücre zarında bakterinin ölümüne yol açan bir por oluşturabilen bir kompleks oluşturur (Bierbaum and Sahl, 2009).

Birçok probiyotik bakteri, özellikle kısa zincirli yağ asidi üreten laktik asid bakterileri, özellikle laktik ve asetik asitler, patojenik bakterileri inhibe edebilir (Commane et al., 2005; Fayol-Messaoudi et al., 2005). Kısa zincirli yağ asidi üreten laktik asid bakterileri, bağırsak lümeni içindeki mikro ortamlardaki pH'ı düşürür ve daha sonra etlik piliçlerde GIT mikroorganizmaları tarafından alınabilir ve hücre içi pH'larını bazı bakteriler için öldürücü bir düzeye düşürür (Daskiran et al., 2012).

2.4.4.3. Patojenik mikroorganizmaların gen ekspresyonunda değişiklik

Bakteriler, bakterilerin davranışını etkileyen oto-indükleyiciler olarak adlandırılan kimyasal sinyallerin salgılanması yoluyla hücreler arası iletişim kurar (Miller and Bassler, 2001; Waters and Bassler, 2005). Çoğunluk algılanması (Quorum Sensing) olarak adlandırılan bu bakteriyel iletişim süreci, bakteriler ve konakçıları arasındaki iletişim için de kullanılır (Hughes and Sperandio, 2008). Probiyotikler, patojenik bakterilerde quorum sensing mekanizmasını etkileyerek patojenitelerini etkileyebilir. İnsan enterohemorajik *E. coli* serotipi O157:H7 tarafından üretilen bir kimyasal sinyalin (otoindükleyici-2) *L. acidophilus* La-5' tarafından üretilen fermentasyon ürünleri tarafından büyük ölçüde inhibe edilmesine ve virülans geninin (enterosit yok etme lokusu) baskılanmasıyla sonuçlandı) in vitro ekspresyonunun baskılanmasına neden olmuştur. Bu, çoğunluk algılanmasını bozar ve sonunda GIT'de *E. coli* serotipi O157:H7 tarafından GIT kolonizasyonunu önler (Medellin-Peña et al., 2007).

2.4.4.4. İmmünomodülasyon

Konağı GIT lümeninde bulunan farklı tipteki antijenlerden koruyan bağışıklık sisteminin GIT bileşeni probiyotiklerden etkilenir. Hem doğal hem de adaptif bağışıklık probiyotiklerden etkilenir.

Mide-bağırsak mukozasındaki epitel hücreleri, bağırsak lümeni (yabancı antijenler, mikroorganizmalar ve toksik maddeler gibi zararlı maddelerin yanı sıra faydalı besinler içeren) ile vücudun iç ortamı arasında seçici geçirgen bir bariyer oluşturur (Groschwitz and Hogan, 2009). Bu bariyer, GIT'deki mikroorganizmalara karşı ilk savunma hattıdır (Peterson and Artis, 2014). Bu bariyeri anatomik yapılar, mukustan oluşan immünolojik salgıları, Ig A gibi immünoglobulinleri, antimikrobiyal peptitler ve epitelyal bağlantı adezyon kompleksi oluşturur. İmmünolojik dengeyi bozan hastalık koşulları bu bariyeri bozar, bağırsak duvarının inflamasyonuna ve bağırsak bozukluklarına neden olur (Yadav et al., 2016).

Probiyotik formülasyonlar, mide-bağırsak epitelinde doğuştan gelen bağışıklığın uyarılması yoluyla GIT'in kronik inflamasyonunu önler. Hayvan modellerinde yapılan deneyler, probiyotikler tarafından bağırsak bariyer fonksiyonundaki iyileşmenin, bağırsak epitelinin geçirgenliğindeki bir azalmadan kaynaklandığını göstermiştir. Genel olarak, probiyotik tedavisinin zamanlaması, bağırsak bariyer fonksiyonunun korunmasında çok önemlidir. Enfeksiyöz veya patojenik ajan deneysel olarak tanıtılmadan önce veya patojenler GIT'e girip doğal olarak çoğalmadan önce probiyotiklerin verilmesi, probiyotik girişi için en etkili zamandır (Yadav et al., 2016).

2.4.4.5. Kolonizasyon Direnci

Doğal olarak yetiştirilen yenidoğan hayvanların ve kuşların GIT'leri, genellikle yetiştikten (anneden) kaynaklanan mikroorganizmalar tarafından kolonize edilir. Bu mikroorganizmalar enterik patojenlere karşı koruma sağlar. Hayvan tarımının yoğunlaştırılması, GIT'in doğal kolonizasyonu fırsatını azaltarak hayvanları bağırsak patojeni tehdidinde daha duyarlı hale getirmiştir. Probiyotikler, yenidoğanlarda doğal kolonizasyonu taklit edebilir veya yetişkin hayvanları kolonize ederek patojenik organizmaların bağırsak mukozasını kolonize etmesini önleyebilir. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium*'un belirli suşları, bakterilerin hayvan hücresi yüzeyine spesifik olmayan bir şekilde yapışmasına yardımcı olan hidrofobik yüzey tabakası proteinlerine sahiptir. Probiyotik bakterilerin bağırsak epiteline bu şekilde yapışması, reseptör bağlanma bölgelerini

kaplayarak, *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, vb. gibi patojenik mikroorganizmaların epitele bağlanmasını önler (Yadav et al., 2016; Simon et al., 2017).

2.4.5. Hayvan yemlerinde probiyotikler

Son yıllarda probiyotikler, kümes hayvanları endüstrisinde diyet takviyeleri ve yem katkı maddeleri dünyasında antibiyotiklerin yerini alarak daha popüler hale geldi. Her şeyden önce probiyotikler, gelişmiş performans ve sağlığı desteklemek için diğer katkı maddeleriyle birlikte kullanılabilen evrensel yem katkı maddeleridir. Olumlu etkileri doğrudan gastrointestinal sistemde ve dolaylı olarak kanatlı bağışıklık sisteminin immünomodülasyonunda gözlemlenebilir. Probiyotik verilen sürülerde görülen beslenme etkileri, artan yumurtlama ve yumurta kalitesini, çoğalmaya olumlu etkisi ve iyileştirilmiş yem dönüşüm oranını içerir. Ayrıca et kalitesinde de bir iyileşme olmuştur. Bu, üreticilerin probiyotik kullanımı yoluyla üretim sonuçlarını iyileştirebileceğini göstermektedir. Bu üretim etkilerine ek olarak, organizmanın kendisini patojenlere ve strese karşı daha iyi korumasına izin vererek bağışıklığını da geliştirilir (Krysiak et al., 2021).

Bakteriler, funguslardan daha yaygın olarak probiyotik olarak rapor edilmiştir. Çoğunlukla *Lactobacillus* cinsinin laktik asit bakterileri (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. farciminis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*), (Lee et al., 2007; Yegani and Korver, 2008; Higgins et al., 2008; Haghighi et al., 2008; Sato et al., 2009; Taheri et al., 2009; Lee et al., 2010) ve *Bifidobacteria* (Patterson and Burkholder, 2003; Willis et al., 2010) üyeleri çalışılmıştır. Kümes hayvanları ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda daha az olmakla birlikte *Bacillus* (*B. cereus* var. *toyoi*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*), *Enterococcus* (*E. faecium*), *Streptococcus* (*S. infantarius*), *Lactococcus*, *Pediococcus* (*P. acidilactici*) genusu üyeleri bulunmaktadır (Anadón et al., 2006; Ohimain and Ofongo, 2012). Yine bazı çalışmalarda test edilen bazı probiyotikler mikroskobik veya makroskopik funguslardır. Örneğin, Willis et al. (2008) piliç tavuğu için probiyotik olarak yenilebilir shiitake fungusları, *Lentinula edodes* kullanılmıştır. Ogbe et al. (2009), *Eimeria tenella* ile enfekte piliçlerin tedavisi için yabani bir fungus olan *Ganoderma lucidum* kullanmıştır (Ogbe et al., 2009). Woo et al. (2006) piliçlerde patojenik bakteriyel enfeksiyonların kontrolü için *Saccharomyces cerevisiae*

mayasını ve *A. oryzae* fungusunu kullanmıştır (Lee et al., 2006). Benzer şekilde, Lee et al. (2007), *Eimeria* ile enfekte piliçlerin tedavisi için probiyotik maya *S. boulardii*' yi kullanmıştır (Lee et al., 2007). Mikrobiyal probiyotikler, hayvanlara yaygın olarak ya yem ya da içme suyu yoluyla ağızdan verilir (Ohimain and Ofongo, 2012).

2.4.5.1. Yem katkı maddesi olarak probiyotikler

Yem maddeleri ve premiksler dışında, hayvan yemlerine eklendiği zaman yem veya hayvansal ürünlerin kalitesini artıran, hayvansal üretimi ve hayvanların refah düzeyini yükselten, sindirimi ve sindirim sistemi mikrobiyotasını iyileştiren, yemde besin maddeleri miktarını arttıran, besin maddelerinin ve yemin korunmasına katkıda bulunan, hayvansal üretimin çevreye zararını azaltan ürünler ve mikroorganizmalar yem katkı maddesi olarak bilinmektedir (Krysiak et al., 2021).

Hayvanların beslenmesinde; yemlere eklendiklerinde hayvanlara herhangi bir bozulma olmadan ulaşması, hayvanlar tarafından sindiriminin kolay olması ve hayvan bağırsaklarında emilip vücuda taşınmasında etkili olan, yemden yararlanma oranını iyileştirip, kaliteyi olumlu etkileyen ve ekonomik açıdan fayda sağlayan maddeler “yem katkı maddeleri” olarak ifade edilmektedir. Özellikle antibiyotiklerin yasaklanmasından sonra alternatif yem katkısı olarak probiyotik ve prebiyotikler önem kazanmaya başlamıştır (Ohimain and Ofongo, 2012; Atilgan and Çiçek, 2021).

Yem katkı maddeleri 1-Yem teknolojisiyle ilgili katkı maddeleri, 2-Duyusal yem katkı maddeleri, 3- Besin madde niteliğindeki yem katkı maddeleri, 4- Zooteknik Yem Katkı Maddeleri, 5- Antikoksidiyaller ve Histomonostatlar olarak sınıflandırılmaktadır. Genel olarak antibiyotiklerin yerine kullanılan doğal büyümeyi artırıcı yem katkı maddeleri ile hayvanın fizyolojik fonksiyonlarını ve refahını iyileştirici katkılar, sindirim artırıcılar, bağırsak mikrobiyota düzenleyicileri, çevreyi olumlu etkileyen yem katkı maddeleri, diğer zooteknik katkı maddeleri “Zooteknik Yem Katkı Maddeleri” sınıfına girmektedir. Bu şekilde enzimler, probiyotikler, prebiyotikler, organik asitler, bitki ekstraktları (Fitobiyotikler) ve esansiyel yağlar, immun modülatörler, zorunlu tüy dökümü

sağlayan preparatlar ve gübrede sinek mücadelesinde kullanılan preparatlar “Zooteknik Yem Katkı Maddeleri” olarak ifade edilmektedir (Mota de Carvalho et al., 2021).

Probiyotikler bağırsak mikrobiyotasını değiştirerek konakçı hayvanda yararlı etkiler oluşturan tek veya karışık canlı mikroorganizma (bakteri, maya veya filamentli fungus) kültürleridir. Toz, granül, sıvı, kapsül ve pelet formunda olup içme suyuna veya rasyona karıştırılarak kullanılabilirler. Bu mikroorganizmaların kültürleri karma yemlere ve silaj materyali içine karıştırılarak kullanılmaktadır (Krysiak et al., 2021).

Ülkemizde “Yem Katkı Maddelerinin Değerlendirme ve Onay İşlemleri İçin Başvuru Dosyasının Hazırlanması ve Sunulması Hakkında Tebliğ (Tebliğ No: 2016/15) mevcuttur (Resmi gazete, 2022). Bu Yönetmelik; insan sağlığının, hayvan sağlığı ve refahının, çevrenin, kullanıcı ve tüketicilerin yem katkı maddeleri ile ilgili çıkarlarının en üst düzeyde korunmasını sağlamak için, piyasaya sürülecek ve kullanılacak olan yem katkı maddelerinin onaylanmasına ilişkin usul ve esaslar ile yem katkı maddeleri ve premikslerin denetimi ve etiketlenmesine dair kuralları belirlemek amacıyla hazırlanmıştır.

2.4.2. Hayvancılıkta Probiyotik Olarak Filamentli Fungusların Kullanımı

Filamentli fungusların gıda işlemede önemli roller oynadığı uzun zamandır bilinmektedir. Etlik piliç üretiminde, filamentli funguslar hakkında sadece hastalık oluşumuna, yem kontaminasyonuna ve mikotoksin üretimine neden olup bu koşullar sonucunda büyük ekonomik kayıplara neden olduklarından bahsedilmiştir. Bununla ilgili birkaç filamentli fungus türü, hastalık etkeni ve yem kirleticileri olarak tanımlanmıştır (Dhama et al., 2011a; Ghaemmaghami et al., 2016). Bu nedenle, kanatlıların sağlığının yanı sıra yemin kalitesi ve lezzetini sağlamak için fungus dekontaminasyon programı yürütülmektedir (Sugiharto, 2019).

Zararlı etkilerinin yanı sıra, son çalışmalar bazı filamentli fungusların probiyotik olarak potansiyelini göstermiştir (Saleh, 2011; Sugiharto et al., 2017). Bu özellik, antibiyotik sonrası dönemde piliçlerin büyüme performansını ve

sağlığını iyileştirmede faydalıdır. Fermantasyon başlatıcıları olarak filamentli fungusların potansiyeli de belgelenmiştir (Lateef et al., 2008). Fungus fermantasyonu, piliç civcivleri için özellikle geleneksel olmayan yem bileşenlerinin besinsel niteliklerini iyileştirmenin etkili bir yolu gibi görünmektedir. Bu bağlamda, fungus fermantasyonu, piliç rasyonlarında pahalı geleneksel yem katkı maddelerinin kullanımını azaltmaya yardımcı olabilir (Sugiharto, 2019).

Günümüzde etlik piliç üretiminde sentetik antioksidanlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, sentetik antioksidanların aşırı kullanımı, tüketiciler olarak insanlar üzerinde kanserojen etki anlamına gelebilir (Fellenberg ve Speisky, 2006). Çeşitli çalışmalar, filamentli fungusların antioksidan kaynaklar olarak potansiyelini doğrulamıştır (Sugiharto et al., 2015; Sugiharto et al., 2016; Sugiharto et al., 2017) ve bu, etlik piliç üretiminde sentetik antioksidanların kullanımıyla ilgili endişelere cevap verebilir. Civcivlerin sahip oldukları sindirilebilirliği artırmak için etlik piliç üretiminde eksojen enzimlerin kullanımı yaygın olarak uygulanmaktadır. Günümüzde ticari enzimlerin neredeyse yarısı fermantasyon yoluyla filamentli funguslar tarafından üretilmektedir (Smith et al., 2015).

Etlik piliç üretiminde probiyotik olarak birçok filamentli fungus kullanılmıştır. Saleh et al. (2011a), *Aspergillus awamori* temelli probiyotiklerin büyüme performansını iyileştirdiğini, kas E vitamini içeriğini arttırdığını, iskelet kası yağ asidi profilini değiştirdiğini ve etlik piliçlerin kaslarında lipid peroksidasyonunu azalttığını bildirmiştir. Büyümeyi teşvik edici etkiye ek olarak, Saleh et al. (2011b), *A. awamori*'nin etlik piliçlerin kas protein yıkımını, karın yağ içeriğini ve plazma kolesterolünü hafifletme kabiliyetini göstermiştir. Karşılık gelen sonuçlar Yamamoto et al. (2007) tarafından da doğrulandı *A. awamori*'yi etlik piliçler için probiyotik olarak kullanırken, *A. awamori*'nin etlik piliçlerin büyüme performansını, besin sindirilebilirliğini ve karkas ağırlığını iyileştirdiğini bulmuşlardır. Bir diğer probiyotik özellikler gösteren filamentli fungus, *Aspergillus niger*'dir. Saleh et al. (2011b), *A. niger*'in probiyotik olarak kullanılmasının etlik civcivlerde büyüme performansını iyileştirdiğini ortaya koymuştur. İşlem ayrıca piliçlerin kas yağındaki doymuş yağ asitlerini azaltmış ve doymamış yağ asitlerini artırmıştır. Bununla uyumlu olarak, Saleh et al. (2010), *A.*

niger'in büyüme performansını iyileştirme, kas protein yıkımını, karın yağ içeriğini ve plazmadaki kolesterol içeriğini azaltma potansiyelini göstermiştir.

Diğer araştırmacılar ayrıca *A. niger*'in bir antioksidatif aktivitesini saptamışlar ve beslenmeye bu türün ilavesinin piliçlerin kasındaki α -tokoferol içeriğinin arttığını ve tiyobarbitürik asit reaktif madde konsantrasyonlarının azaldığını ve karaciğerde glutamik-oksalasetik transaminaz aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir. *A. oryzae*, kümes hayvanlarında probiyotik olarak yaygın olarak kullanılan başka bir filamentli fungusdur. Lee et al. (2006), bu fungusun uygulanmasının piliçlerin büyüme performansını, besin sindirilebilirliğini ve bağırsak sağlığını iyileştirebildiğini belgelemiştir. Probiyotik özelliklere sahip filamentli fungusun bir başka örneği de *Chrysonilia crassa*'dır. Etlik piliçlerde *C. crassa* ile besleme, ısı stresine maruz kalan piliçlerin fizyolojik koşullarının ve antioksidan durumunun iyileştirilmesinde faydalı olmuştur (Sugiharto et al., 2017). Daha sonraki çalışmada, *C. crassa* ile diyet takviyesi, piliçlerin büyümesini, bağışıklık tepkilerini ve bağırsak bakteri popülasyonlarını iyileştirmiştir (Sugiharto et al., 2018). *Acremonium charticola*, probiyotik potansiyeli olduğu test edilmiş başka bir filamentli fungusdur (Sugiharto et al., 2015). Bu tür fungusların beslenmeye dahil edilmesinin, bağırsak mikrobiyal dengesini iyileştirdiği ve etlik piliçleri enfeksiyonlardan koruduğu bildirilmiştir (Sugiharto et al., 2018). *Scytalidium acidophilum*, etlik piliçlerde büyüme performansını iyileştirmek için probiyotik olarak kullanılan başka bir filamentli fungusdur (Huang et al., 2004). Benzer şekilde, *R. oligosporus*'un probiyotik potansiyel gösterdiği doğrulanmıştır. Domuzlarda, *R. oligosporus* ile tedavi, daha yüksek vücut ağırlığı artışı, iyileştirilmiş besin sindirilebilirliği, bağırsak bakteri popülasyonu ve bağışıklık savunması ile sonuçlanmıştır (Park et al., 2016). Ancak etlik piliçlerle ilgili veriler yetersizdir.

Genel olarak bazı özellikler, filamentli fungus temelli probiyotiklerin piliç yemlerinde antibiyotikler yerine kullanılmasını uygun hale getirir. Bu özellikler, antimikrobiyal aktivite, bağırsak mikrobiyota modülasyon kapasitesi, sindirim uyarıcı aktivite, büyümeyi teşvik edici aktivite ve kolesterol düşürme kapasitesini içerir (Lee et al., 2006). Bağırsaktaki patojen mikroorganizmaların kontrolünde Sugiharto et al. (2015), filamentli fungusların, patojenik mikropların biyolojik işlevlerini bozabilecek çeşitli antimikrobiyal formları üretebileceğini öne sürdü.

Sindirim uyarımı açısından Lee et al. (2006), filamentli fungusların, yutulan yemin sindirilmesine yardımcı olabilecek proteolitik ve amilolitik enzimler üretebileceğine dikkat çekmiştir. Fungal probiyotiklerin kullanımı ayrıca sindirim enzimi aktivitelerini yükselterek, piliçlerin yemi daha iyi tüketebilmesi ve sindirmesi ile sonuçlanabilir (Saleh et al., 2014). Bir dizi çalışma, fungal probiyotiklerin piliçlerin büyüme performansını iyileştirdiği mekanizmaları doğrulamıştır. Fungal probiyotiklerin yem sindirilebilirliğini iyileştirdiği ve böylece etlik piliçler için besin mevcudiyetini artırdığı görülmektedir (Park et al., 2016) Saleh et al., 2014). Ayrıca Yamamoto et al. (2007), fungal probiyotiklerin büyüme destekleyicileri üretebileceğini ve böylece piliçlerin büyüme oranını artırabileceğini öne sürmüştür. Ayrıca, iskelet kası proteininin azaltılmış yıkımı ve artan kas protein sentezi, fungus probiyotikleri ile tedavi edilen piliçlerde artan büyüme oranından da sorumlu olabilir (Saleh et al., 2014). Saleh et al. (2010, 2014), fungus probiyotiklerinin plazma 3-metilhistidin konsantrasyonunu (kas proteini döngüsü için biyobelirteç) ve kasta proteoliz ile ilgili faktörlerin gen ekspresyonlarını azalttığı ve diğer yandan miyozin ve aktin mRNA ekspresyonlarını ve böylece piliçlerde protein sentezi arttırdığı açtı. Son olarak, fungus probiyotiklerinin piliçlerdeki enfeksiyonları hafifletme kabiliyeti (Sugiharto et al., 2018), bakım ve iyileşmeden ziyade büyümeye katkıda bulunuyor gibi görünmektedir.

Günümüzde, tüketiciler yüksek doymuş yağ içeriğine sahip et tüketiminin sağlık sorunlarına yol açabileceğine inandıklarından, etlik piliçlerin et kalitesi bir endişe kaynağı olmuştur. Fungal probiyotiklerin diyet takviyesi, etlik piliçlerde yağ profilini iyileştirmeye yönelik beslenme yaklaşımının bir parçası olmuştur (Saleh et al., 2010, 2011b). Fungal probiyotiklerin piliçlerde yağ bileşimine nasıl müdahale ettiği büyük ölçüde bilinmemektedir ancak Saleh et al. (2014), fungal probiyotiklerin piliçlerin kasındaki delta-6 yağ asidi desatürazının (çoklu doymamış yağ asitlerinin sentezinden sorumlu) mRNA ekspresyonunu değiştirebileceğini öne sürmüştür. Fungal probiyotiklerin kolesterol düşürücü etkisi ile ilgili olarak, Hajjaj et al. (2005), filamentöz fungus *A. oryzae*'nin kolesterol biyosentezini engelleyen bileşikler ürettiğini gösterdi (Hajjaj et al., 2005). Ayrıca Mersmann (1998), *Aspergillus* sp.'nin yağ dokularında hormona

duyarlı lipaz ve malat dehidrogenaz enziminin aktivitelerini etkileyerek hayvanlarda şişmanlığı azalttığını göstermişlerdir.

2.5. Fermantasyon

Hayvan yemlerine probiyotik olarak mikroorganizma eklenmesinin yanı sıra yemi mikroorganizma ile fermente etmede diğer bir yaklaşımdır. Fermantasyon teknolojisi, enerji üretimi, malzeme, ilaç endüstrileri, kimya ve gıda endüstrilerinde uygulaması olan bileşiklerin üretimi için mikrobiyal enzimlerin kullanımını içeren alan olarak tanımlanmaktadır. Çeşitli gıdalarda doğal olarak bulunur. İnsanlar onu eski zamanlardan beri gıdaların korunması ve organoleptik özellikleri için kullanmaktadır. Gıda muhafazasında, ekmek, bira, sirke, yoğurt, peynir ve şarap üretiminde kullanılan eski zamanların köklü bir teknolojisidir. Zaman içinde rafine edilmiş ve çeşitlendirilmiştir (Singh et al., 2017).

Maya, bakteri ve filamentli fungus gibi çeşitli mikroorganizmaların, karmaşık substratların endüstriyel ölçekte insanlar için yararlı olan basit bileşiklere dönüştürülmesinde (enzim üretimi, metabolitler, biyokütle, rekombinant teknoloji ve biyo-dönüşüm ürünü) yer aldığı biyolojik süreçtir. Organik asit ve alkol, fermantasyonun ana ürünleridir. Bu süreçte antibiyotikler, enzimler ve büyüme faktörleri gibi ikincil metabolitlerin üretilmesi de söz konusudur (Joshi et al., 2018).

Biyolojik aktivite kazandıkları için biyoaktif bileşikler olarak da bilinirler. Bu bileşikler, çok besleyici olan az miktarda bitki ve gıda bileşenleri içerir. Çeşitli biyoaktif bileşikler, örneğin fenolik bileşikler, büyüme faktörleri, gıda pigmentleri, antibiyotikler, mikotoksinler ve alkaloidler gibi ikincil metabolitlerden oluşur. Fenolik bileşiklerin bileşenleri flavonoidler, tanenler ve fenolik asitlerdir. Flavononlar, flavonoller, flavonlar, antosiyanidinler ve izoflavonlar, flavonoidlerin bazı ana sınıflarıdır. Flavonoid, çoğunun doğal olarak oluşan bileşikler olduğu en büyük bitki fenolik koleksiyonunu içerir (Nkhata et al., 2018).

Farklı bakış açılarına göre yiyecek ve içecek, modern endüstriyel fermantasyon süreçlerinde kullanılmaktadır. Çevresel parametreler ve fermantasyon için gerekli organizmalar gibi farklı parametreler bazında bu teknikler daha gelişmiş hale gelmiştir (Joshi et al., 2018).

Fermantasyon, gıdaları korumanın en eski yöntemlerinden biridir. Mikroorganizmaların aktivitesi, gıdaları birçok patojenik ve bozulmaya neden olan organizmadan koruyarak gıdaların daha uzun süre yenilebilir kalmasını sağlayabilir. Koruyucu etkisinin yanı sıra, fermantasyon beslenme özelliklerini iyileştirebilir ve insanlar ve hayvanlar için sağlık yararları sağlayabilir. Fermantasyon, funguslar da dahil olmak üzere her yerde bulunan çeşitli mikroorganizmaları içerir (Sugiharto et al., 2015). Protein içeriğini, gerekli metabolik enzimleri ve patojenik bakteri önleyici maddeleri artırabilen fermantasyon işlemi yoluyla besin zenginleştirmeye çalışıldı (Fatmawati et al., 2018).

Prebiyotikler, probiyotikler, sinbiyotikler, bitki özleri veya enzimler gibi yem katkı maddeleri ile karşılaştırıldığında, fermantasyon yoluyla yem üretimi, yem kalitesini ve bağırsak ekolojisini iyileştirme avantajlarına sahiptir. Yem endüstrisinde enzimler, amino asitler veya doğrudan beslenen mikroorganizmalar gibi yem katkı maddelerinin üretiminin anahtarı fermantasyon olsa da şimdi odak noktası yemlerin fermantasyonu (sıvı fermantasyon, katı hal fermantasyonu ve silolama teknolojilerinde ilerlemedir) ve fermente süt üretimidir. Bu, yem fermantasyon süreçlerinin mikrobiyolojisinin anlaşılmasının yanı sıra fermente edilmiş yemlerin bağırsak ekolojisi ve biyogüvenlik üzerindeki etkisini de içerir (Dai et al., 2019).

Literatürde kümes hayvanları üzerinde yapılan birçok in vitro ve in vivo çalışma, yemi fermente etmeden yeme probiyotik eklemenin etkisini incelemiştir (Mersmann, 1998; Hajjaj et al., 2005; Eid et al., 2010; Saleh, 2011). Bununla birlikte, bazı diğer çalışmalar, kümes hayvanlarının mikroorganizmalar tarafından fermente edilmiş geleneksel veya geleneksel olmayan bir yemle beslenmesinin etkisini incelemiştir (Obadina et al., 2006; Yamamoto et al., 2007; Lateef et al., 2008; Ezekiel et al., 2010; Kazda et al., 2014; Bayitse et al., 2015; Sugiharto and Ranjitkar, 2019). Ve her iki çalışma türü de olumlu sonuçlar vermiştir. Her iki

avantajı da değerlendirmek için çalışmamızda, sadece filamentöz *R. oryzae* suşlarının probiyotik olarak kullanım potansiyelini değerlendirmeyi değil, aynı zamanda geleneksel ve geleneksel olmayan yemlerin fermente edilmesinin yem kalitesi üzerine etkisini de fermentasyon yöntemi ile değerlendirmeyi amaçladık.

2.5.1. Katı Hal Fermantasyonu

Mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sırasında çeşitli substratları değiştirmek için kullanılması, hammadde ve atıklardaki besin maddelerinin mevcudiyetini arttırmanın tercih edilen yollarından biridir (Pelizer et al., 2007). Katı hal fermentasyonu (KHF), rasyon, yakıt, gıda, kimya ve ilaç endüstrilerinde ikincil metabolitlerin üretim potansiyeli ve kullanılmayan veya kullanılmamış kalıntılara değer katması nedeniyle biyoteknoloji endüstrisi tarafından benimsenmiştir (Singhania et al., 2009). KHF, batık fermentasyona göre, fermentörler için daha az yer gerektirmesi ve az atık miktarları için uygun olması gibi bazı avantajlar sunar; süreç sırasında standartların sıkı kontrolüne ihtiyaç duymadan basit alt tabakaları ve düşük maliyetli kullanır (Sabu et al., 2002). KHF'de başta tarımsal-endüstriyel yan ürünler olmak üzere çeşitli hammaddeler uygulanabilir ve hammaddelerin seçim nihai ürüne bağlıdır. Hammadde öncelikle kullanılan bitkisel biyomadde buğday kepeği ve buğday samanı ve pirinç kepeği vb.'den elde edilen selüloz, hemiselüloz ve lignin olabilir.

İki ana tip fermentasyon tekniğinden biri katı hal fermentasyonu diğeri batık fermentasyondur (Subramaniyam and Vimala, 2012). KHF işlemi, serbest su yokluğunda kontrollü koşullar altında katı malzemeler üzerinde büyüyen mikroorganizmaları içerir. Substratın kullanılarak mikroorganizmaların büyümesini ve metabolik aktivitesini arttırması için yeterli neme sahip olması gerekir bu nedenle gerekli nem, katı matris içinde emilmiş halde bulunur (Krishna, 2005). Katı hal fermente edilmiş ürünlerin kalitesi, başlangıç nemi, partikül boyutu, pH, sıcaklık, ortam bileşimi, işletim sistemi, karıştırma, sterilizasyon, su aktivitesi, aşı yoğunluğu, ajitasyon, havalandırma, ürünün ekstraksiyonu ve sonraki işlem gibi koşullara bağlıdır (Renge et al., 2012). İyi bir verim elde etmek için etkili bir KHF sistemi tasarlarlarken (Yazid et al., 2017) bu koşulların uygun şekilde seçilmesi ve dikkatlice optimize edilmesi gerekir.

KHF'de çeşitli mikroorganizmalar kullanılmaktadır ancak gereken minimum nem nedeniyle, maya ve filamentli funguslar gibi yalnızca sınırlı sayıda mikroorganizma KHF koşulları altında iyi bir şekilde büyüyebilir (Yazid et al., 2017). Bu simüle edilmiş koşul altında, mikroplar, substratların kimyasal veya fizikokimyasal özelliklerini değiştirebilir ve ayrıca çok çeşitli enzimler üreterek substratı bozabilir.

Batık fermantasyonlara kıyasla KHF kullanmanın çeşitli avantajları vardır. Katı hal fermantasyonları, fungusların daha kolay uyum sağlayabileceği doğal ortamı kopyalar (Kupski et al., 2015). Katı hal fermentasyonları ayrıca azaltılmış su aktivitesine sahiptir, daha düşük kurutma maliyetlerine sahiptir ve tipik olarak daha küçük inkübasyon kapları kullanılır, bu da endüstriyel işleme maliyetlerini düşürür (Zhang et al., 2015; Simon et al., 2017). Bu nedenle daha az maliyetli ve enerji açısından verimli ve aynı zamanda çevre dostudur (Sitanggang et al., 2020). Çalışmalar, batık fermantasyondan daha üstün ürün verimleri ve basitleştirilmiş akış aşağı işleme (López et al., 2010) gösterdiğinden ve gıda üretimi için başarıyla kullanıldığı için KHF giderek daha fazla ilgi gördü (Ibarruri and Hernández, 2018).

Filamentli fungusları kullanan KHF tekniğinin, hayvan beslemede lignoselülozik malzemelerin iyileştirilmesi için nispeten düşük maliyetli ve uygun bir teknoloji olduğu bildirilmiştir (Ugwuanyi et al., 2008). Ek olarak, KHF'nin filamentöz funguslara doğal ortamlarına benzer çevresel koşullar sağladığı için lignoselülotik enzimler üretmenin etkili bir yolu olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, kısıtlı su mevcudiyeti bakteri ve maya ile kontaminasyon olasılığını azaltır (Neifar et al., 2009). Selüloz ve hemiselüloz bileşenlerinden ödün vermeden hayvan yemi kalitesini iyileştirmek için lignini bozunduran bir fungusun seçilmesinin tercih edildiği iyi belgelenmiştir (Fadel and El-Ghonemy, 2015).

2.5.2. Fermentasyon başlatıcılar olarak filamentöz funguslar

Fermantasyon, piliç endüstrisinde yemin besin içeriğini iyileştirmek için popüler bir yöntem haline geldi. Fermentasyon ayrıca etlik piliçler için faydalı olabilecek fonksiyonel özellikler üretmeye de yönlendirilmiştir (Sugiharto, 2019). Birkaç fungusun amilolitik veya selülotik aktivitelere sahip olduğu ve bu

nedenle karbonhidrat açısından zengin atıkları fermente etmek için kullanılabilirken, fermantasyondan sonra yem bileşenleri için gerekli protein kaynaklarını sağlayabilirler. *S. cerevisiae*, *Candida utilis*, *A. niger* ve *R. oligosporus* gibi bazı fungusların, fermantasyon yoluyla biyokütlenin protein içeriğini artırabildiği bilinmektedir (Dhillon et al., 2013). *Trichoderma viridae*, *Trichoderma reesei*, *A. oryzae* ve *R. oligosporus*'tan oluşan küfle fermente edilmiş mısır koçanı, Java barb balıklarının yem formülasyonunda kullanılmış ve Java barb'ın büyümesini arttırdığı gösterilmiştir (Rostika and Safitri, 2012). Maya proteini kolayca sindirilebilir ve bir protein kaynağı sağlamasına rağmen bağışıklık sistemini güçlendirebilen ve bakteriyel hastalık direncini uyarabilen balık ve karides yemi takviyeleri için yaygın olarak kullanılmaktadır (Kang et al., 2010). Yem katkı maddesi olarak kullanıldığında, elma posasının *Gongronella butleri* kullanılarak yapılan fermantasyondan sonra artan protein içeriği, balıkların vücut kütlelerini %44 oranında artırabilmiştir (Vendruscolo et al., 2009; Fatmawati et al., 2018).

Besinsel iyileştirme açısından, substratların lif ve protein içeriklerinin azaltılması ve arttırılması, fermantasyonun ana odağı gibi görünmektedir (Lateef et al., 2008; Sugiharto et al., 2017, 2018b). Filamentli fungusların daha az erişilebilir lignoselülozik materyalleri parçalayabildiği (Kazda et al., 2014) ve böylece özellikle geleneksel olmayan yem bileşenlerinin lif içeriğini düşürmeye yardımcı olduğu literatür tarafından doğrulanmıştır. Filamentli funguslar, hücre dışı lignoselülotik enzimleri aracılığıyla, lignoselülozik maddelerin en dirençli maddesi olan lignini bozabilir (Dashtban et al., 2010; Znameroski and Glass, 2013). Fungusların fibrolitik aktivitesi, bitki hücrelerinin inatçı bileşenlerine derinlemesine nüfuz edebilen rizoidler tarafından da desteklenebilir. Penetrasyon üzerine, fungus enzimleri daha sonra bitki hücre duvarı yapılarını (lif fraksiyonu) bozabilir.

Protein içeriği geliştirme açısından, Liang et al. (2009), fermantasyon işlemi sırasında fungus hücre dışı proteininin artan üretiminin, substratların artan protein içeriğine katkıda bulunabileceğini öne sürdü. Gerçekten de fungus hifleri tek hücre proteini olarak hizmet edebildiğinden, fermentasyon sırasında büyüyen fungus hifleri, substratların artan protein içeriğinden sorumlu olabilir (Lateef et al., 2008). Ayrıca, fungusların amilum ve nişasta olmayan polisakkaritleri

monosakkaritlere hidrolize edebilen enzimler üretme kabiliyeti, monosakkaritler uygun şekilde proteine dönüştürüldüğü için fermente ürünlerdeki protein içeriğinin artmasına da yardımcı olabilir (Bayitse et al., 2015).

Filamentli funguslar, antioksidan kaynakları olarak kullanılmalarının yanı sıra, fermentasyon yoluyla yem veya yem bileşenlerinin antioksidan özelliklerini arttırmak için de kullanılmıştır. Lateef et al. (2008), *R. stolonifer* LAU 07 kullanılarak yapılan fermentasyonun, kakao pod kabuğu, manyok kabuğu ve hurma çekirdeği kekinin antioksidan aktivitelerini (süpürme kapasitesini) arttırdığını bildirmiştir. Benzer şekilde, başka bir çalışma, *A. oryzae* var. *effuse*, *A. oryzae* ve *A. niger* kullanılarak katı hal fermentasyonunun ardından yulafın toplam fenollerinde, flavonoidlerinde ve antioksidan aktivitelerinde artış olduğunu göstermiştir (Cai et al., 2012). Buna paralel olarak, Dey ve Kuhad (2014), *R. oryzae* RCK2012 kullanarak katı hal fermentasyonundan sonra buğdayın antioksidan potansiyelinin arttığını göstermiştir (Bhanja Dey and Kuhad, 2014). Substratlardaki artan miselyum (antioksidatif özellikler açısından zengin) yoğunluğuna ek olarak, substratların artan antioksidan aktivitesi, fermentasyon süreci boyunca antioksidatif bileşiklerin kompleks bağlarından artan salınımının yanı sıra antioksidan bileşenlerin artan sentezine bağlanıyor gibi görünmektedir (Hur et al., 2014). Yukarıdaki çalışmalara ek olarak, Sugiharto et al. (2018b), *C. crassa* ile katı hal fermentasyonunun muz kabuğu küspesinin polifenol, tanen ve antioksidan aktivitesini azalttığını bildirmiştir. Bu çalışma ise uzun süreli bir fungus fermentasyonu periyodunun antioksidan bileşenlere ve dolayısıyla substratların antioksidan aktivitesine zarar verebileceğini öne sürmüştür. Bu nedenle, uygun fungus ile yemin fermentasyonu periyodu, substratların antioksidatif özelliklerinin içeriği için çok önemlidir.

2.6. *Rhizopus spp.*

Rhizopus cinsi (phylum Zygomycota, sınıf Zygomycetes, Mucoraceae familyası), KHF'de biyo-dönüşüm organizması olarak yaygın olarak kullanılan bir fungus cinsidir. 10 türden oluşan bu cins, Güneydoğu Asya'da tempeh üretimi, fındık, tahıl, baklagiller ve meyve fermentasyonu veya pirinç şarabı üretimi için kullanılan gıda ile ilgili türleri (*R. oligosporus* ve *R. oryzae*) içerir (Nout and

Kiers, 2005; Cantabrana et al., 2015). Geniş büyüme sıcaklık aralığı (25 ile 45°C), geniş büyüme ve hayatta kalma pH aralığı (en az 4,5 ile 7,5), geniş fermentatif substratlar ve üretilen yan ürün yelpazesi gibi çeşitli özellikler, bu cinsi biyoteknoloji endüstrisindeki büyük uygulamalar için ilginç kılmaktadır (Ibarruri and Hernández, 2018).

Çoğu durumda, geleneksel ürünler maya, bakteri ve fungus karışımı ile fermente edilir. Diğer cinsler arasında *Rhizopus*, bu fermente ürünlerden sorumlu fungus ekosisteminin bir parçasıdır. Bu fungusun bilimsel sınıflandırması Sınıf, Phycomycetes; Ordo, Mucorales; Aile, Mucoraceae; Cins, *Rhizopus*. Farklı özellikler, bu cinsi gıda üretiminde büyük uygulama için ilginç kılmaktadır. *Rhizopus*, hayatta kalabilmek için basit bir ekosisteme ihtiyaç duyar ve 25 ile 45°C arasında kuvvetli bir şekilde büyüyebilir. Tüm bu özellikler onları neredeyse her yere hazırlar ve hemen hemen tüm bitkisel materyal kolonizasyonuna izin verir. Fungus büyümesinin ana kısıtlaması, yüksek bir yüzdede kalması gereken nemdir. Fermentasyon sırasında *Rhizopus*'un amilaz, lipaz ve proteaz aktivitesi (Baumann ve Bisping, 1995), besinlerin biyolojik olarak dağılılırlığını ve birçok bileşiği enerji ve karbon kaynağı olarak kullanma yeteneklerini artırır. Ayrıca bu fungus çok zengin bir ikincil metabolizmaya sahiptir, duysal ve besinsel ilgisi olan çok sayıda bileşik üretir (Denter et al., 1998). Son olarak, *Rhizopus*, fungus önleyici ve bakteri önleyici bileşikler üretebilir (Dinesh Babu ve diğerleri, 2009).

2.6.1. *Rhizopus oryzae*

R. oryzae'nin geniş endüstriyel kullanım alanları vardır. FDA tarafından GRAS olarak kabul edilir ve bu nedenle endüstriyel olarak kullanımı güvenlidir ayrıca çeşitli karbon kaynaklarını tüketebilir (Rani and Ghosh, 2011). Fermentasyon sırasında *R. oryzae*, besinlerin enerji ve karbon kaynağı olarak birçok bileşiği kullanma yeteneğini artırmak için amilaz, lipaz ve proteaz aktivitesi üretir (Cantabrana et al., 2015). Tarihsel olarak, fermentasyonda, özellikle soya fasulyesini fermente etmek ve Malezya ve Endonezya'da tempeh oluşturmak için kullanılmıştır (Londoño-Hernández et al., 2017). Geleneksel Tempeh oluşturmak için aynı yöntemleri kullanarak, *R. oryzae* bezelye, fasulye ve

bakla gibi diğer pişmiş baklagillere aşılabilir. Fermantasyon inkübasyonu 33 °C'de 48 saat sürer. Kuluçkadan sonra, baklagiller arasında miselyum gözlenebilir ve daha büyük, tek tip bir ürün oluşturur. Genel olarak, meyveler, tahıllar, kabuklu yemişler ve baklagiller *R. oryzae* ile küf fermantasyonu, gıdalarda asitlik, tatlılık ve acılık oluşturma gibi duyuşal değışiklikler üretir. *R. oryzae*, gıda katkı maddesi olarak kullanılan ve aynı zamanda plastikleri parçalayarak glikozdan yüksek seviyelerde laktat üretebilir (Dijksterhuis and Samson, 2006). Enzimle modifiye edilmiş peynir ürünlerinde *R. oryzae*, süt yağının ve proteinlerin parçalanarak peynirin toz ve macun formlarını oluşturduğu mikrobiyal enzimler sağlar. Spesifik olarak, peynir lorunu ve asit kazeini parçalar (Early, 2012).

Selülozlar ve hemiselülozlar arasında proteaz, üreaz, ribonükleaz, pektat liyaz ve poligalakturonaz gibi diğer enzimler *R. oryzae*'nin kültür ortamında bulunur. Bir dizi enzim üretmenin yanı sıra, bir dizi organik asit, alkol ve ester de üretebilir. *R. oryzae*'deki selülozlar biyoteknoloji, gıda, bira ve şarap, hayvan yemi, tekstil ve çamaşır, kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrileri ve tarımda uygulanabilir.

R. oryzae, aerobik koşullar altında hem glikozu hem de ksilozu ksilitol, gliserol, etanol, karbon dioksit ve fungus biyokütlesi gibi yan ürünlerle saf L (+)-laktik asitlere dönüştürebilir. Endo-ksilanaz, ksilan depolimerizasyonu için anahtar bir enzimdir ve buğday samanı, buğday sapı, pamuk küspesi, fındık kabuğu, mısır koçanı ve yulaf talaşı gibi farklı ksilan içeren tarımsal yan ürünlerden *R. oryzae* fermantasyonu ile üretilmiştir. Pektinazlar, meyve sularının ve şarapların ekstraksiyonu ve berraklaştırılması, bitkisel materyallerden yağların, aromaların ve pigmentasyonun ekstraksiyonu, keten, jüt ve kenevir üretimi için selüloz liflerinin hazırlanması ve ayrıca kahve ve çay fermantasyonları için gereklidir. *R. oryzae*, pirinç bitkilerinde nişasta içeriğini parçalayabilir ve bu nedenle amilolitik aktiviteler gösterir. Ayrıca gıda endüstrisinde kullanılan ekstra hücresel izoamilazı ürettiği rapor edilmiştir. İzoamilazın patates nişastası, ararot nişastası, demirhindi çekirdeği, tapyoka ve yulafı parçaladığı bulundu. Enzimin parçalayıcı özelliği, şeker üretim endüstrilerinde oldukça uygulanabilir. *R. oryzae*'de bulunabilen proteazlar, ticari endüstrilerde oldukça faydalıdır. Örneğin, gıda, ilaç, deterjan, deri ve tabaklama endüstrilerinde uygulamayı artırmıştır. Ayrıca gümüş geri kazanımı ve peptit sentezinde de rol oynar. Bir *R. oryzae*

türünün, 3 ila 6 arasında yüksek pH stabilitesi ve zayıf termostabilite gösteren alkalın serin proteaz salgıladığı bulundu. *R. oryzae*'den ekstrakte edilen lipaz, yan etkiler olmaksızın sindirime yardımcı olarak tüketilmiştir. Lipazlar, yağları hidrolize eder ve ardından diasilgliseroller, monoasilgliseroller ve gliserol gibi serbest yağ asitlerinin salınımını sağlar. Lipazlar, sulu olmayan çözeltilerde sentetik reaksiyonları katalize etme yetenekleri nedeniyle biyoteknoloji uygulamalarında yer almıştır. *R. oryzae*, ribonükleaz üretimini uyaran kalsiyum ve molibden ilavesiyle metal iyonu ile düzenlenen sıvı bir ortamda hücre içi ribonükleaz üretebilir. Etanol, L-laktik asit üretimi sırasında *R. oryzae*'nin fermentasyon sürecindeki ana yan üründür. *R. oryzae*, organik çözücülerde ester üretimi için bir biyokatalizör olarak kullanılabilir. Dört *R. oryzae* suşunun kuru miselyumunun, farklı aroma esterlerinin sentezini katalize etmede etkili olduğu kanıtlanmıştır. Örneğin, ananas aroması veya bütül asetat esterleri, *R. oryzae* tarafından asetik asit ve bütanol arasındaki esterleşme reaksiyonları ile üretildi. Bu aroma bileşiği gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde kullanılabilir. Tüm bu özellikler ve metabolitler, bu türün kümes hayvanları üzerinde potansiyel olarak olumlu etkileri olan iyi bir probiyotik olmasını sağlar.

2.7. Probiyotik özelliklerin taranması

Bir organizmanın probiyotik olarak kullanılabilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekir, bu nedenle birkaç testten oluşan tarama sürecinden geçmesi gerekir. Bu tarama deneyleri öncelikle in vitro çalışmalar ile başlar. Daha sonra probiyotik olarak kullanım potansiyeline sahip suşlar in vivo deneylere tabi tutulur.

Probiyotik bir organizmanın belirlenmesi için yapılması gereken ilk ve en önemli özellik, onun güvenliğidir. Probiyotik organizma, insanlar veya hayvanlar tarafından doğrudan yutularak kullanıldığından, fayda sağlayanlar için herhangi bir tehlike arz etmeyeceğinin kanıtlanması gerekir (Anadón et al., 2006; Kabir, 2009; Bilginer ve Çetin, 2019). Probiyotiğin herhangi bir antagonistik etkisinin olmadığından emin olduktan sonra aşağıdaki bölümlerde açıklanacağı gibi diğer özellikler taranmaktadır.

Önerilen in vitro ve in vivo deneylerden bazıları, mide ortamına direnç, safra tuzuna tolerans, kolesterol asimilasyonu, bağırsak yüzeyi yapışması ve model gastrointestinal sistemler (Bilginer ve Çetin, 2019), enfeksiyonları kontrol altına almak, antibiyotik görevi görmek ve tümörleri baskılamak gibi organizmanın konakçı gastrointestinal sistemde hayatta kalma ve işlev görme yeteneği ile ilgilidir (Atilgan and Çİçek, 2021).

Kümes hayvanları üzerinde yapılan in vivo deneyler şunları içerir: Besin kullanımı, büyüme ve yumurtlama performansı ve bağırsak sağlığı üzerindeki etkiler (Jha et al., 2020), sağlık yararları ve organizma üzerindeki diğer olumlu etkiler, ısı stresinin hafifletilmesine yol açan gen ifadesindeki değişiklikler gibi hücresel düzeyde yapılan testlerdir (Krysiak et al., 2021).

2.7.1 Güvenlik

Gıda veya yem endüstrisinde kullanılan bir probiyotığın ilk ve en önemli özelliği güvenli olmasıdır. Süt ürünleri fermentasyonu, fırınlama ve bağcılık gibi işlemlerde starter mikroorganizmaların geleneksel kullanımı, çok az düzenlemeye tabi tutulmuş veya hiç düzenlemeye tabi tutulmamıştır. Bununla birlikte, probiyotik mikroorganizmalar yeni bir uygulamayı temsil eder ve çok çeşitli rahatsızlıklardan muzdarip tüketiciler tarafından “kendi kendine ilaç” olarak tüketilebilir. Bu nedenle, bu mikroorganizmaların güvenliğinin hem gıda hem de yem endüstrisi ve nihayetinde ürünlerini kullanacak olan tüketiciler için tekil bir ilgi alanı olması anlaşılabilir bir durumdur. Kimyasal gıda katkı maddelerinin aksine, uzun yıllardır gıda/yem katkı maddesi mikroorganizmasının güvenliğini belirlemek için yerleşik veya onaylanmış test kriterleri yoktu. Bu durum probiyotiklerin düzenlenmesi için bir gereklilik oluşturmuştur. Gerçekten de, düzenleyici önlemler bir kez türetildiğinde, gıda veya hayvan yemi üretiminde mikroorganizmaların genel olarak kullanılmasıyla da ilgili olabilir. Feord ortaya çıkan düzenleyici çerçevelerin mükemmel bir incelemesini yaptı ve bu nedenle Avrupa Birliği içinde Türkiye’de de izlenen ve uygulanan bazı mevzuatlar oluşturuldu (Wright, 2005).

R. oryzae genellikle, kan damarlarının içinde ve çevresinde büyüyen hiflerle karakterize mukormikoz olarak bilinen bir hastalığa neden olur.

Mukormikoza neden olan ajanlar, insanlar, koyunlar ve sığırlar için toksik olan agroklavin gibi toksinler de üretebilir. Bu enfeksiyon genellikle bağışıklığı baskılanmış kişilerde görülür ancak nadirdir (Hernández ve Buckley, 2019).

Hayvanlarda, dişi domuzların östrojenik aktivitesini etkileyen Zearalenone-14-Sülfat toksini (Borzekowski et al., 2018) ve endofungal bakteriyel toksinler gibi birkaç vaka dışında, bilimsel literatürde *R. oryzae* tarafından toksin üretim raporları yoktur. Endofungal bakteri içeren suşlar ikincil metabolitler üretebildiğinden, kullanılan *Rhizopus* suşlarının endofungal bakteri içerip içermediğinin araştırılmasının da çok önemli olduğunu vurgulanmıştır (Falconer et al., 2017). Bu endobakteriyel toksinlerin en iyi bilinen örnekleri rhizoxin ve rhizonindir. Fungal sitozolde bulunan endofungal bakteriler tarafından üretilen bu toksinler önem kazanmıştır. Rhizoxin, *R. microsporus*'tan izole edilen endosimbiont bir bakteri olan *Burkholderia rhizoxinica* tarafından üretilir. Rhizonin A ve B ilk olarak Mozambik yer fıstığından izole edilen toksin üreten *R. microsporus* suşunda (MRC 303) ilk kez tespit edilmiştir. Bu toksin, *R. microsporus*'tan izole edilen *Burkholderia endofungorum* tarafından üretilir (Partida-Martinez and Hertweck, 2005; Partida-Martinez et al., 2007a; Partida-Martinez et al., 2008).

R. oryzae biyoyürünleri FDA tarafından GRAS olarak kabul edilmesine ve yüzyıllardır gıda fermentasyonuna entegrasyonuna rağmen, bakterinin fungal miselyumundan salınma tehlikesi olduğundan, fungal suşların toksijenik bakteri türlerini barındırıp barındırmadığını araştırmak çok önemlidir. Bakteriler toksin üretemese bile, fungal miselyumdan bakteri endosimbiontları salınırsa sepsis gibi ciddi sağlık problemleri ortaya çıkabilir (Biol ve Gunyar, 2021; Ibrahim et al., 2009; (Lackner et al., 2009). Bu çalışmada kullanacağımız *R. oryzae* suşları endofungal bakteri içermeyen suşlardan seçilmiştir. Bu nedenle endofungal bakteri içermediğinin kanıtlanması gerekir.

GIT mikrobiyal ekolojisi ve probiyotik etki mekanizma(lar)ı konusundaki bilgi birikimindeki ilerleme, yeni probiyotiklerin tanıtılma olasılığını artırmaktadır. Bu nedenle, insan sağlığını, hayvan sağlığını ve çevreyi korumak için bu ürünlerin düzenlenmesine artan bir ilgi vardır. Probiyotik üreticilerinin iddialarının doğru olması ve tüketicilerin uygun şekilde korunması da önemlidir.

Diğer yem katkı maddelerinin aksine, probiyotiklerin belirli ayırt edici özellikleri vardır. Probiyotikler canlı organizmalardır, GIT'de inaktive edilebilirler ve konakçı hayvanların genetiği ile etkileşime girebilirler. Bu faktörler, probiyotiklerin diğer yem katkı maddelerine göre daha sıkı düzenlenmesini gerektirir (Hoffmann et al., 2013). Ayrıca, bir probiyotiğin yem katkı maddesi olarak mı yoksa terapötik bir madde olarak mı ele alınacağı arasında ince bir çizgi vardır. Bu, probiyotiğin düzenlenme şeklini etkiler.

Başlangıçta FAO ve WHO tarafından gıda güvenliği yönergeleri geliştirmek üzere kurulan Codex Alimentarius Komisyonu (CAC), iyi hayvan beslemeye ilişkin Uygulama Kurallarında- CAC/RCP 54-2004'te bir yem katkı maddesini “besin değeri olsun ya da olmasın, normalde kendi başına yem olarak tüketilmeyen, kasıtlı olarak eklenen mikroorganizmalar, enzimler, asitlik düzenleyiciler, eser elementler ve vitaminleri dahil olmak üzere herhangi bir bileşen” olarak tanımlamıştır. Bu nedenle, “code of practice on good animal feeding” probiyotikler ile ilgili konuları düzenleyen ulusal mevzuatlarına ek olarak üye devletler tarafından probiyotiklerin üretimi, işlenmesi, depolanması, taşınması ve dağıtımı için kılavuz olarak izlenecek ilgili CAC kodudur.

FDA'ya gelince, hayvan yemlerinde kullanılan probiyotikler için Doğrudan Beslemeli Mikrobiyal ürünleri ifadesini kullanır. FDA kılavuz belgesi (CPG Sec. 689.100), DFM'leri “canlı mikroorganizmaları içerdiği iddia edilen ürünler” olarak tanımlamıştır.

Ülkemizde “Yem Katkı Maddelerinin Değerlendirme ve Onay İşlemleri İçin Başvuru Dosyasının Hazırlanması ve Sunulması Hakkında Tebliğ (Tebliğ No: 2016/15) mevcuttur (Resmigazete, 2022). Bu Yönetmelik; insan sağlığının, hayvan sağlığı ve refahının, çevrenin, kullanıcı ve tüketicilerin yem katkı maddeleri ile ilgili çıkarlarının en üst düzeyde korunmasını sağlamak için, piyasaya sürülecek ve kullanılacak olan yem katkı maddelerinin onaylanmasına ilişkin usul ve esaslar ile yem katkı maddeleri ve premikslerin denetimi ve etiketlenmesine dair kuralları belirlemek amacıyla hazırlanmıştır.

Mevcut yönetmelikte “4.2. Zooteknik Katkı Maddeleri: Enzimler ve Mikroorganizmalar” başlığı altında 4.2.3.2. Katkı maddesi kullanımının tüketiciler açısından güvenilirliğine ilişkin çalışmalar” kısmı incelendiğinde

“Ancak, memeliler (insanlarda da dahil) tarafından doğrudan veya dolaylı olarak sindirilmesi amaçlanan canlı bakterilerin çoğu, belirgin güvenli kullanım geçmişi olan organizma gruplarından veya toksik tehlikelerin açık bir şekilde tanımlandığı gruplardan seçilir. Benzer şekilde, enzimlerin üretimi için mevcut durumda kullanılan mikroorganizmalara ilişkin tehlikeler genellikle belirlenir ve bu tehlikeler modern üretim metotlarıyla önemli ölçüde azaltılır. Bu nedenle, geçmişte güvenilir şekilde kullanıldığı bilinen mikrobiyal kaynaklar ve mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerde ve fermentasyon işlemi bileşenlerinin iyi tanımlandığı ve bilindiği durumlarda toksisite testleri (Örnek olarak: Oral toksisite ve genotoksisite testi) gerekli görülmemektedir. Bununla birlikte hem canlı organizma hem de enzimlerin üretilmesi için kullanılan organizmalara yönelik olarak Ek. 2.2.2.2. numaralı kısımda belirtilen özel durumlar her zaman dikkate alınır” ifadesi yer almaktadır (Resmigazete, 2022).

2.7.2. Antimikrobiyal etkinlik

İnsanlar (hayvanlar) ve funguslar, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi ortak mikrobiyal antagonistleri paylaştığından, insanlar bakterilere, funguslar ve protozoanlara karşı antimikrobiyal özellikler üreten fungusların doğal savunma stratejilerinden yararlanabilir. Bu özellikler, bu patojenlerin neden olduğu çeşitli ciddi hastalıklara karşı savunmada çok önemli rol oynamaktadır (Jagtap et al., 2013).

Kanatlıların stresli koşullarına maruz kaldığı büyük ölçekli yetiştirme tesislerinde, hastalıklar ve çevre koşullarının bozulması ile ilgili sorunlar sıklıkla ortaya çıkmakta ve ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hastalıkların önlenmesi ve kontrolü, son yıllarda veteriner ilaçlarının kullanımında önemli bir artışa yol açmıştır. Et ve yumurta üretimini iyileştirmek için kanatlı patojenlerini ve hastalıklarını önlemek için dünya çapında antibiyotikler kullanılmaktadır. Bununla birlikte, diyet antibiyotiklerinin kullanımı, ilaca dirençli bakterilerin gelişimi (SØrum and Sunde, 2001), kanatlı yeminin vücudunda ilaç kalıntıları (Abd El-Hack et al., 2018) ve normal mikrobiotanın dengesizliği gibi yaygın sorunlara neden olmuştur (Andremont, 2000). Bu nedenle, antibiyotiklerin kümes hayvanları için büyüme uyarıcısı olarak kullanılma olasılığı ve tedavi edici ajanlar

olarak kullanımlarının yan etkileri konusundaki endişeler hem tüketicilerin hem de üreticilerin alternatifler aramasına yol açmıştır. Hastalıkları önlemek veya normal biotanın yem besinlerini kullanmasını engelleyerek büyümeyi desteklemek için 50 yılı aşkın bir süredir sentetik antibiyotikler kullanılmıştır. 2006 yılı, 2821/98 sayılı Konsey Tüzüğü kapsamında AB'nin antibiyotik kullanımı ve hormonal büyüme üzerindeki yasağı nedeniyle hayvancılık üretimi için bir dönüm noktası oldu (Krysiak et al., 2021). Probiyotiklerin bu boşluğu doldurduğu düşünülmüştür ve halihazırda bazı çiftçiler antibiyotik yerine probiyotikleri kullanmaktadır (Kabir, 2009).

Probiyotikler, fizyolojik zorlanma sırasında konak organizmayı desteklemek, teknolojiye bağlı stresi azaltmak ve diyare sendromlarıyla mücadele etmek için çok çeşitli beslenme tekniklerinde kullanılmaktadır (Nadelman et al., 2010). Probiyotik mikroorganizmalar tarafından önerilen patojen inhibisyon mekanizmaları, besinler için rekabet, antimikrobiyal koşulların ve bileşiklerin (uçucu yağ asitleri, düşük pH ve bakteriyosinler) üretimi, bağırsak epitelindeki bağlanma bölgeleri için rekabet ve bağışıklık sisteminin uyarılmasını içerir (Patterson and Burkholder, 2012).

Farklı probiyotikler etkilerini, henüz tam olarak anlaşılmayan ve gastrointestinal lümen veya GIT duvarındaki etkilerinden kaynaklandığı tahmin edilen çeşitli mekanizmalar yoluyla gösterirler. Probiyotikler, antibiyotik büyüme destekleyicilerinin bir ikamesi olarak tanıtılsa da bu yem katkı maddelerinin etki mekanizması farklı görünmektedir (Fajardo et al., 2012). Probiyotikler, mide-bağırsak patojenlerini önlemeye ve kontrol etmeye ve/veya çeşitli mekanizmalar yoluyla üretim hayvanlarının performansını ve üretkenliğini artırmaya yardımcı olur. Yakından ilişkili suşlar, etki tarzlarında farklılık gösterebilir (Lodemann, 2010). Probiyotikler için önerilen başlıca etki mekanizmaları aşağıdaki bölümlerde ele alınmaktadır.

2.7.3. Gastrointestinal sistem toleransı

Yukarıda bahsedildiği gibi, bir probiyotik konağın mide-bağırsak sisteminde çoğalmak için sahip olması gereken bazı özellikler vardır, bunlardan bazıları yem üretimi sırasında hayatta kalma ve stabilite, piliçlerin mide-bağırsak

sisteminden geçiş sırasında canlı kalma, mide sularını, safra tuzunu ve pH aralıklarını tolere edebilme gibi özelliklerle probiyotiklerin kendi özelliklerini koruyabilmeleri beklenir (Kabir, 2009; Kadaikunnan et al., 2015; Sugiharto et al., 2015; Bilginer and etin, 2019).

2.7.4. Antioksidan kapasitesi

Antioksidanlar, oksidatif stresin zararlı etkisini hafifletebilen moleküllerdir. Etlik piliç endüstrisinde, sentetik antioksidanlar, özellikle ısı stresi sırasında ve aşılama sırasında yem takviyesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, sentetik antioksidanların aşırı kullanımı, tüketiciler üzerinde kanserojen ve/veya mutajenik etkilere neden olabilir (Fellenberg and Speisky, 2006). Bunun sonucunda, beslenme uzmanları artık ticari etlik piliçler için doğal antioksidanlar arıyorlar. Doğal antioksidan kaynakları arasında filamentli funguslar büyük potansiyele sahiptir.

Basidiomycetes, ascomycetes ve zygomycetes sınıflarına dahil filamentli fungusların doğal antioksidan kaynakları olduğu kanıtlanmıştır (Femenía-Ríos et al., 2006; Smith et al., 2015; Hameed et al., 2017; Sugiharto, 2019). Antioksidanlar açısından zengin gıda ürünleri her geçen gün popülaritesini artırmaktadır. Tahıl ve baklagillerin filamentli funguslarla fermente edilmesi, antioksidan maddeleri artırarak diyabetes mellitus, nörodejeneratif bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar, solunum hastalıkları, katarakt gelişimi, romatoid artrit ve çeşitli kanserler gibi serbest radikal aracılı hastalıkları önleyecektir (Bhanja Dey and Kuhad, 2014; (Sitanggang et al., 2020) ve broiler piliç diyeti esas olarak tahıl ve baklagillerden oluşur. Ayrıca, bazı çalışmalar, tarımsal atıkların fermente edilerek ve dolayısıyla piliç diyetlerine eklenerek antioksidan aktivitesini artırmaktadır (Lateef et al., 2008; Sugiharto et al., 2016). Ayrıca, insan tüketimi için etteki antioksidan aktivitenin, oksidatif acılaşmaya karşı raf ömrünü uzattığı kanıtlanmıştır (Fellenberg and Speisky, 2006).

Smith et al. (2015) filamentöz funguslar *Grifola frondosa*, *Monascus purpureus*, *Pleurotus* spp., *Lentinula edodes* ve *Trametes versicolor*'un iyi doğal antioksidan kaynakları olduğunu göstermiştir. Aynı şekilde Sugiharto et al. (2015, 2016, 2017), *A. charticola*, *R. oryzae* ve *C. crassa*'nın iyi doğal antioksidan

kaynakları olarak potansiyellerini belirtmiştir. Ayrıca Hameed et al. (2017), filamentli fungus *Mucor circinelloides*'in antioksidan potansiyelini ortaya çıkardı. Yukarıda belirtilen funguslara ek olarak, *Aspergillus* PR78 ve *Aspergillus* PR66 (Arora and Chandra, 2010), *Aspergillus candidus*, *Penicillium roquefortii*, *Emericella falconensis*, *Mortierella*, *Colletotrichum gloeosporioides* gibi diğer filamentli funguslar (Femenía-Ríos et al., 2006), *Chaetomium* sp., *Cladosporium* sp., *Torula* sp., *Phoma* sp. (Huang et al., 2007), *Antrodia camphorata* (Song and Yen, 2002) ve *Mycelia sterilia* (Moon et al., 2006) ayrıca antioksidan özelliklere sahiptir.

Fenolik bileşikler, flavonoidler ve yoğunlaştırılmış tanenler genellikle antioksidan özelliklerine atfedilmiştir. Filamentli funguslarla ilgili olarak, Sugiharto et al. (2016), *A. charticola*'nın antioksidan kapasitesinin esas olarak fungus miselyumundaki fenolik ve tanen içeriğinden kaynaklandığını öne sürmüştür. Arora ve Chandra (2010), fenolik bileşiklerin *Aspergillus* sp. ekstraktının antioksidan aktivitesine atfedildiğine dikkat çekti (Arora and Chandra, 2010). Hameed et al. (2017), *Mucor circinelloides*'in antioksidan kapasitesini belirlemede fenollerin, flavonoidlerin ve yoğunlaştırılmış tanenlerin rolünü belgelemiştir. Ayrıca, antioksidan enzimlerin (süperoksit dismutaz ve katalaz gibi), askorbik asit, γ -linolenik asit, β -karoten, tokoferoller ve polisakkaritlerin varlığı da filamentli fungusların antioksidan özelliklerine katkıda bulunabilir (Smith et al., 2015; Hameed et al., 2017); Prior et al., 2005; Tosi et al., 2010).

2.8. Yem özellikleri ve kimyasal bileşimleri

Kanatlı üretiminde en büyük maliyet yem olduğundan, yem kullanım verimliliğindeki küçük iyileştirmelerin önemli bir ekonomik etkisi vardır. Yemde probiyotik kullanımına bağlı olarak kanatlıların performans ve verimliliğindeki iyileşme, artan yem alımına ve artan yem verimliliğine bağlanmıştır (Shim et al., 2012), ancak bu her zaman sonuç değildir. Yem özelliklerini doğrudan etkileyen ve fermantasyondan doğrudan etkilenen en önemli yem bileşenleri ham protein, ham yağ, ham lif, ham kül, nişasta, şeker ve diyet enerjisidir. Kuru madde yemin

bir özelliğidir ancak fermentasyondan doğrudan etkilenmez çünkü genellikle yemdeki diğer bileşenlerin testinden önce yemin kurutulması gerekir.

2.8.1. Kuru madde

Kuru madde, belirli bir yemde hayvan için mevcut olan besin miktarının bir göstergesidir. Hayvanların sağlığını ve üretimini sürdürmek için günde belirli bir miktarda kuru madde tüketmesi gerekir (lbs veya kg/gün olarak ölçülür). Kuru madde, 12-24 saat boyunca 100°C'nin üzerinde etüvde kurutulan numunelerin ağırlık kaybı olarak tanımlanmaktadır (Al-Arif et al., 2017).

2.8.2. Ham Protein

Etlik piliç rasyonları formüle edilirken temel vurgu ham proteine yapılır, çünkü protein kanatlı diyetlerinin kritik bileşenidir ve karbonhidratlar, yağ, su, vitaminler ve mineraller gibi diğer ana besinlerle birlikte yaşam için gereklidir. Proteinler, peptit bağları ile birbirine bağlanan amino asitlerden oluşan polimerlerdir. Proteinler sindirim sisteminde parçalanır ve amino asitlere hidrolize edilir. Daha sonra, absorpsiyondan sonra, amino asitler bir araya getirilecek ve farklı vücut dokularının yapımında kullanılan proteinleri oluşturmak üzere metabolize edilecektir. Ayrıca, her biri vücutta belirli bir role sahip olan kan plazma proteinleri, enzimler, hormonlar ve antikorlar gibi hayati metabolik rollere de hizmet ederler. Bununla birlikte, protein aynı zamanda kümes hayvanlarının diyetlerindeki en pahalı bileşenlerden biridir. Bu nedenle beslenme ve ekonomik olarak tüm besleme sistemlerinde uygun protein kullanımı esastır ve israfli kullanım üretim maliyetini artırır (Beski et al., 2015).

Kanatlı hayvan yemi formülasyonunda, protein içeriği yüksek yem maddelerinin kullanılabilirliği, kuşun ihtiyaç duyduğu yeterli miktarda esansiyel amino asitleri sağlama yeteneğine ve ayrıca protein sindirilebilirliğine ve bununla ilişkili toksik maddelerin seviyesine bağlıdır (Scanes et al., 2004).

Bir hayvanın protein ihtiyacının çoğunluğu bitki protein kaynakları tarafından sağlanır. Dünya çapında geleneksel olarak en çok kullanılan enerji ve protein kaynakları sırasıyla mısır ve soya fasulyesidir. Buğday ve sorgum gibi

tahıllar ve bazı bitkisel proteinli yemler de tüm dünyada kullanılmaktadır. Bazı amino asitlerdeki eksiklikleri nedeniyle, bitki proteinleri genellikle ek bir amino asit kaynağına veya hayvansal protein gibi diğer protein kaynaklarına ihtiyaç duyar. Bitki proteinleri genellikle hayvansal proteinlerden daha ucuzdur; ancak, anti-nutrisyonel faktörlerin (ANF'ler) içeriğinden dolayı kullanımlarında bir sınırlama vardır. Bu ANF'lerin çoğu, ANF'lerin elimine edilmesi ve bitkisel protein ürünlerinde proteinin serbest kalması nedeniyle bitki proteinlerinin besin değerinde ve protein seviyesinde bazen artışa neden olan ısıtma işlemi ile yok edilebilir. Kanatlı yemi üretimi sırasında, özellikle yüksek düzeyde amino asit gerektiren genç kuşlar için hayvansal protein bileşenlerinin yemlere dahil edilmesine özen gösterilir. Kuşlar yaşlandıkça esansiyel amino asit gereksinimleri kademeli olarak azalır ve daha yaşlı kuşların taleplerini karşılamak için daha düşük hayvansal protein içeriği ve nispeten daha yüksek bitkisel protein seviyeleri içeren diyetler sağlamak mümkündür (Beski et al., 2015).

Atıkların biyolojik olarak dönüştürülmesi, kaynakların geri kazanılması için doğal bir yoldur ve doğal geri dönüşüm süreci biyoteknoloji ile kolaylaştırılabilir. Büyük miktarlarda bulunan gıda işleme atıklarına yönelik biyoteknolojik işlemler, tek hücre proteini (SCP) olarak da adlandırılan mikrobiyal biyokütle proteini (MBP) dahil olmak üzere faydalı son ürünler üretebilirken, atıklar da işlem sırasında saflaştırılır. Modern biyoteknoloji endüstrisinde hammaddeden MBP üretimi, biyoteknoloji alanında en çok çalışılan konulardan biridir. Bu kalıntıların çevrimi ve geri dönüşümü için mikrobiyal fermentasyonun kullanılması, yalnızca kirliliğin azaltılmasıyla sonuçlanmaz, aynı zamanda düşük maliyetli ve yüksek kaliteli MBP üretilmesine de yardımcı olur. Atıklardan MBP üretimi, dünyanın çevresel ve endüstriyel atık sorunlarının çözülmesine yardımcı olmaktadır. Kümes hayvanları ve hayvan yemlerine eklenmek amacı ile MBP üretimi için çeşitli tarımsal endüstriyel atıklar kullanılmıştır ve bu MBP'lerin üretimi için farklı fungus ve mayalar kullanılmıştır.

Fungusların, pelet veya filamentli morfolojileri, MBP üretmek için sermaye ve işletme maliyetlerinin önemli bir bölümünü oluşturan kültür ortamından MBP'nin eldesi düşük maliyete izin verdiğinden, MBP üretimi için daha fazla avantaja sahiptir. Zhang et al. 2008, monogastrik hayvanların beslenmesinde kullanılmak üzere protein açısından zengin ürünlere

dönüştürülebilen üre ile zenginleştirildikten sonra tek hücre proteini üretmek için nişasta atıkları kullandı. Örneğin, Prosin ve Protide (mısır nişastasından *Corynebacterium glutamicum* tarafından fermente edilen lizin ve nükleotit üretiminin yan ürünleri olan iki tür tek hücreli protein) gibi tek hücre proteinlerinin sütten kesilmiş domuzların diyetindeki balık ununun %50'sinin yerini aldığı gösterilmiştir (Zhang et al., 2013; Makkar, 2018). Fermantasyonun yemin protein içeriği üzerindeki etkisi için bölüm 2.5.2'de açılmaktadır.

2.8.3. Ham Yağ

Lipitler öncelikle hücreler için bir enerji kaynağıdır. Ancak hücre zarının ve hücredeki diğer tüm zarların bileşenleri olarak hücre bütünlüğü ve taşınmasında da kritik roller oynarlar. Ek olarak, lipidler canlı organizmalarda büyümeyi, sağlığı ve aktiviteyi etkileyen çeşitli anahtar süreçlere katılırlar. Ayrıca diğer hücre yapısal bileşenleri ile kompleksler yapabilir ve hücre işlevselliği için çok önemli olan lipoproteinler ve glikolipidler gibi farklı moleküller oluşturabilirler (Burlingame et al., 2009).

Proteinlere benzer şekilde, yemdeki yağın önemi, yağ asitleri profiliyle bağlantılıdır. ≥ 18 karbondan oluşan uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri (LC-PUFA'lar), kanıtlanmış faydalı sağlık özellikleri nedeniyle özellikle önemlidir. Bitkiler ve diğer bazı organizmalar LC-PUFA'ları sentezleyemezler ve sentezlerini gerçekleştirebilenler yeterli seviyelere ulaşamayabilirler, bu da LC-PUFA'ların yemlere eklenmesinin önemine işaret eder. Yağ asitlerinin profiline ek olarak, PUFA/doymuş yağ asitleri oranının da, $\geq 0,45$ 'lik bir oranın sağlıklı olarak kabul edildiği bu nedenle yem uygulamaları sırasında dikkate alınması önemlidir (Gomez Candela et al., 2011).

Yağ takviyelerinin kümes hayvanlarında üretim performansını artıracak bir süredir bilinmektedir ve şu anda çiftlik hayvanlarının diyetlerindeki yağ miktarını ve türünü optimize etmeye büyük ilgi vardır. Yağ içeriğini artırarak rasyonların besin yoğunluğunu artırmak, kümes hayvanlarında gıda dönüşüm verimliliğinin artması ve daha hızlı büyüme ile sonuçlanır. Tüm doğal yağlar alkol olarak gliserol içerdiğinden, yağların nitelikleri arasında görülen farklılıklar yağ asidi içeriklerinden kaynaklanmaktadır. Yağlardaki

serbest yağ asidi miktarı özellikle yenidoğanlarda daha düşük enerji aktivitesine sahiptir (Cetingul ve Yardimci, 2008).

Yem maddesinin yağ asidi profili, dokuların yağ asidi profilini etkiler. Yeme eklenen yağlar öncelikle deri altında veya vücut boşluklarında, daha sonra kaslar arasında ve son olarak da kasların içinde birikir çünkü kasların içinde bulunan yağın beslenerek arttırılması zordur. Diyetlerde yağ kullanımının bir diğer avantajı da ekstra kalori etkisidir. Ekstra kalori etkisi doymamış yağ asitlerinin doymuş yağ asitlerinin emilimini kolaylaştırma etkisi olarak ortaya çıkar ve yağ katkılı diyetlerin sindirim sisteminde daha uzun süre tutulması ve böylece standart diyetlere kıyasla emilimin artması şeklinde ortaya çıkar (Cetingul ve Yardimci, 2008). Fermente yem uygulaması, yağ asidi profilinin pozitif modifikasyonu yoluyla etlik piliç etinin besin değerini artırabilir (Semjon et al., 2020).

2.8.4. Ham Lif

Kanatlı diyetleri için kullanılan birçok yem içeriğinde bol miktarda bulunmasına rağmen, diyet lifi (DF), kanatlı beslenmesinde uzun yıllardır çok az ilgi görmüştür. Diyet lifinin hem doğrudan bir enerji kaynağı olarak hem de sindirim ve metabolik süreçler üzerindeki etkileri yoluyla dolaylı olarak diyetlerin besleyici değerine önemli ölçüde katkıda bulunabileceği iyi bilinmektedir. Bununla birlikte, genel lif terimi, lif fraksiyonlarının besleyici değerinin tahminini engelleyen, değişen fizikokimyasal özelliklere sahip çok çeşitli bir polimer grubunu kapsar. Sadece lif miktarı değil, belki daha da önemlisi, lif türü diyetin sindirimdeki kullanımını belirleyecek ve dolayısıyla enerji değerini olumlu veya olumsuz yönde etkileyecektir (de Vries, 2015).

Kanatlı hayvan beslemede lif, enerji teminindeki küçük rolü ve sindirim süreçlerine müdahalesi nedeniyle genellikle azalan enerji mevcudiyeti ile ilişkilendirilse de, düşük ile orta miktarda lif (50 g/kg'a kadar) gastrointestinal gelişim, fonksiyon ve sağlık, böylece besin sindirilebilirliğini ve büyüme performansını artırır (de Vries, 2015).

Diyet lifi, gastrointestinal sistemdeki fizyolojik, yapısal ve fonksiyonel değişikliklerle ilişkilendirilen bitki yemlerinde bulunan bir bileşendir (Tejeda and Kim, 2021). Diyet lifi, etlik piliçlere verilen yaygın sebzelerde bulunan doğal bir bileşiktir. Lif, ince bağırsakta sindirim ve emilimden kaçma yeteneğine sahiptir, bu da diğer besinlerin gastrointestinal kanalda emilme ve metabolize edilme şeklini etkileyebilir. Life atfedilen işlevsellik, kimyasal ve fiziksel yapıya göre değişir ve çoğu zaman, yaygın yem maddelerinde bulunan karbonhidratların karmaşıklığı nedeniyle, nitelikler arasında net bir ayrım yapmak zordur.

2.8.5. Ham Kül

Yemin bir bileşeni olarak kül, bir yemin inorganik (mineral) içeriğini tanımlar. Yemin kül seviyesi düşük olduğunda, piliçler hastalıklara ve zayıf yumurta kabuğu oluşumuna yatkın hale gelir (Mgbeahuruike et al., 2021).

Kanatlı hayvan yemlerinde çok fazla kül, özellikle böbrek hastalıklarına neden olan kanatlı faunalarında böbrekler hariç idrar yollarında ve mesanede kristallerin oluşmasına neden olabilir ayrıca aşırı kül içeriği büyüyen kanatlı kuşlarda kemik ve eklem sorunlarına neden olur. Kısa kül içeriğine sahip yemler, idrar yolu komplikasyonlarının izlenmesinde işbirlikçidir, kül içeriği yüksek yemlerin et ve yumurta için yetiştirilen kanatlı kuşlar için faydalı olduğu literatürde kaydedilmemiştir (Afolabi et al., 2021).

2.8.6. Nişasta

Kanatlı diyetlerindeki besinler arasında, nişasta niceliksel olarak en önemlidir. Diyetler kuru madde bazında %50'ye kadar nişasta içerebilir ve nişasta en önemli enerji kaynağıdır. Bu, tahılların kümes hayvanlarının beslenmesinde en önemli bileşen olmasının mantıklı bir sonucudur ve Klasing (2005) Galliformes'un omnivor olduğunu ve sık sık belirtildiği gibi etçil olmadığını vurgulamasına rağmen, aşağıda tartışılacağı gibi nişastayı sindirme kapasitesi yüksektir. En azından genç piliçlerde yağı sindirme kapasitesinin sınırlı olduğu da iyi bilinmektedir (Wiseman et al., 1998) ve bu nedenle nişasta diyetlerde ana enerji kaynağı olmalıdır. Şeker ve proteinin diğer potansiyel enerji kaynakları, en azından ekonomik ve teknik açıdan birincil enerji kaynakları olarak

uygun değildir. Nişastanın ana kaynağı, nişastanın depolandığı ve çimlenme sırasında yavrular tarafından bir enerji kaynağı olarak kullanıldığı çim ailesindeki bitkilerden elde edilen tohumlardır. Bu kaynak ağırlıklı olarak mısır, buğday ve diğer tahıllar şeklinde olmasına rağmen, manyok gibi yumru köklerden elde edilen nişasta da kanatlı diyetlerinde kullanılabilir (Svihus, 2014).

Kanatlı sürüleri, diyet nişastasası, lipid ve proteinden elde ettikleri yüksek bir enerji gereksinimine sahiptir. Kanatlı diyetlerinin çoğunda, tahıl tanelerindeki nişasta, kümes hayvanlarının sindirim kapasitesinin yüksek olduğu en önemli enerji kaynağıdır (Svihus, 2014). Bununla birlikte, yem bileşenleri, sindirimin hızını ve derecesini etkileyen nişasta özellikleri bakımından farklılık gösterir. Sindirimi etkileyen faktörler arasında nişasta granül boyutu, amiloz: amilopektin oranı ve enkapsülasyon ve kristallik derecesi bulunmaktadır (Herwig et al., 2019).

2.8.7. Şeker

Şekerin hayvansal sistemde nişastadan daha iyi bir enerji kaynağı olduğu bilinmektedir. En büyük maltaz aktivitesi jejunumda olup, onu en düşük değerle duodenum ile ileum takip eder (Sklan ve Noy, 2003). Bu nedenle sakkaroz gibi şekerlerin metabolize edilebilirliğinin nişastadan önemli ölçüde daha yüksek olduğu görülmektedir (Hussein et al., 2016).

2.8.8. Diyet enerjisi

Üretim verimliliğini etkileyen geniş faktör yelpazesi arasında, yeterli ve dengeli bir enerji ve makro ve mikro besinlerin temini en büyük öneme sahiptir. Enerji bir besin maddesi değil, özümsemiğinde vücut fonksiyonları için hayati önem taşıyan enerji veren karbonhidratlar, lipidler ve protein gibi besinlerin bir özelliğidir (Barzegar et al., 2020). Diyet enerjisi, kanatlı yemi formülasyonlarında en önemli nicel ve en maliyetli bileşeni temsil eder ve diyetler dengelenirken dikkate alınması gereken ilk bileşendir. Diyet enerjisi, piliç büyümesinin ana itici gücü olan yem tüketimini de kontrol eder. Bu nedenle, bileşenlerin mevcut enerji içeriğinin doğru bir şekilde değerlendirilmesi, hassas ve uygun maliyetli yem formülasyonları için önemlidir. 1950'lerin ortalarında tanıtılmasından bu yana, metabolize edilebilir enerji (ME) sistemi genel olarak kabul görmüş ve

kanatlıların enerji gereksinimlerini ve bireysel yem bileşenlerinin mevcut enerjisini tanımlamak ve eksiksiz kanatlı yemlerini formüle etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Abdollahi et al., 2021). Metabolize edilebilir enerji (ME), bakımdan tam üretken potansiyele kadar birçok farklı metabolik süreç için gereklidir (Massi et al., 2018).

Diyet enerjisi, et ve yumurta sentezi için yakıttır. Bu nedenle kanatlı rasyonlarındaki metabolize edilebilir enerjinin %60 ila %65'i karbonhidratlara atfedilir. Diyet karbonhidratları kümes hayvanları için önemli enerji kaynaklarıdır. Mısır, sorgum, buğday ve arpa gibi tahıl taneleri, kümes hayvanlarının diyetlerinde karbonhidrat bileşeninin çoğuna katkıda bulunur. Tahıl tanelerindeki karbonhidrat içeriğinin çoğu, kümes hayvanları tarafından kolayca sindirilen nişasta olarak oluşur. Bu nedenle kanatlı rasyonlarında tahıl taneleri en kabul edilebilir enerji kaynağıdır. Çeşitli olası mekanizmalar önerilmiş olmasına rağmen, kümes hayvanlarının farklı diyet enerji konsantrasyonlarına tepki verdiği fizyolojik mekanizmalar bilinmemektedir. Diyet enerjisini arttırmak için sıvı ve katı yağ ilavesi yaygın olarak uygulanmaktadır. Bir dizi çalışma, enerjiyi arttırmak için diyetle yağ asitlerinin kullanımını önermektedir. Bu nedenle, yüksek üretken performansı sürdürmek için (örneğin, 35-45 günde 2-2,5 kg hedef canlı ağırlığa ulaşmak için) kümes hayvanları tipik olarak yüksek enerjili diyetlerle beslenir (Mota de Carvalho et al., 2021).

Birçok çalışma, fermantasyonun geleneksel veya geleneksel olmayan kanatlı yemi üzerindeki olumlu etkisini göstermiştir. Wu et al. (2020), etlik piliçlere verilen kolza tohumu küspesinin fermente edildiğinde metabolize edilebilir enerjide önemli bir artış olduğunu göstermiştir (Wu et al., 2020). Ayrıca, funguslarla fermente edilmiş manyok küspesinin, enerji içeriği açısından zengin olduğu için kanatlı rasyonlarında ucuz bir alternatif yem olduğu kanıtlanmıştır (Sugiharto, 2019).

Enerji, etlik piliç yeminin bir bileşeni olarak ekonomik önem kazanmaya devam ediyor. Küresel olarak, kümes hayvanları endüstrisi, tahıllar, proteinli unlar ve yemeklik yağlar şeklinde önemli bir enerji tüketicisidir. Piliçler tarafından tüketilen besinler, metabolizma sırasında oksitlendiğinde enerji verir. Enerji, homeostaz, büyüme, yumurta üretimi ve hareket için gereklidir.

Gereksinimin ötesinde tüketilen enerji, glikojen olarak kısa süreler ve depo yağ olarak daha uzun süre tutulur. Vücut kompozisyonundan ödün vermeden maksimum büyümeyi karşılayan diyetleri formüle etmek beslenme uzmanının görevidir (Swick et al., 2014).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışma Materyalleri

Çalışmada kullanılan *R. oryzae* suşları daha önce yapılan TÜBİTAK 116Z588 ve 17-FEN-044 nolu projeler kapsamında izole edilmiştir ve mikoloji laboratuvarında saklanan suşlardır. Bu suşlar tarım toprakları ve farklı gıda örneklerinden izole edilmiştir. Ayrıca bu çalışma kapsamında piyasada satışı sunulan ve tavuk beslenmesinde kullanılan 7 farklı yem ve İzmir/Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden temin edilen 4 farklı yaş tavuk dışkısı da *R. oryzae* izolasyonu için kullanılmıştır. Bu şekilde çalışmaya 84 adet *R. oryzae* suşu dahil edilmiştir. Fungusların fermantasyon kapasitelerinin araştırılması için substrat ticari olarak satılan bir tavuk yemi (Özlem yem markası) ve zeytin posası kullanılmıştır.

3.1.2. Antimikrobiyal Aktivite Test Organizmaları

Rhizopus oryzae suşlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için testlerde kullanılan organizmalar Ege Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Tablo 3.1 Kullanılan organizmalar

Organizma	Test
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 7064	Antibakteriyel aktivite tayini
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	Antibakteriyel aktivite tayini
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	Antibakteriyel aktivite tayini
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Antibakteriyel aktivite tayini

<i>Candida albicans</i> ATCC 64548	Antifungal aktivite tayini
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	Antifungal aktivite tayini
<i>C. tropicalis</i> RSSK 665	Antifungal aktivite tayini
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	Antifungal aktivite tayini
<i>Aspergillus flavus</i> (çevresel izolat)	Antifungal aktivite tayini
<i>A. fumigatus</i> (çevresel izolat)	Antifungal aktivite tayini

3.1.3. Besiyerleri

Besiyeri 1: Dichloran Glycerol Agar (DG-18) (Merck 100465)

DG-18, toz formunda olan hazır bir besiyeridir. Besiyeri içeriği aşağıdaki tabloda gösterildiği gibidir.

Tablo 3.2. Dichloran Glycerol Agar besiyerin Bileşimi

D(+)-Glukoz	10,0 g
Dichloran	0,002 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
Kloramphenicol	0,1 g
MgSO ₄	0,5 g
Pepton	5,0 g
Agar	15,0 g

Fungusların izolasyonu ve sayımı için seçici bir ortam olarak kullanılır. 825 ml distile suya 31,6 g eklenerek hazırlandı, ardından 175 ml gliserol eklenmiştir. Sterilizasyon için besiyeri 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı. Daha sonra kullanım için steril petri kaplarına 25 ml olacak şekilde ilave edilip donmaya bırakılmıştır.

Besiyeri 2: Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck 110130)

Bu besiyeri hazır toz halindedir.

Tablo 3.3. Potato Dextrose Agar Besiyerin Bileşimi

Patates infüzyonu	4,0 g
D(+) Glukoz	20,0 g
Agar	15,0 g
Distile su	1000 ml

Fungusların sayımı için ve stok kültürlerin saklanması amacı ile kullanılır. Besiyerini hazırlamak için 1 litre suya 39 gr toz besiyeri bileşimi eklenir ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilir. Daha sonra steril petri kaplarına 25 ml olacak şekilde ilave edilip donmaya bırakılır. Fungal kültürlerinin stoklanmasında kullanılacaksa otoklavdan önce homejen olana dek kaynatılıp cam tüplere paylaştırılır. Ardından otoklavlanır.

Besiyeri 3: Malt Extract Broth (MEB)

Bu ortam, DNA izolasyonu öncesi gereken fungal pelleti elde etmek için kullanılır.

Tablo 3.4. Malt Extract Broth besiyerin Bileşimi

D-Glukoz (Sigma 16301)	20,0 g
Pepton (Merck 107214)	1,0 g
Malt Ekstresi (Merck 105391)	20,0 g
Distile su	1000 ml

1 litre suda çözünerek önceden hazırlanmış MEB, 250 ml erlenlere 90 ml olarak dağıtılır. Erlenler 121 °C' de 15 dakika otoklavlanır.

Besiyeri 4: Yeast Malt Extract Agar (YMA)

YMA besiyeri anti-fungal aktivitesi ve mayaların stoklanması için kullanılmıştır.

Tablo 3.5. Yeast Malt Extract Agar besiyerin Bileşimi

D-Glukoz (Sigma 16301)	10,0 g
Pepton (Merck 107214)	5,0 g
Malt extract (Merck 105391)	3,0 g
Yeast extract (Merck 103753)	3,0 g
Agar (Merck 101613)	15,0 g
Distile su	1000 ml

Anti-fungal aktivite bakılırken kullanılan YMA, 1lt distile su içerisinde çözdürdükten sonra 121 °C' de 15 dakika otoklavlanır. Daha sonra petrilere eşit miktarda dökülür. Eğer stok için bu besiyeri kullanılacaksa yine distile su içerisinde çözdürülür ve eşit miktarda tüplere paylaştırılır. Ardından bu tüpler yine otoklavlanarak steril edilir.

Besiyeri 5: Plate Count Agar (PCA) (Merck 337163)

PCA hazır toz halinde olup anti-bakteriyal aktivite tespiti ve bakterilerin stoklanması için kullanılmıştır. Besiyeri bileşimi;

Tablo 3.6. Plate Count Agar besiyerin Bileşimi

Pepton	5,0 g
Maya özütü	2,5 g
D(+)-glukoz	1,0 g
Agar	14,0 g/l

22.5 g 1 litre distile suda eritilip 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak hazırlanır. Bundan sonra, steril Petri kaplarına eşit miktarda dökülür. Bakteri kültürü stoklamak için kullanılacaksa otoklava koymadan önce ısıtıp cam tüplere dağıtıp otoklavlanır.

Besiyeri 6: Malt Extract Agar (MEA)

MEA, farklı Rhizopus türlerinin tanımlanması için kullanıldı.

Tablo 3.7. Malt Extract Agar besiyerin Bileşimi

D-Glukoz (Sigma 16301)	20,0 g
Pepton (Merck 107214)	1,0 g
Malt Ekstresi (Merck 105391)	20,0 g
Agar (Merck 101613)	15,0 g
Distile su	1000 ml

121 °C'de 15 dakika otoklavlanır ve sonra eşit hacimlerde steril Petri kaplarına döküldü.

Besiyeri 7: Czapek Yeast Agar (CYA) (HIMEDIA M1335)

CYA hazır toz halindedir. Farklı *Rhizopus* türlerinin tanımlanmasında kullanılmıştır.

Tablo 3.8. Czapek Yeast Agar besiyerin Bileşimi

Sakkaroz	30,0 g
Maya özütü	5,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
NaNO ₃	0,3 g
KCl	0,05 g
MgSO ₄	0,05 g
FeSO ₄	0,001 g
ZnSO ₄	0,001 g
CuSO ₄	0,0005 g
Agar	15.0 g

51,40 gram 1 l distile su içinde süspansiyon haline getirilerek hazırlanır, ardından 121 °C'de 15 dakika otoklavlanır ve eşit hacimlerde steril Petri kaplarına dökülür.

3.1.4. Tampon ve Çözeltiler

Çözelti 1: Floresan Boya (Thermo, Fisher Scientific):

R. oryzae suşlarının fungal hücreleri içerisinde endofungal bakteri barındırıp barındırmadığı floresan mikroskobu altında incelenmiştir. Hazırlanan

preperatlar SYTO® 9 Green-Fluorescent Nucleic Acid boyası ile muamele edilmiştir.

Çözelti 2: Safra Tuzu (Ox-bile) (Sigma-Aldrich 70168-100G):

Gastrointestinal sistem tolerans testlerinde kullanılmıştır.

Çözelti 3: Pepsin (Sigma-Aldrich 107185):

Gastrointestinal sistem tolerans testlerinde kullanılmıştır.

Çözelti 4: 2,2-diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich 102258153):

Antioksidan aktivite tayininde kullanılmıştır.

Çözelti 5: L(+)-Ascorbik Asit (EMSURE 100468):

Antioksidan aktivite tayininde kullanılmıştır

Çözelti 6: Methanol (EMSURE 106009):

Antioksidan aktivite tayininde ve fungal ekstraktlarının hazırlanmasında kullanılır.

Çözelti 7: Lizis Tamponu (pH 8)

Lizis tamponu, 6,3 g 400 mM Tris HCl (SIGMA), 2,35 g 60 mM EDTA (Glentham,226JXM), 0,9 g 150 mM NaCl, 1,0 g %1'lik SDS (Glentham,163ZSS), 100 ml Distile sudan oluşur. Bu tampon *Rhizopus oryaze* suşlarından DNA izolasyonu sırasında kullanılır.

Çalışmamızda kullanılan *R. oryae* suşlarından DNA izolasyonu sırasında lizis tamponunu oluşturan tüm bileşenler prosedüre uygun bir şekilde tartılıp, distile su içerisinde çözülmüştür. Daha sonra 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavlanmıştır. Otoklavın ardından pH değeri ölçülüp, kullanılmıştır.

Çözelti 8: Potasyum Asetat Tamponu:

5M Potasyum asetat (SIGMA, SLBR2628V), 5,75 ml Glasiyel asetik asit ve 29,55 ml distile sudan oluşur. Öncelikle 14,7 gr potasyum asetat 29,55 ml su içinde çözülmüş ve otoklavlanmıştır. Otoklavın ardından 5,75 ml glasiyel asetik asit eklenir. Bu tampon *R. oryzae* suşlarından DNA izolasyonu sırasında kullanılmıştır.

Çözelti 9: Tris Borik Asit EDTA (TBE) Tamponu (5X):

5,5 g Borik asit (J.T.Baker), 0,75 g EDTA (Glenthams, 226JXM), 10,8 g Tris base (Glenthams, 103QGF), ve 182,55 ml distile sudan oluşmaktadır.

TBE, total DNA örneklerinin ve PCR ürünlerinin elektroforezinde kullanılmıştır. TBE tamponu ile agaroz jel hazırlanmış ve yürütme tankı doldurulmuştur.

Çözelti 10: İzopropanol (TEKKİM, 211016132001)

R. oryzae suşlarından DNA izolasyonu sırasında kullanılmıştır.

Çözelti 11: Etanol (%70) (SIGMA, SZBG1890V)

70 ml Etanol, 30 ml distile sudan oluşmaktadır.

R. oryzae suşlarından DNA izolasyonu sırasında kullanılmıştır.

Çözelti 12: dNTP karışımı (Thermo Fisher Scientific;10 mM)

R. oryzae suşlarına ait total DNA'ların spesifik primerler ile amplifikasyonu sırasında kullanılmıştır. Her bir dNTP'den 10mM içerecek şekilde hazır olarak temin edilmiştir.

Çözelti 14: Taq DNA polimeraz (Thermo Fisher Scientific, 500 U):

R. oryzae suşlarına ait total DNA'ların spesifik primerler ile amplifikasyonu sırasında kullanılmıştır.

Çözelti 15: PCR reaksiyon buffer (Thermo Fisher Scientific, 10X)

R. oryzae suşlarına ait total DNA'ların spesifik primerler ile amplifikasyonu sırasında kullanılmıştır.

Çözelti 15: MgCl₂ solüsyonu (Thermo Fisher Scientific, 25 mM)

R. oryzae suşlarına ait total DNA'ların spesifik primerler ile amplifikasyonu sırasında kullanılmıştır.

Çözelti 16: Ultrasaf su (EAU-BI-DISTILLEE)

R. oryzae suşlarına ait total DNA süspansiyonlarının hazırlanması ve PCR işlemleri sırasında kullanılır.

Çözelti 17: Primerler (Invitrogen)

PCR hedef bölge Primer Adı Dizi (5'- 3')

ITS1 tccgtaggtgaacctgcgg (Samson et al., 2014)

ITS4 tcctccgcttattgatatgc (Samson et al., 2014)

R. oryzae suşlarına ait total DNA'ların ITS bölgesinin amplifikasyonunda kullanılmıştır.

Çözelti 18: Marker DNA (100bp-1000bpThermo Fisher Scientific):

Ticari olarak sağlanan Marker DNA' lar *R. oryzae* suşlarına ait total DNA'lar ve ITS bölgesi amplifikasyon ürünlerinin uygun boyutta olup

olmadıklarını karşılaştırmak amacı ile her elektrofez sırasında jele ayrı bir kuyucuğa yüklenmiştir.

Çözelti 19: GelRed (Biotium)

R. oryzae suşlarına ait total DNA'lar ve ITS bölgesi amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde UV altında görüntülenebilmesi için GelRed kullanılmıştır.

Çözelti 21: Yükleme boyası (Thermo Scientific 6X Orange DNA (Loading Dye)

60% glycerol, 60 mM EDTA, 0.03% xylene, 0.15% orange G, ve 10 mM Tris-HCl (pH 7.6)

Yükleme boyası agaroz jel elektroforezinde jel yükleme tamponu olarak kullanılmıştır. DNA örnekleri yükleme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir.

3.1.5. DNA İzolasyonu Kiti (ZymoResearch Mini Prep-D6005)

R. oryzae suşlarının uygun şekilde parçalanması ile saflaştırılan endofungal bakteri izolatlarından DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

ZR Fungal/Bakteriyel DNA Kit içeriği;

Tablo 3.9. DNA İzolasyonu Kitinin içindekileri

Lysis Solution	40 ml
Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer	100 ml
DNA Pre-Wash Buffer	15 ml
Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer	50 ml

DNA Elution Buffer	10 ml
ZR BashingBead Lysis Tube	50
Zymo-Spin IV Spin Filters(Orange Tops)	50
Zymo Spin II Columns	50
Collection tubes	150

3.1.6. Fermantasyon Substratları

Substrat 1: Ticari yem (TY)

R. oryzae suşlarının fermantasyon yeteneklerini test etmek için İzmir'de (Özlem Yem) yaygın olarak satılan pelet formulu etlik piliç yemi kullanılmıştır. Yemin kompozisyonu; Mısır, Soya Küpesi, Kırık Pirinç, Kırık Buğday, Mısır DDGS (Kuru damıtıcı tahıllar), Ayçiçeği tohumu küpesi, Bulgur unu, Bisküvi kırığı, Pirinç kepeği, buğday unu, Kalsiyum Karbonat, Mısır Gluteni, Lizin Sülfat, Sodyum Klorür, Dikalsiyum Fosfat, Vitamin+Mineral Premiski, Cholin chloride ve Treonindir.

Substrat 2: Zeytin Posası (ZP)

Zeytin posası, Kemal Paşa/İzmir'deki bir zeytinyağı fabrikasından elde sağlanmıştır. Hem yeme eklenerek hem de tek başına kullanılarak fungusların fermentasyonuna tabi tutulmuştur.

3.1.7. Kullanılan Başlıca Cihazlar

- 4°C soğuk oda (Techno Block)
- 25°C Etüv (Memmert)
- 37°C Etüv (Dedeoğlu)

- Çalkalamalı İnkübatör (ZHICHENG® ZHWY-2112B)
- Distile su cihazı (GFL 2001/4)
- DNA Sekans Cihazı (ABI 3130XL, 16 KAPİLLAR SİSTEM)(IYTE)
- Floresan Mikroskobu (ZEISS – OBSERVER Z1)(IYTE)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Isı Bloğu (Stuart-Scientific)
- Işık Mikroskobu (Olympus CX22)
- Jel Görüntüleme Cihazı (UVP Dual-Insentiy Transilluminator)
- Jel Görüntüleme Sistemi (BIO-RAD, VERSADOC 4000MP)(IYTE)
- Manyetik karıştırıcı (DLAB)
- Otoklav (Hirayama)
- PCR Cihazı(Palm Cycler, Corbett Research)
- pH meter (HANNA instruments)
- Rotary Vacuum Evaporator (RE100-Pro DLAB)
- Santrifuj (Hettich)
- Sekans Analizi Cihazı (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems)
- Steril Kabin (Fagus)
- Thermal Cycler (BIO-RAD, C-1000) (IYTE)
- Thoma lamı
- UV-Vis spektrofotometre (VARIAN-CARY 50 Bio)
- Vorteks (Heidolph)
- Yatay Elektforez Sistemi (Thermo, EC340, 20×20 cm) (IYTE)
- Yatay Elektforez Tankı (Consort)

3.2. METOD

3.2.1. Fungus İzolasyonu

Mikoloji laboratuvarında stoklanan *R. oryzae* suşları endofungal bakteri içermeyen suşlardan seçilmiştir.

Ayrıca piyasada satışa sunulan 7 farklı tavuk yemi ve Veteriner Araştırma Merkezi'nden temin edilen 4 farklı yaş tavuk dışkısından da *R. oryzae* izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonda dökme plaka yöntemi şu şekilde uygulanmıştır; ilk olarak

alınan yemler ve tavuk dışkılarının her biri için 90 ml distile su bulunan erlenlere 10 g tartılarak eklenmiştir. Erlenlerde oluşan bu ilk 10^{-1} seyreltmeden daha önce steril ettiğimiz ve içerisinde 9 ml distile su bulunan tüplerimize her seferinde 1 ml aktararak 10^{-5} e kadar bir seri seyreltme gerçekleştirildi. Her seyreltmeden aynı şekilde 1 ml petrilere aktarılmış ve yaklaşık 20 ml DG-18 besiyeri ilave edilerek örnek ve besiyerinin homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Fungusların büyütmesi için gerekli koşullar olan 25°C 'de 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında petrilere hızlı gelişen bol miktarda hif ve stolon oluşturmuş, siyah sporangiumları ile siyah benekli olarak karakterize edilen ve koyu renkli sporangioforları olan koloniler izole edilip, saflaştırılmıştır.

3.2.2. Floresan Mikroskopu

Mikoloji laboratuvarından temin edilen suşlar endofungal bakteri içermeyen suşlardan seçilmiştir. Yeni izole edilen suşların endofungal bakteri içerip içermediği ise aşağıda açıklandığı gibi incelenmiştir.

Fungal yapılarda endofungal bakteri bulunup bulunmadığının gösterilmesi için suşlar SYTO 9 boyası ile boyanıp floresan mikroskopu altında incelenmiştir (Partida-Martinez et al., 2007b). İlk olarak *R. oryzae* suşları DG18 Agar besiyerine aşılanarak 27°C 'de 7 gün inkübe edildi. Ardından küf miselleri 100 ml MEB içeren erlenlere aktarılıp, 2 gün boyunca 27°C 'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Daha sonra bir Eppendorf tüpündeki 0,5 ml 0,85 NaCl'ye içerisine fungal miselyumlar ilave edildi. Fungal peletten 10 μl bir lama aktarılıp 0,5 μl SYTO 9 floresan nükleik asit boyası (Molecular Probes—S34854) eklendi. Karanlıkta 15 dakika inkübasyondan sonra örnekler Zeiss Axio Z1 floresan mikroskopu altında 500 nm eksitasyonda analiz edildi (Bırol ve Günyar 2021).

3.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Testi

Endofungal bakteri içermeyen *Rhizopus* suşlarının bakteri ve fungus test organizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite testi Sugiharto et al. (2015) kullandığı yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Antimikrobiyal aktivite testi için kullanılan bakteri ve funguslar,

Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji ABD kültür koleksiyonuna aittir.

3.2.3.1. Antibakteriyel Aktivite Testi

Rhizopus suşlarının antibakteriyel aktivitesini test etmek için iki Gram pozitif (*Bacillus cereus* ATCC 7064 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) ve iki Gram negatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Escherichia coli* ATCC 8739) olmak üzere dört bakteri kullanılmıştır. İlk olarak, aktivasyonları için bakteriler PCA üzerinde yeniden kültürlendi ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. *Rhizopus* suşları ise PDA üzerinde yeniden kültürlendi ve 37 °C'de 48 süreyle inkübe edilmiştir. Önce bakteri test organizması besiyeri üzerine yayılmıştır. PDA ortamında büyümüş fungal kültürden 0,8 cm'lik disk kesilmiş ve bakteri yayılmış besiyerinin ortasına bırakılmıştır. Petriler 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben, disk çevresinde üreme olmayan bölge görsel olarak incelendi ve *Rhizopus* diskleri olmayan kontrol ile karşılaştırıldı, aktivitenin büyüklüğünü belirlemek için büyümeyen bölge çapı bir cetvel ile ölçüldü. Deneyler üç paralel halinde yapılmıştır.

3.2.3.2. Antifungal Aktivite Testi

Rhizopus izolatlarının antifungal aktivitesini testi için dört maya (*Candida albicans* ATCC 64548, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* RSSK 665 ve *C. parapsilosis* ATCC 22019) ve iki filamentli fungus *Aspergillus flavus* (klinik izolatı) ve *A. fumigatus* (klinik izolatı) kullanılmıştır. Maya test suşları 37 °C'de 24 saat YMA'da aktive edilmiştir ve *A. fumigatus* ve *A. flavus* ile test *Rhizopus* suşları PDA üzerinde 37 °C'de 48 saat süreyle aktive edilmiştir. Önce maya test organizmaları besiyeri üzerine yayılmıştır. PDA ortamında büyümüş fungal kültürden 0,8 cm'lik disk kesilmiş ve maya yayılmış besiyerinin ortasına bırakılmıştır. Petriler 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Yine aynı şekilde küf test organizmaları PDA ortamı üzerine yayılmış, *Rhizopus* suşları 0,8 cm'lik disk kullanılarak kesilerek test organizmalarının yayıldığı petri ortasına bırakılmıştır. 48 saat boyunca 37°C inkübasyonun ardından, disk çevresinde üreme olmayan bölge görsel olarak incelendi ve *Rhizopus* diskleri olmayan

kontrol ile karşılaştırıldığında, aktivitenin genişliğini belirlemek için büyüme olmayan bölge çapı değerlendirilmiştir. Deneyler üç paralel halinde yapılmıştır.

3.2.4. Gastrointestinal koşullar tolerans tahlili

3.2.4.1. Ön Denemeler

İlk olarak, ön deneyler geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip *Rhizopus* suşları ile gastrointestinal koşulların toleransını ölçmek için yapılmıştır. İzolatlar, Sugiharto et al. (2015)'na göre asit, baz, safra tuzu ve simüle edilmiş mide suyuna toleransları açısından test edilmiştir. Asidik ve bazik koşullar tolerans testi için *Rhizopus* suşları pH 3 veya pH 8'e modifiye edilmiş PDA üzerine büyütülmüştür. Bu yöntem şu şekilde yapılmıştır; her bir gram *Rhizopus* izolatu önceden pH değeri 3 ve 8'e ayarlanmış ve steril edilmiş distile su ile 20 dakika muamele edildikten sonra PDA'ya inoküle edilerek 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası asit veya baza maruz kalmamış aynı *Rhizopus* suşu ile karşılaştırma yapılır.

Safra tuzu toleransı da iki yöntemle değerlendirildi; birincisi agar kuyu difüzyon yöntemi, ikincisi ise maruz bırakma yöntemi. Lin et al. (2003) tarafından tavuk bağırsağı safra tuzu çözeltisi konsantrasyonunun %0,01 ile %0,7 arasında değiştiği belirtilmektedir. Bu nedenle 100 ml steril distile su içinde üç safra tuzu konsantrasyonu (%0,2, %0,4 ve %0,8) hazırlanmıştır (Lin et al., 2003). PDA bulunan 9 cm'lik bir petri kabına her test *Rhizopus* suşu yayıldı, daha sonra 0,8 mm'lik bir kuyu açıldı ve kuyucuklara her safra tuzu konsantrasyonundan 25 ul eklendi. 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra kuyuları çevreleyen bir inhibisyon bölgesi, sadece damıtılmış su (%0 safra tuzu) kontrolüne karşı değerlendirildi. Maruz bırakma testi için, 1 g *Rhizopus* suşu, 10 ml % 0,2, %0,4 ve %0,8 safra tuzu konsantrasyonlarına 20 dk. süre ile maruz bırakıldı. Yani 1gr *Rhizopus* suşu farklı konsantrasyonlardaki safra tuzu çözeltileri ile ıslatılmıştır. Aynı zamanda %0 safra tuzu içeren solüsyon da kontrol olarak kullanıldı. Maruz bırakma işleminden sonra test organizmaları 37 °C'de 48 saat süreyle PDA üzerinde inkübe edildi ve test organizmalarının büyümesi kontrole kıyasla araştırılmıştır. Her iki test de üç paralel halinde yapılmıştır.

3.2.4.2 Kantitatif testler

Bir tavuğun sindirim sisteminden geçen ortalama yem tutma süresi 340 dakika (5,5 saat), ortalama maksimum yem tutma süresi ise 449 dakikadır (7,5 saat) (Svihus and Itani, 2019). Buna göre, fungal suşlar 0, 4 ve 8 saat safra tuzuna (ST) (% 2) ve simüle mide suyuna (SMS) (pH 2) maruz bırakılarak dayanıklılık düzeylerini karşılaştırmak için başka bir deney yapılmıştır (Lian et al. 2003, Sugiharto et al. 2015). %2' lik safra tuzu (100 ml distile su içinde 2 g oxgall safra çözülür) ve simüle mide suyu (3 g/l pepsin %0,5 tuzlu su içinde çözülür ve pH'ı 12 N HCl ile 2'ye ayarlanır) sterilize edildi. Bir g fungal pellet 1:10 safra tuzu ve simüle mide suyu solüsyonlarına bırakılıp 20 saniye vortekslendi. Ardından 37 °C'de inkübe edildi ve her saat başı 20 saniye vortekslendi. 4 saat ve 8 saatlik maruziyetlerin arkasından PDA ortamına yayma plaka yöntemiyle aşılınarak ve 37 °C'de 48 saat petriler inkübasyona bırakılmıştır. Hayatta kalma oranı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{Hayatta kalma oranı} = (K/T) \times 100$$

Burada K pozitif kontrolün kuru ağırlığıdır (0 saat, yani maruziyet yok) ve T; safra tuzuna ve simüle mide suyuna 4 veya 8 saat maruz kaldıktan sonra test edilen fungal kültürün kuru ağırlığıdır. Deneyler üç paralel halinde yapılmıştır.

3.2.5. Antioksidan aktivite Tayini

3.2.5.1. Fungal Ekstrenin Hazırlanması

İlk olarak, Sugiharto et al. 2016'na göre yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren 10 *Rhizopus* suşunun fungal ekstreleri elde edilmiştir. Funguslar, erlen (250 ml) içinde MEB'a aşılınmış ve 37°C'de 3 gün inkübasyondan sonra kültürün saflığını kontrol etmek için fungus kolonileri gözlemlenmiştir. Fungal pelletler daha sonra falcon tüplere (50 ml) aktarılmıştır. Kültürler 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek ekstraksiyona başlanmıştır. 1 g filtrat (çökelti) 100 ml metanol içinde çözüldü, 30 dakika ultrasonikasyona maruz bırakıldı ve üç gün masere edilmiştir. Maserasyon süresi boyunca her gün oda sıcaklığında 30 dk manyetik

karıştırıcı kullanılarak homojenizasyon yapılmıştır. Homojenat daha sonra döner vakumlu buharlaştırıcı (RE100-Pro DLAB rotary vacuum evaporator) ile 50°C' de ve 100 rpm'de hacim 25 ml olana kadar buharlaştırılmıştır.



Şekil 0.1. RE100-Pro DLAB Rotary Vacuum evaporatör.

Antioksidan aktivite, (Nan et al. 2009; Sugiharto et al. 2015) yöntemlerinde bazı modifikasyonlar yapılarak 2,2-difenilpikril-hidrazil (DPPH) serbest radikal süpürme değerlendirme ile ölçülmüştür. Metanol (çözücü) içindeki her *Rhizopus* özütünün (çözünen) altı farklı konsantrasyonu (%5, %10, %20, %30, %40 ve %50), toplam hacmi 3 ml olan spektrofotometre küvetlerinde hazırlanmıştır. Daha sonra konsantrasyonların her birine, nihai hacim 2,5 ml olacak şekilde 1 ml %0,004 DPPH ilave edilerek karışım çalkalandı. Bir UV-Vis

spektrofotometresinde, 70 dakika bir platoya ulaşıldıktan sonra absorbanstaki azalma 517 nm'de test edildi.

Sonuçlar, aynı konsantrasyonlarda pozitif kontrol referansı (metanol içerisinde hazırlanmış %5, %10, %20, %30, %40 ve %50 Askorbik asit tozu konsantrasyonları) kullanılarak stabil bir antioksidan ile karşılaştırıldı. İzolatların serbest radikal temizleme aktiviteleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{İnhibisyon yüzdesi (Ip)} = [(AB - AA) / AB] \times 100$$

Ip: DPPH'nin yüzde inhibisyonu

AB: Körün absorbanı

AA: 70 dakika sonra test edilen numunelerin absorbanı

Daha sonra IC₅₀ (Belirli bir biyolojik süreci veya biyolojik bileşeni %50 oranında inhibe etmek (indirgeme yapmak) için gereken numune konsantrasyonu), farklı konsantrasyonlarda inhibisyon yüzdesinin eğiminden hesaplandı, ardından Askorbik asidin IC₅₀'si ile karşılaştırıldı. IC₅₀ değeri ne kadar düşükse, antioksidan etki o kadar güçlüdür. Testler üç paralel halinde yapıldı.

3.2.6. Fenotipik ve genotipik tanımlama

3.2.6.1. Fenotipik tanımlama

Antimikrobiyal aktivite testleri neticesinde en iyi antimikrobiyal aktivite gösteren 10 izolat hem fenotipik hem de genotipik olarak tayin edilmiştir. İzolatlar MEA ve CYA üzerinde 7 gün 25°C'de büyütüldükten sonra, izolatların büyüme formları ve renkleri Petri kapları üzerinde ve ayrıca bileşik ışık mikroskobu altında incelenerek fenotipik tanımlama yapıldı. 37 °C'de 48 saat C ve MEA ve verileri fungusların tanımlama şemalarıyla ilişkilendirme (Pitt and Hocking, 2009). Ek I ve II'ye bakınız.

3.2.6.2. Genotiptik tanımlama

***Rhizopus sp.*'lerin DNA izolasyonu:**

Yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip 10 adet *Rhizopus sp.* izolatlarından DNA ekstraksiyonu Liu et al.'lerinin (2000) geliştirdikleri yöntemde, daha iyi sonuçlar alabilmek için bazı modifikasyonlar yaparak uygulanmıştır.

İzolatlar, Patates dekstroza agar besiyerine 3 nokta ekim yöntemiyle inoküle edilmiş, 27 ° C'de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında petriden küf miselleri toplanarak içinde 100 ml Malt Ekstrakt Broth bulunan erlenlere aktarılmış ve 27 ° C 'de 2 gün çalkalamalı koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Fungal pellet steril filtre kâğıdı kullanılarak süzölmüştür. Filtre kağıdının üzerinde toplanan tüm fungal pellet falcon tüplerine aktarılmış ve -20 ° C'de muhafaza edilmiştir.

Bir miktar fungal pelleti 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine ayrılmıştır. Üzerine 500 µl lizis solüsyonu ilave edilerek homojenize edilmiştir. Ependorflar 15 dakika boyunca 65 ° C'lik su banyosunda inkübe edildikten sonra üzerine 150 µl 5M potasyum çözeltisi eklenerek, vortekslenmiştir. Sonra ependorf tüpleri 12.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant (500 µl), steril bir ependorf tüpüne alınarak üzerine eşit hacimde (500 µl) izopropanol ilave edilerek tekrar 12.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp çökelti üzerine %70'lik etanol ilave edilerek etanol presipitasyonu yapılmıştır. Sonra 12.000 rpm'de santrifüj edilip, sonrasında etanol dökülerek tamamen havada kurumaya bırakılmıştır. Etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra, DNA pelleti üzerine 50 µl ultra saf su eklenerek sulandırılmıştır. Total genomik DNA -20 ° C 'de muhafaza edilmiştir (Liu et al., 2000).

Toplam DNA'ların Görüntülenmesi ve Saflık Kontrolü:

Total DNA'ların bütünlükleri agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir. Tüm DNA örnekleri TBE tamponu ile hazırlanmış %1' lik agaroz jelde yürütölmüştür. DNA' yi boyama amacı ile agaroz jel hazırlanırken içerisine 1 µl

10000XGelRed (BIOTIUM) nükleik asit boyası katılmıştır. 5 µl DNA solüsyonu, 1 µl yükleme tomponu ile karıştırılarak kuyucuklara aktarılmıştır. Elektroforez 90V'da 1 saat devam ettirilmiştir.

***Rhizopus sp.*'lerin PCR ile Tanısı**

Moleküler identifikasyon için ITS bölgesi (Transkribe Edilen İç Ara Bölgeler; Internal Transcribed Spacer) gen bölgesi hedef olarak kullanılmıştır. Nükleer DNA'nın ITS1-5.8-ITS2 bölgesi (ITS), ITS1 ve ITS4 primerleri ile amplifiye edilmiştir (Samson et al., 2014).

ITS PCR

ITS PCR Reaksiyon Karışımı:

PCR için gerekli bileşenler tablo 1' de belirtildiği şekilde reaksiyon tüpüne konulmuştur.

Tablo 3.10. ITS-PCR için reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Bileşik	Miktar
Distile su	34.6 µl
PCR reaksiyon tamponu	5 µl (10x)
Mg ₂ Cl	4 µl (4mM)
dNTP mix	1 µl
Primer ITS1	2 µl (10 pmol/µl)
Primer ITS4	2 µl (10 pmol/µl)
Taq DNA polimeraz	0,40 µl (2 U)

Kalip DNA	1 µl (40-50 µg/ml)
-----------	--------------------

ITS-PCR Reaksiyon Profili

Tablo 3.11. ITS PCR amplifikasyon koşulları

İŞLEM	DÖNGÜ	SÜRE	SICAKLIK
Başlangıç	1	3 dk	94°C
Denatürasyon	35	1 dk	94°C
Annealing		1 dk	60°C
Elongasyon		1 dk	72°C
Son uzama	1	5 dk	72°C
Soğutma	-	∞	4°C

PCR Ürünlerinin Elektrofrez

PCR ürünlerinin elektrofrezinde Consort marka 13x15cm boyutlarında bir cihaz kullanılmıştır. Tampon olarak TBE kullanılmış ve elektrofrez %1,6'lık agaroz jelde gerçekleştirilmiştir. Elektrofrez, 90V'da 1 saat devam etmiştir. Jel hazırlanırken içerisine 1,2 ul 10000XgelRed (BIOTIUM) boyası katılmıştır.

Elektrofrez için 5 µl PCR ürünü ve 1 µl jel yükleme tamponu karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiş, her elektrofrez işleminde 100 bp'lik DNA markerı (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır.

DNA Dizi Analizi

Çalışmamızda amplifiye edilmiş ITS bölgesi baz sırası tayini için hizmet alımı gerçekleştirilmiş ve PCR ürünleri Medsantek Laboratuvar Malzemeleri Sanayi ve

Ticaret Ltd. Şti'ye gönderilmiştir. Elde edilen veriler Finch Tv (Blast) ve Ap E programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Tür tayini araştırmacıların kullanımına açık olan Gen Bankası'nın <http://www.ncbi.nlm.gov/blast/Blast.cgi> web sayfasında, nükleotid dizilerini kıyaslanarak benzerliklerin incelenmesi ile yapılmıştır.

3.2.7. *Rhizopus oryzae* suşlarının Fermentasyon kapasitesinin Araştırılması

3.2.7.1. *Rhizopus oryzae* suşlarının ticari yemi fermentasyon kapasitesinin araştırılması

Probiyotik potansiyeli yüksek *Rhizopus* izolatlarının fermentatif kapasitesini test etmek için kuru pelet şeklinde satılan ve yaygın olarak tüketilen bir TY (Özlem Yem markası) kullanıldı. Fermentasyon Sugiharto et al.'ne (2015) göre yapıldı. Homojen fermentasyon ve analizlerin daha sağlıklı yapılabilmesi için, ticari yem öğütülerek toz haline getirildi. 200 g TY 1 litrelik cam kavanozlara konuldu ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı ve soğumaya bırakıldı. *Rhizopus* suşları PDA üzerinde yeniden kültürlendi ve 48 saat 37 °C'de inkübe edildi, ardından miseller bir spatüle yardımıyla PDA içermeyecek şekilde kazındı ve 200 ml steril damıtılmış su içinde seyreltildi (inokulum 4×10^8 KOB/ml içerir). Her bir suş süspansiyonu (200 ml), 200 g TY üzerinde aşılandı, ardından TY ve aşı karıştırılarak, 4 gün boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Karışım 2 günde bir iyice karıştırılmış ve ikinci ve dördüncü günlerde analizler için numuneler alınmıştır.

3.2.7.2 *Rhizopus oryzae* suşlarının Zeytin posasını fermentasyon kapasitesinin araştırılması

ZP, bir zeytinyağı fabrikasından, zeytinyağı üretim sürecinin son atık yan ürünü olarak ıslak biçimde elde edildi. 72 saat güneşte kurutuldu (Christodoulou ve diğerleri, 2007) (kuru madde içeriği yaklaşık %87,5) ve daha sonra homojen fermentasyon sağlamak için toz formuna öğütüldü. Herhangi bir kontaminasyondan kurtulmak için ZP, 200 g içeren 1 L'lik cam kavanozlarda 121°C'de 15 dakika otoklavlandı ve ardından soğumaya bırakıldı.

Katı hal fermentasyonu (%50 nem içeriği), Sugiharto et al.'a (2015) göre yapıldı. Üç *R. oryzae* suşu süspansiyonunun (200 ml) her biri 200 g ZP üzerinde aşılandı, ardından ZP ve aşı karışımı oda sıcaklığında 14 gün süreyle inkübe edildi. Her 2 günde bir karışım iyice karıştırılmış, kimyasal ve biyolojik analizler için 7. ve 14. günlerde numuneler alınmıştır.

3.2.7.3. *Rhizopus oryzae* suşlarının Fermente zeytin posası ile desteklenen ticari yemi fermentasyon kapasitesinin araştırılması

Üç farklı *R. oryzae* suşunun zeytin posasını fermentasyon kapasiteleri araştırılmış ve en iyi sonucu 284 kodlu suşun verdiği belirlenmiştir. Bu suş ve zeytin posasının fermentasyonundan elde edilmiş fermente zeytin posası farklı oranlarda ticari yemin içerisine eklenmiş ve yemin analizi tekrar yapılmıştır. Bunun için fermente edilmiş zeytin posası 0, 40, 60 ve 80 g toz halinde öğütüldükten ve 1 L'lik kavanozlarda otoklavlandıktan sonra sırasıyla 200, 160, 140 ve 120 g ticari yeme (Özlem yem) ekleyerek %0 (kontrol), %20, %30 ve %40'lık karışımlar elde edilmiştir. Her bir yem örneği 3 tekrar analiz edilmiştir.

3.2.7.4. Biyolojik analizler

FZP ile takviye edilmiş TY, ZP ve TY'nin fermentasyonundan sonra fungal büyümenin değerlendirilmesi için, her numuneden 10 g 100 ml pepton çözeltilisine ilave edildi, ardından pepton çözeltilisi içinde seri seyreltmeler yapıldı, ardından MEB üzerinde aşılama ve 37 °C'de 48 saat inkübasyon yapıldı. Sonra numune süzüldü, yıkandı ve kuru ağırlık değerlendirmesi için kurutuldu ve ardından fermentasyondan önceki kuru ağırlık ile karşılaştırıldı. Testler üç paralel halinde yapılmıştır.

3.2.7.5 Kimyasal analizler

Tüm numuneler (TY, 92/1 izolat ile FTY, 236/2 izolat ile FTY, 284 izolat ile FTY, ZP, 92/1 izolat ile FZP, 236/2 izolat ile FZP, 284 izolat ile FZP, TY + %20 284 izolat ile FZP, TY + %30 284 izolat ile FZP, ve TY + %40 284 izolat ile FZP) kimyasal analizler için Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zoo-Teknoloji

Yem Analiz Laboratuvarına gönderildi. Yapılan analizler kuru madde, ham protein, ham kül, ham yağ, ham lif, şeker ve nişasta testleridir. Analizler üç paralelli olarak yapılmıştır. Metabolize edilebilir enerji (ME) Kcal/Kg seviyeleri, Carpenter ve Clegg (Karayağız ve Bülbül 2015) tarafından kullanılan denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$ME = 38 * [(Ham\ protein) + (2,25 * Ham\ yağ) + (1,05 * Şeker) + (1,1 * Nişasta)] + 53$$

Fermentasyonun yem kalitesi üzerindeki etkisini göstermek için yem bileşenlerindeki azalma/artış aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\%değişiklik = [(F - U) / F] \times 100$$

Burada F, fermantasyondan sonraki bileşen değeridir (veya takviye deneyinde ilave edildikten sonra) ve U, fermantasyondan önceki bileşen değeridir (veya takviye deneyinde ilave edilmeden önce). Değişim yüzdesi pozitif ise artış, negatif ise düşüş olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

3.2.8. İstatistiksel analizler

Antimikrobiyal aktivite deneylerinde ve inhibisyon bölgeleri ortalamalarının ve yem analiz sonuçlarında ortalamaların standart sapması (SEM) hesaplanmıştır. Gastrointestinal tolerans ön deneyleri için istatistiksel analiz yapılmamıştır.

Bağımlı değişkenler olarak pH 2 ve %2 BS'de *Rhizopus* izolatlarının simüle edilmiş mide suyuna karşı gastrointestinal toleransını değerlendirmek için GraphPad Prism programı kullanılmıştır, bağımsız değişkenler olarak 4 ve 8 saatlik maruziyetten sonra, organizmanın hayatta kalması üzerindeki etkisini araştırmak için İki Yönlü ANOVA testi kullanılmıştır.

Antioksidan yeteneği anlamak için 10 *Rhizopus* özütünün IC₅₀'sini pozitif kontrolün IC₅₀'sini, standart askorbik asit ile karşılaştırmak için tek yönlü ANOVA testi kullanıldı. Daha sonra, hoc testi çalıştırıldı.

Rhizopus izolatlarının fermentatif kapasitesini araştırmak için İki Yönlü ANOVA testi, TY'nin fermantasyonu öncesine kıyasla 2 ve 4 günlük, ZP'nin fermantasyonu öncesine kıyasla 7 ve 14 günlük fermentasyondan sonra ve FZP ile TY ilavesinden önce ve sonra fungal kuru ağırlık ve yem bileşenindeki değişiklikleri ve yemdeki değişikliklerinin ortalama değerlerini karşılaştırmaya araştırmak için kullanılmıştır.

Tüm ANOVA testlerinde, tekrar sayısı üç ($n = 3$), ortalamalar ve ortalamaların standart sapması (SEM) hesaplandı, veri normalliği ve varyans eşitliği sağlandı ve farklılıklar $p < 0,05$ 'te anlamlı kabul edilmiştir.



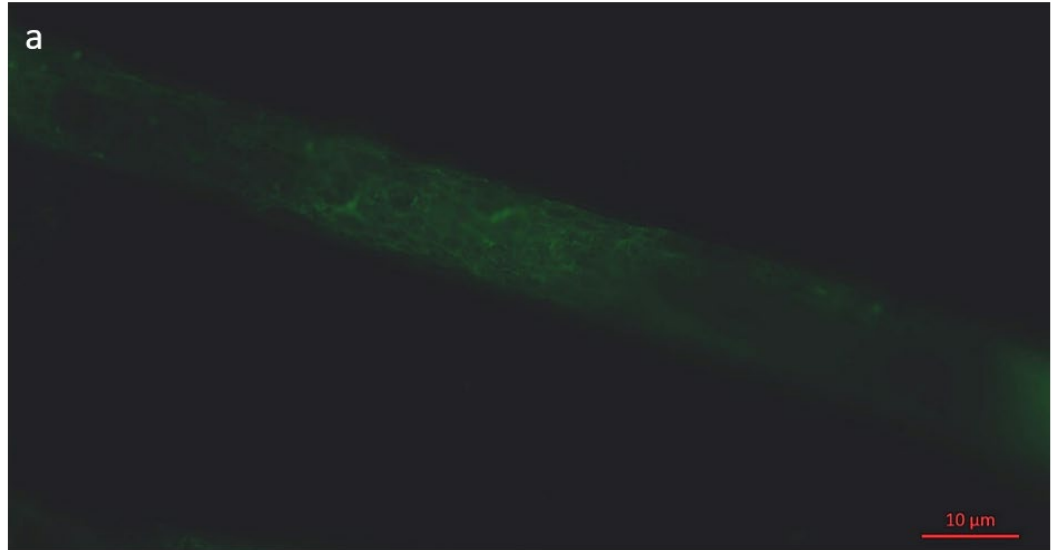
4. Bulgular

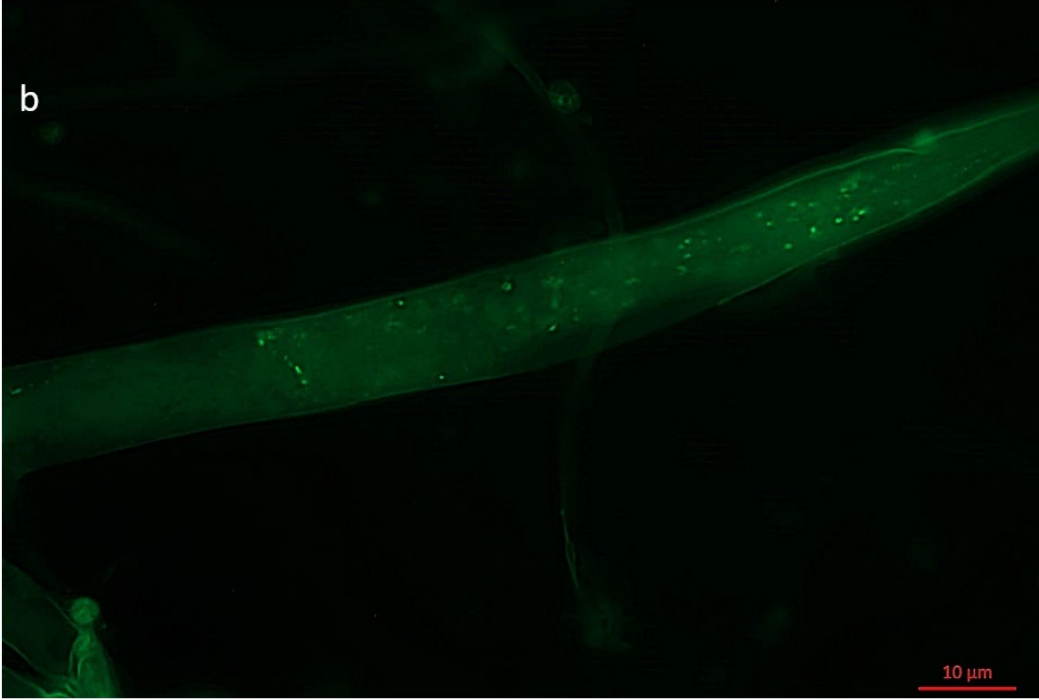
4.1 Fungus izolasyonu

Piyasada satışı sunulan ve tavuk beslenmesinde kullanılan 7 farklı yemden ve İzmir/Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden alınan 4 farklı yaş tavuk dışkılarından *Rhizopus* spp. izolasyonu yapılmıştır. Petride çok hızlı gelişen, steril uzun hifleri/stolonları oluşturan, sporangiumları nedeniyle siyah noktalar olarak ortaya çıkan ve koyu renkli sporangioforlara sahip koloniler izole edilmiştir ve saflaştırılmıştır.

4.2 Floresan mikroskobu

Daha önceki projeler kapsamında izole edilen tüm *Rhizopus* izolatının endofungal bakteri içerip içermedikleri yönünden incelenmiştir. Bu çalışma için hazır yemlerden ve tavuk dışkılarından izole edilen yeni *Rhizopus* izolatları için de ayrıca endofungal bakteri yönünden tarama yapılmıştır. Endofungal bakteri içermeyen suşlar çalışmaya dahil edilmiştir. 82 adet daha önceki çalışmalar nedeni ile elimizde bulunan, 9 adet farklı yem örneklerinden ve 3 adet tavuk dışkılarından izole edilen olmak üzere 94 adet *Rhizopus* izolatı çalışmaya dahil edilmiştir.

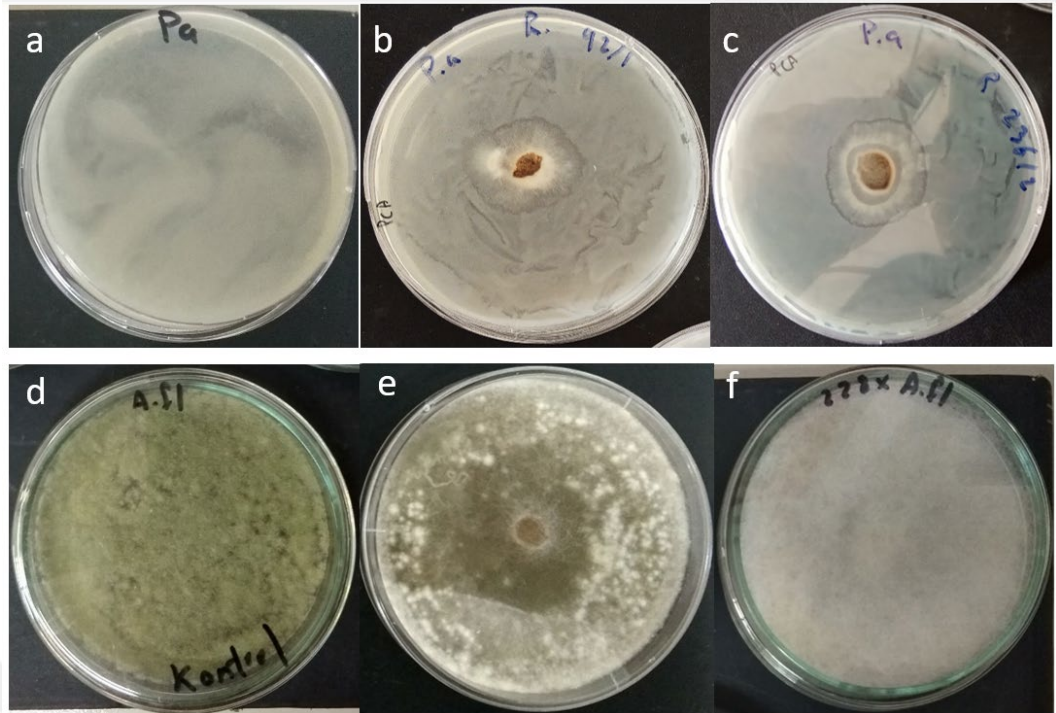




Şekil 0.1. Zeiss Axio Z1 floresan mikroskobu altında (eksitasyon 500 nm), **a.** Endofungal bakteri içermeyen ve **b.** Yeşil floresan lekeler olarak görünen kokobasil şeklinde endofungal bakterileri içeren bir *Rhizopus* izolatının miselyumu.

4.3. Antimikrobiyal Aktivite Testi

94 *Rhizopus* izolatının antimikrobiyal aktivite analizinin sonuçları (inhibisyon zon çaplarının ortalamaları ve SEM'i (Ortalamaların standart sapması) tablo 4.1'te gösterilmektedir. 94 *Rhizopus* izolatından 66 tanesi sadece antibakteriyel 26 tanesi sadece antifungal aktiviteye sahip bulunmuştur. Bununla birlikte, test edilen 94 izolatın 10'u en az bir bakteri, bir maya veya bir filamentli fungusu karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip bulunmuştur (tablo 4.2 ve şekil 4.2). Bu izolatlar 32, 43/1, 61, 86, 92/1, 103, 123, 228, 236/2 ve 284' kodlu izolatlardır. Hepsi daha önceki projede sırasında izole edilmiş izolatlardır. Tavuk dışkısı ve tavuk yeminden izole edilen izolatlarda hem antibakteriyel hem antifungal (geniş spektrum) antimikrobiyal aktivite saptanamamıştır.



Şekil 0.2 a. *P. aeruginosa* ekilmiş petri (kontrol amacı ile kullanılmıştır) b. *P. aeruginosa*'ya karşı inhibisyon zonu gösteren 92/1 kodlu *Rhizopus* izolatının antibakteriyel aktivitesi. c. *P. aeruginosa*'ya karşı bir inhibisyon zonu gösteren 236/2 kodlu *Rhizopus* izolatının antibakteriyel aktivitesi. d. *A. flavus* ekilmiş petri (kontrol amacı ile kullanılmıştır). e. *A. flavus*'a karşı 32 kodlu *Rhizopus* izolatının antifungal aktivitesini gösteren inhibisyon zonu. f. Tüm petride büyüyen ve *A. flavus*'un büyümesini tamamen engelleyen 228 kodlu *Rhizopus* izolatının antifungal aktivitesi.

- 32 kodlu suş, 3 bakteriye (*B. cereus*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa*) karşı antibakteriyel aktivite, 1 mayaya (*C. parapsilosis*) karşı ve 2 filamentli fungusa (*A. fumigatus* ve *A. flavus*) karşı antifungal aktivite göstermiştir.
- 43/1 kodlu suş, 2 bakteriye (*B. cereus* ve *S. aureus*) karşı antibakteriyel aktivite, 1 mayaya (*C. parapsilosis*) karşı ve 2 filamentli fungusa (*A. fumigatus* ve *A. flavus*) karşı antifungal aktivite göstermiştir. 61 kodlu suş, 2 bakteriye (*B. cereus* ve *P. aeruginosa*) karşı antibakteriyel aktivite, 3 mayaya karşı (*C. albicans*, *C. krusei* ve *C. tropicalis*) ve 2 filamentli fungusa (*A. fumigatus* ve *A. flavus*) karşı antifungal aktivite göstermiştir.
- 86 kodlu suş, 3 bakteriye (*B. cereus*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa*) karşı antibakteriyel aktivite, 3 mayaya (*C. albicans*, *C. krusei* ve *C. tropicalis*) karşı ve 2 filamentli fungusa (*A. fumigatus* ve *A. flavus*) karşı antifungal aktivite göstermiştir.

- 92/1 kodlu suş, 3 bakteriye (*B. cereus*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa*) karşı antibakteriyel aktivite, 1 mayaya (*C. albicans*) karşı ve 2 filamentli fungusu (*A. fumigatus* ve *A. flavus*) karşı antifungal aktivite göstermiştir.
- 103 kodlu suş, 3 bakteriye (*B. cereus*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa*) karşı antibakteriyel aktivite, 2 mayaya (*C. albicans* ve *C. tropicalis*) karşı ve 2 filamentli fungusu (*A. fumigatus* ve *A. flavus*) karşı antifungal aktivite göstermiştir.
- 123 kodlu suş, 2 bakteriye (*S. aureus* ve *P. aeruginosa*) karşı antibakteriyel aktivite, 3 mayaya (*C. albicans*, *C. krusei* ve *C. parapsilosis*) karşı ve 1 filamentli fungusu (*A. flavus*) karşı antifungal aktivite göstermiştir.
- 228 kodlu suş, 2 bakteriye (*S. aureus* ve *P. aeruginosa*) karşı antibakteriyel aktivite, 4 mayaya (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*) karşı ve 2 filamentli fungusu (*A. fumigatus* ve *A. flavus*) karşı antifungal aktivite göstermiştir.
- 236/2 kodlu suş, 3 bakteriye (*B. cereus*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa*) karşı antibakteriyel aktivite, 1 mayaya (*C. parapsilosis*) karşı ve 2 filamentli fungusu (*A. fumigatus* ve *A. flavus*) karşı antifungal aktivite göstermiştir.
- 284 kodlu suş 4 bakteriye (*B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa*) karşı antibakteriyel aktivite, 2 mayaya (*C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*) karşı ve 2 filamentli fungusu (*A. fumigatus* ve *A. flavus*) karşı antifungal etkinlik göstermiştir.

Tablo 0.1. 10 *Rhizopus* izolatının 4 bakteri, 4 maya ve 2 küfe karşı antimikrobiyal aktivitesi, inhibisyon zon çapları

<i>Rhizopus</i> kodu	Test Edilen Bakterilere Karşı Antimikrobiyal Aktivite Testleri				Test Edilen Mayalara Karşı Antimikrobiyal Aktivite Testleri				Test Edilen Filamentli Funguslara Karşı Antimikrobiyal Aktivite Testleri	
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
17	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)
29/2	0(±0,00)	0(±0,00)	4.13(±0,06)	3,30(±0,26)	1,93(±0,06)	0(±0,00)	0(±0,00)	1,7(±0,10)	0(±0,00)	0(±0,00)
32	1,80(±0,10)	0(±0,00)	2,43(±0,15)	2,97(±0,21)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	1,6(±0,10)	3,5(±0,10)	3,4(±0,36)
34	0(±0,00)	0(±0,00)	1,83(±0,25)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)
36	0(±0,00)	0(±0,00)	4,07(±0,12)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)
41	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)
43/1	1,63(±0,15)	0(±0,00)	0(±0,00)	3,33(±0,15)	0(±0,00)	0(±0,00)	1,6(±0,10)	1,7(±0,10)	3,73(±0,38)	2,97(±0,15)
49/1	0(±0,00)	0(±0,00)	1,73(±0,06)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)
55	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)
57/1	0(±0,00)	0(±0,00)	3,70(±0,10)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)
58	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)
59/1	0(±0,00)	0(±0,00)	2,03(±0,58)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)	0(±0,00)
61	1,20(±0,00)	0(±0,00)	3,60(±0,10)	0(±0,00)	1,93(±0,12)	2,1(±0,10)	2,1(±0,21)	0(±0,00)	TP(±0,00)	TP(±0,00)

63	2.17(±0.21)	0(±0.00)	1.73(±0.06)	1.77(±0.15)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)
64	1.20(±0.00)	0(±0.00)	3.70(±0.10)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)
67	0(±0.00)	0(±0.00)	4.67(±0.29)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)
74	0(±0.00)	0(±0.00)	3.33(±0.58)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)
76	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)
76/1	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)
86	2.07(±0.12)	0(±0.00)	2.53(±0.06)	2.93(±0.15)	2.3(±0.10)	2.47(±0.10)	0(±0.00)	3.1(±0.30)	2.30(±0.36)		
92/1	1.40(±0.10)	0(±0.00)	1.70(±0.10)	2.03(±0.15)	1.4(±0.10)	0(±0.00)	0(±0.00)	6.33(±0.29)	TP(±0.00)		
100	1.27(±0.06)	0(±0.00)	2.00(±0.10)	1.90(±0.10)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)		
100/1	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)		
102	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)		
103	2.80(±0.10)	0(±0.00)	2.60(±0.10)	2.67(±0.06)	1.7(±0.14)	0(±0.00)	1.9(±0.10)	4.83(±0.29)	TP(±0.00)		
104/1	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)		
109/2	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)		
111	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	2.23(±0.15)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)		
112	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)		
120	0(±0.00)	0(±0.00)	1.63(±0.15)	2.43(±0.06)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)		
123	0(±0.00)	0(±0.00)	2.33(±0.06)	1.40(±0.00)	1.93(±0.06)	1.67(±0.06)	0(±0.00)	1.75(±0.07)	3.83(±0.76)	0(±0.00)	
124	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)		
129/1	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)		
130	0(±0.00)	0(±0.00)	1.73(±0.31)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)		
130/1	0(±0.00)	0(±0.00)	2.47(±0.50)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)	0(±0.00)		

[illegible]

±SEM: Ortalamaların standart sapması (n=3), 0: inhibisyon bölgesi yok, TP: Tam plaka inhibisyon bölgesi

Tablo 4.2. 4 bakteri, 4 maya ve 2 filamentli fungusu karşı en yüksek antimikrobiyal aktivite gösteren 10 *Rhizopus* izolatı, inhibisyon zonu çapları mm olarak ve (SEM).

<i>Rhizopus</i> suş code	32	43/1	61	86	92/1	103	123	228	236/2	284
Bacteria										
<i>Bacillus cereus</i>	1,80 (±0,10)	1,63 (±0,15)	1,20 (±0,00)	2,07 (±0,12)	1,40 (±0,10)	2,80 (±0,10)	-	-	1,45 (±0,07)	1,63 (±0,06)
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1,20 (±0,00)	1,50 (±0,26)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,43 (±0,15)	-	3,60 (±0,10)	2,53 (±0,06)	1,70 (±0,10)	2,60 (±0,10)	2,33 (±0,06)	1,40 (±0,17)	-	1,35 (±0,07)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,97 (±0,21)	3,33 (±0,15)	-	2,93 (±0,15)	2,03 (±0,15)	2,67 (±0,06)	1,40 (±0,00)	1,70 (±0,14)	1,37 (±0,06)	1,40 (±0,10)
<i>Candida albicans</i>	-	-	1,93 (±0,12)	2,30 (±0,10)	1,4 (±0,10)	1,7 (±0,14)	1,93 (±0,06)	1,55 (±0,10)	-	-
<i>Candida krusei</i>	-	-	2,1 (±0,10)	2,27 (±0,38)	-	-	1,67 (±0,06)	2,33 (±0,28)	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	1,6 (±0,10)	2,1 (±0,21)	2,47 (±0,10)	-	1,9 (±0,10)	-	1,90 (±0,26)	-	2,23 (±0,21)
<i>Candida parapsilosis</i>	1,6 (±0,10)	1,7 (±0,10)	-	-	-	-	1,75 (±0,07)	2,03 (±0,42)	2,53 (±0,12)	2,33 (±0,12)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	3,5 (±0,10)	3,73 (±0,38)	TP (±0,00)	3,1 (±0,30)	6,33 (±0,29)	4,83 (±0,29)	3,83 (±0,76)	TP (±0,00)	TP (±0,00)	TP (±0,00)
<i>Aspergillus flavus</i>	3,4 (±0,36)	2,97 (±0,15)	TP (±0,00)	2,30 (±0,36)	TP (±0,00)	TP (±0,00)	-	TP (±0,00)	TP (±0,00)	TP (±0,00)
Filamentous fungi										

±SEM: Ortalamaların standart sapması (n=3), -: inhibisyon bölgesi yok, TP: Tam plaka inhibisyon bölgesi.

4.4 Gastrointestinal koşulları tolerans saptanması

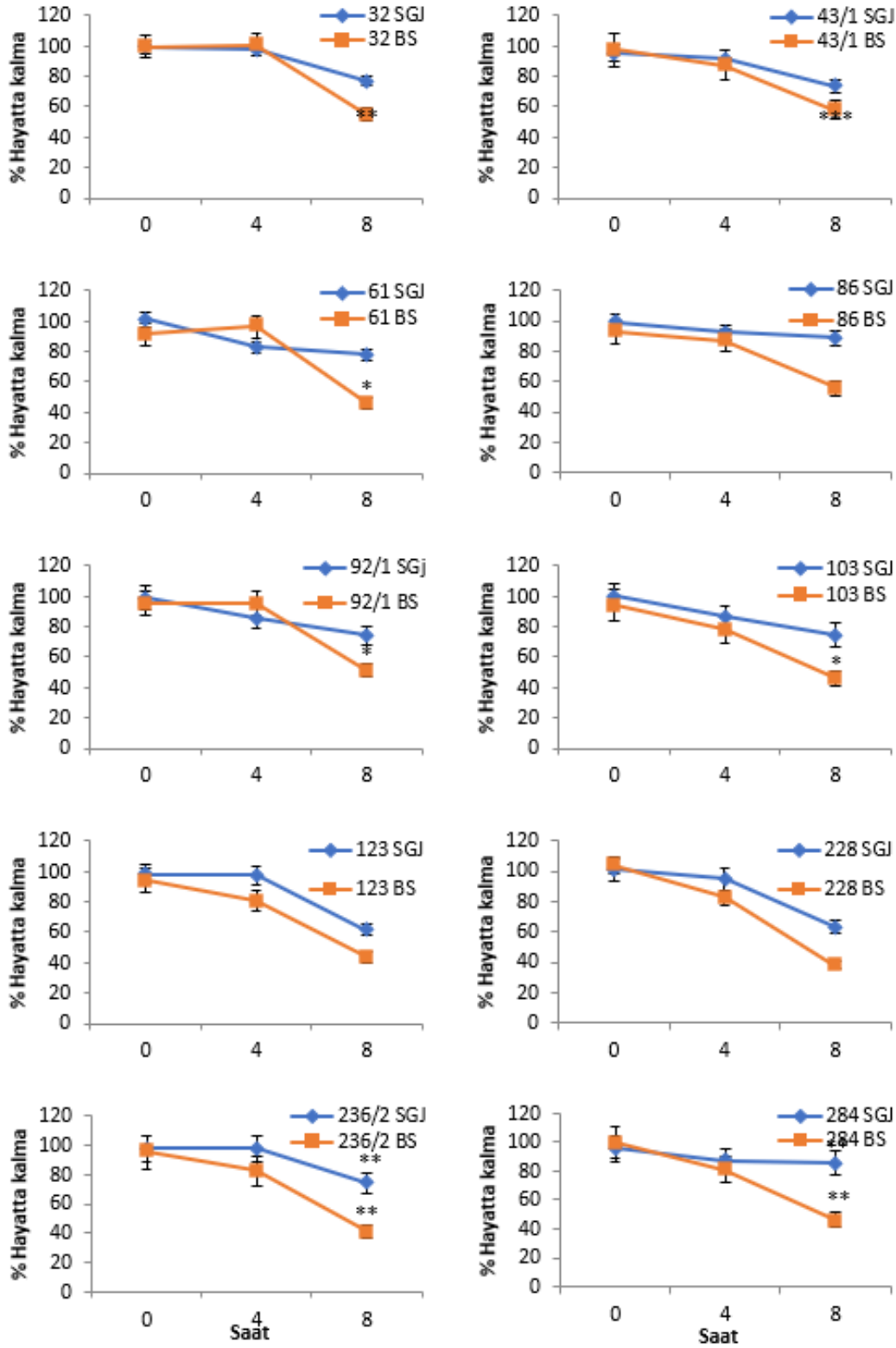
4.4.1 Ön Denemeler

Geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip 10 izolat için asit ve alkali koşulları tolerans testleri yapılmış ve asidik veya bazik bir ortamda büyütüldüklerinde ve asidik-bazik çözeltilere batırıldığında hepsi pH 3 ve pH 8'e karşı tolerans göstermiştir. 10 izolat disk difüzyon yöntemi ile %0,2, %0,4 ve %0,8 safra tuzu konsantrasyonlarına tabi tutulduklarında hiçbir inhibisyon zonu tespit edilmemiştir. Ayrıca izolatlar aynı üç konsantrasyonda 20 dakika bekletildikten sonra PDA üzerinde büyüme potansiyeline sahip oldukları gözlenmiştir. Sonuçlar tablo 4.3 verilmiştir.

Tablo 4.1. Asidite ve alkalilik ön denemelerin (inokülasyon ve maruz bırakma) kalitatif testin sonuçları

<i>Rhizopus</i> suş code	pH 3'te İnokülasyon	pH 3'te Maruz bırakma	pH 8'de İnokülasyon	pH 8'de Maruz bırakma
32	+,+,+	+,+,+	+,+,+	+,+,+
43/1	+,+,+	+,+,+	+,+,+	+,+,+
61	+,+,+	+,+,+	+,+,+	+,+,+
86	+,+,+	+,+,+	+,+,+	+,+,+
92/1	+,+,+	+,+,+	+,+,+	+,+,+
103	+,+,+	+,+,+	+,+,+	+,+,+
123	+,+,+	+,+,+	+,+,+	+,+,+
228	+,+,+	+,+,+	+,+,+	+,+,+
236/2	+,+,+	+,+,+	+,+,+	+,+,+
284	+,+,+	+,+,+	+,+,+	+,+,+

+: büyüme var.



Şekil 4.3. Simüle edilmiş mide suyu pH 2 ve safra solüsyonu %2 içinde 10 adet *R. oryzae* izolatının hayatta kalma süresi. Farklı maruz kalma sürelerinin hayatta kalma değerleri üzerine etkisi önemli ölçüde farklı bulunmuştur. Burada * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) ve *** ($p < 0,001$) temsil ediyor.

4.4.2 Kantitatif testler

Şekil 4.3., 10 *Rhizopus* izolatının 8 saat süre ile pH 2 koşullarına ve %2'lik safra solüsyonu koşullarına maruziyetin ardından hayatta kalma oranını göstermektedir. Genel olarak, pozitif kontrol (0. Saat) ile karşılaştırıldığında çoğu izolat için 4 saat sonra ihmal edilebilir bir düşüş vardı, ancak 8 saat sonra %60' a varan oranda (örneğin, %2 BS'ye maruz kalan 228 kodlu izolat) oldukça önemli bir düşüş vardı. Bununla birlikte, hiçbirisi tamamen inhibe olmadı. Bu nedenle 8 saatlik maruziyetten sonra hala tolerans görülmüştür. İstatistiksel olarak, İki Yönlü ANOVA testi ile açıkça gösterildiği gibi (tablo 4.4), hem 4. saat hem de 8. saat için SGJ'ye maruz kaldıktan sonra 10 izolatın hepsinin hayatta kalma düzeyinde önemli bir değişiklik olmadı.

Bununla birlikte, %2 BS'ye maruz kalma testlerinin sonuçlarına bakıldığında; organizmaların çoğu için (43/1 ve 86 kodlu izolatlar hariç) 8 saat sonra hayatta kalma seviyeleri ortalamalarında önemli farklılıklar göstermiştir. Özetlemek gerekirse, 10 izolatın tümü gastrointestinal sistem koşullarına toleranslı olarak bulunmuştur. Safra tuzunun etkisi tüm suşlar üzerinde simüle edilmiş mide suyuna göre daha etkilidir. Ancak yine de 8 saatlik maruziyetten sonra tamamen öldürücü değildir.

Tablo 4.2. 10 *Rhizopus* suşunun safra tuzuna ve simüle edilmiş mide suyuna maruz bırakılmadan önce ve sonraki sonuçların karşılaştırılması ile elde edilen farkı ve önemini gösteren istatistiksel analiz.

Suşlar	4 saat			8 saat		
0 saat	Fark	P değeri	Açıklam a	Fark	P değeri	Açıklam a
32 SGJ	-1,245	P > 0,05	ns	-22,28	P > 0,05	ns
32 BS	1,356	P > 0,05	ns	-44,62	P < 0,05	*
43/1 SGJ	-3,326	P > 0,05	ns	-21,75	P > 0,05	ns
43/1 BS	-10,49	P > 0,05	ns	-39,82	P > 0,05	ns
61 SGJ	-18,10	P > 0,05	ns	-23,07	P > 0,05	ns
61 BS	5,152	P > 0,05	ns	-45,37	P < 0,05	*
86 SGJ	-7,006	P > 0,05	ns	-10,70	P > 0,05	ns
86 BS	-6,175	P > 0,05	ns	-37,50	P > 0,05	ns
92/1 SGJ	-13,76	P > 0,05	ns	-24,77	P > 0,05	ns

	- 0,0474					
92/1 BS	8	P > 0,05	ns	-43,78	P < 0,05	*
103 SGJ	-14,12	P > 0,05	ns	-26,16	P > 0,05	ns
103 BS	-16,26	P > 0,05	ns	-48,39	P < 0,05	*
123 SGJ	-1,098	P > 0,05	ns	-36,80	P > 0,05	ns
123 BS	-14,27	P > 0,05	ns	-51,00	P<0,01	**
228 SGJ	-6,089	P > 0,05	ns	-37,34	P > 0,05	ns
228 BS	-21,84	P > 0,05	ns	-66,21	P<0,001	***
236/1 SGJ	0,1853	P > 0,05	ns	-23,42	P > 0,05	ns
236/1 BS	-13,03	P > 0,05	ns	-54,60	P<0,01	**
284 SGJ	-8,491	P > 0,05	ns	-10,15	P > 0,05	ns
284 BS	-18,71	P > 0,05	ns	-53,42	P<0,01	**

ns: önemi yok * ($p < 0,05$)'te önemi, ** ($p < 0,01$)'de önemi, *** ($p < 0,001$)'de önemi

4.5 Antioksidan Aktivite Tayini

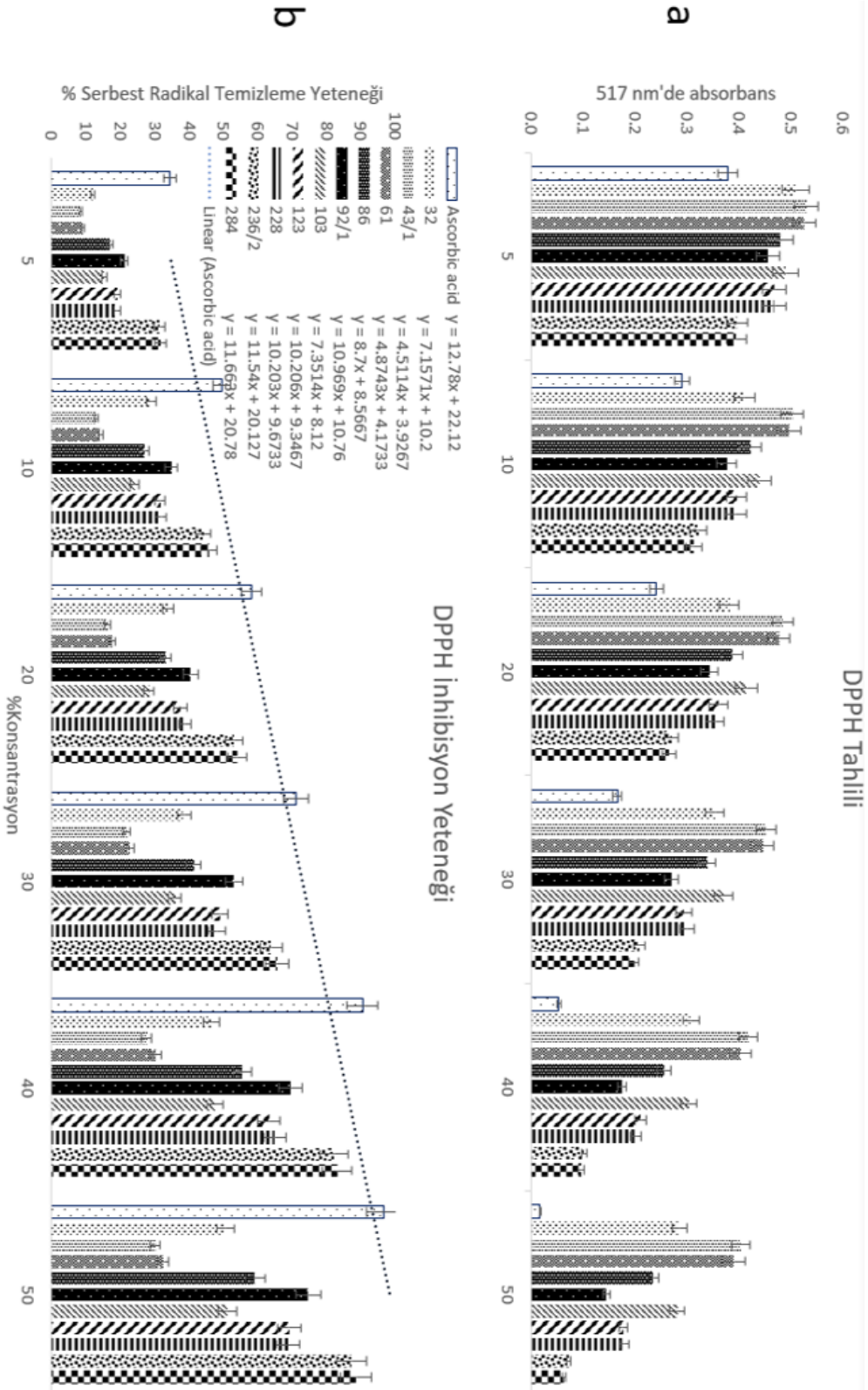
10 izolatın pozitif kontrol absorbansına kıyasla absorbansı ve serbest radikal süpürücü aktiviteyi temsil eden inhibisyon yüzdesi (IP) Şekil 4.4.'de gösterilmektedir. Beklendiği ve ilgili literatürde önceden kanıtlandığı gibi, IP ve absorbans arasındaki ilişki ters orantılıdır. İnhibisyon yüzdesi grafiğinden (Şekil 4.4), her numunenin ve pozitif numunenin %50 inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}) eğim denklemlerinden hesaplanabilir. Şekil 4.5, her numunenin askorbik aside karşı IC_{50} 'sini gösterir. Hangi izolatların yüksek antioksidan yeteneğe sahip olduğunu belirlemek için One Way ANOVA testi kullanıldı (tablo 4.5). Burada IC_{50} , pozitif kontrol askorbik asit IC_{50} 'ye daha yakın olduğu için izolatın daha yüksek bir antioksidan yeteneği vardır şeklinde yorum yapılır. Sentetik pozitif kontrol askorbik asit ($IC_{50} = 21,82$) ile karşılaştırıldığında, %95'lik anlamlı düzeyde ($p < 0,05$) test çalışması, hem 236/2 hem de 284 izolatın ortalamalarının askorbik asit (non-significant) ortalamasından farklı olmadığını göstermiştir, bu nedenle bu izolatlar çok yüksek antioksidan yeteneğe sahip şeklinde yorumlanmıştır (sırasıyla 25,89 ve 25,06). Kalan 8 izolat için, istatistiksel olarak, test, sıfır hipotezini reddetmek için yeterli kanıt olduğunu kanıtladı (örneklerin ortalamaları eşittir). Yani bu 8 izolat için askorbik aside karşı antioksidan

yeteneklerin nispeten düşük olduğu anlamına gelir. Bununla birlikte, Şekil 4.5'te açıkça gösterildiği gibi 92/1 kodlu izolat da nispeten yüksek aktiviteye sahiptir (35,8) ve beş izolat orta aktiviteye sahiptir (228, 123, 86, 32 ve 103 kodlu izolat; 39,54, 39,86, 47,63, 55,61 ve 56,97) ve iki izolat düşük antioksidan aktiviteye sahiptir (sırasıyla 61 ve 43/1 kodlu izolatlar; 94,02 ve 102,14). Böylece en yüksek antioksidan aktiviteye sahip izolatların (azalan sırada) 284, 236/2 ve 92/1 olduğu sonucuna varabiliriz.

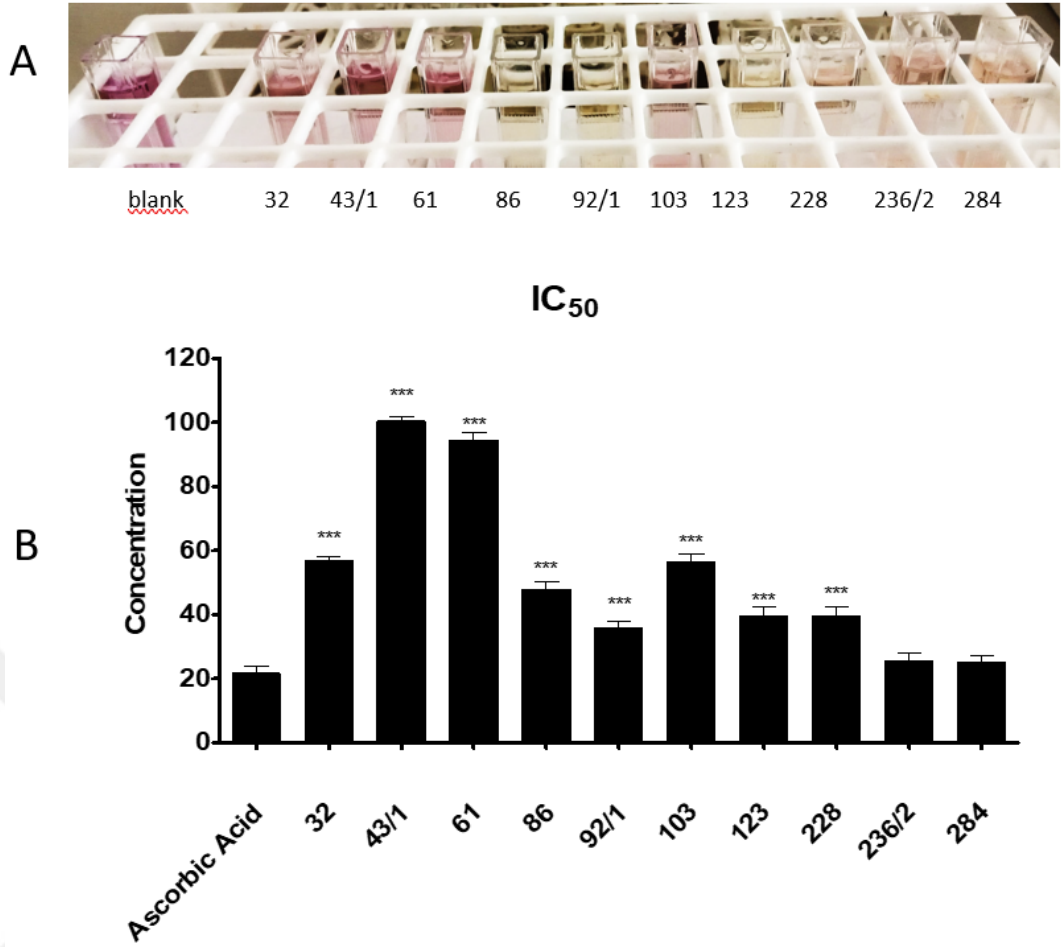
Tablo 0.3. 10 *Rhizopus* suşunun IC₅₀'sini Askorbik Asit kontrolü ile karşılaştırmanın farkını ve önemini gösteren istatistiksel analiz.

Suşlar	IC ₅₀ değeri	Askorbik Asit ile fark		
		Fark	P değeri	Açıklama
Askorbik Asit	21,815			
32	55,61	-35,16	P < 0,05	***
43/1	102,137	-78,74	P < 0,05	***
61	94,023	-72,83	P < 0,05	***
86	47,625	-26,26	P < 0,05	***
92/1	35,8	-14,04	P < 0,05	**
103	56,97	-34,90	P < 0,05	***
123	39,86	-17,84	P < 0,05	***
228	39,54	-17,99	P < 0,05	***
236/2	25,89	-3,835	P > 0,05	ns
284	25,06	-3,461	P > 0,05	ns

ns: önemi yok * ($p < 0,05$)'te önemi, ** ($p < 0,01$)'de önemi, *** ($p < 0,001$)'de önemi



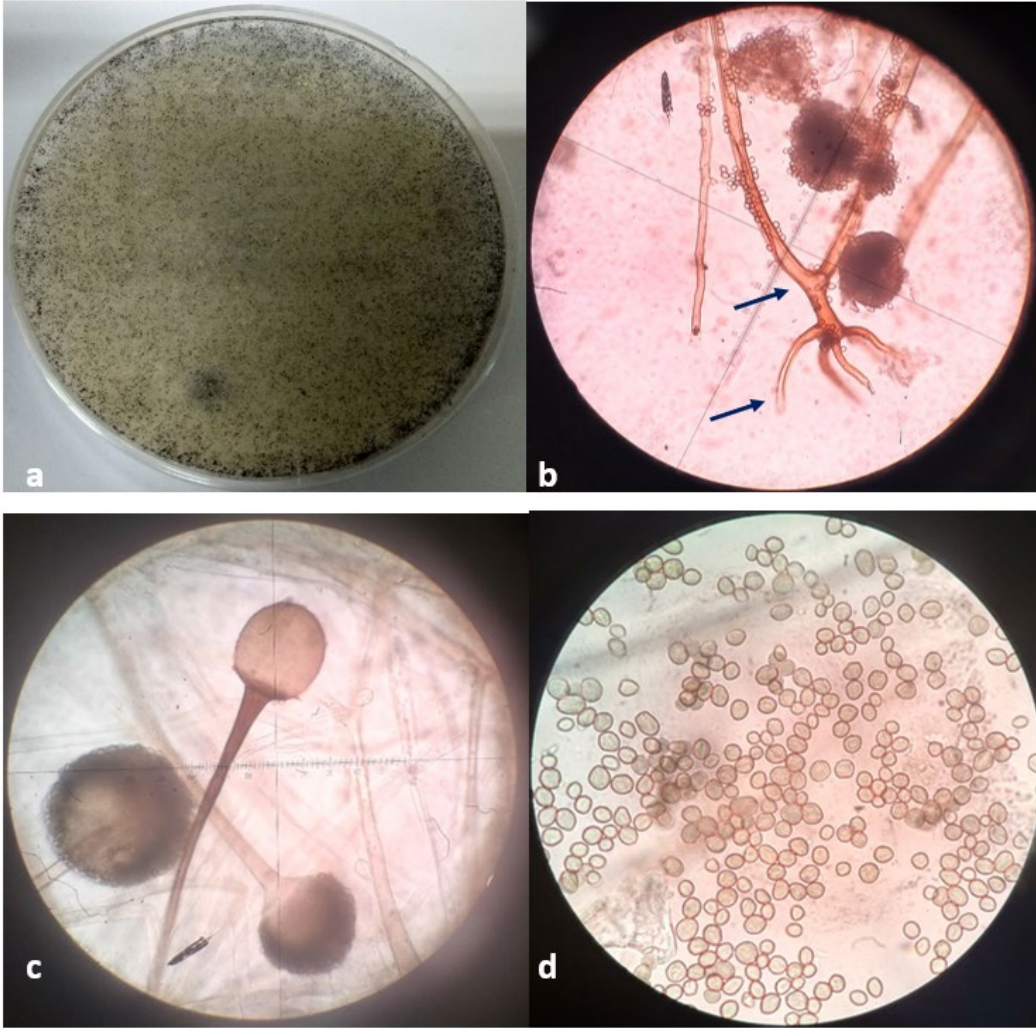
Şekil 4.4. DPPH testinde farklı konsantrasyonlarda Pozitif kontrol (Askorbik asit) ve 10 adet *R. oryzae* ekstrakt numunelerinin **a.** Absorbans değerlerinin ve **b.** serbest radikal temizleme yeteneğinin karşılaştırılması ve IC_{50} 'yi hesaplamak için kullanılan eğim denklemleri gösterilmektedir.



Şekil 4.4. A: DPPH (fungal ekstrakt + metanol + DPPH) ve negatif kontrol körü (metanol + DPPH) eklendikten sonra 10 tane *R. oryzae* izolat ekstraktların %50 konsantrasyonları. Daha güçlü antioksidan aktiviteye sahip numuneler daha fazla renk giderme gösterir. **B:** 10 tane *R. oryzae* izolatının IC₅₀'si ve pozitif kontrol (askorbik asit), ($p < 0,05$)'te değerler anlamlı kabul edildi.

4.6 Fenotipik ve Genotipik Tanımlama

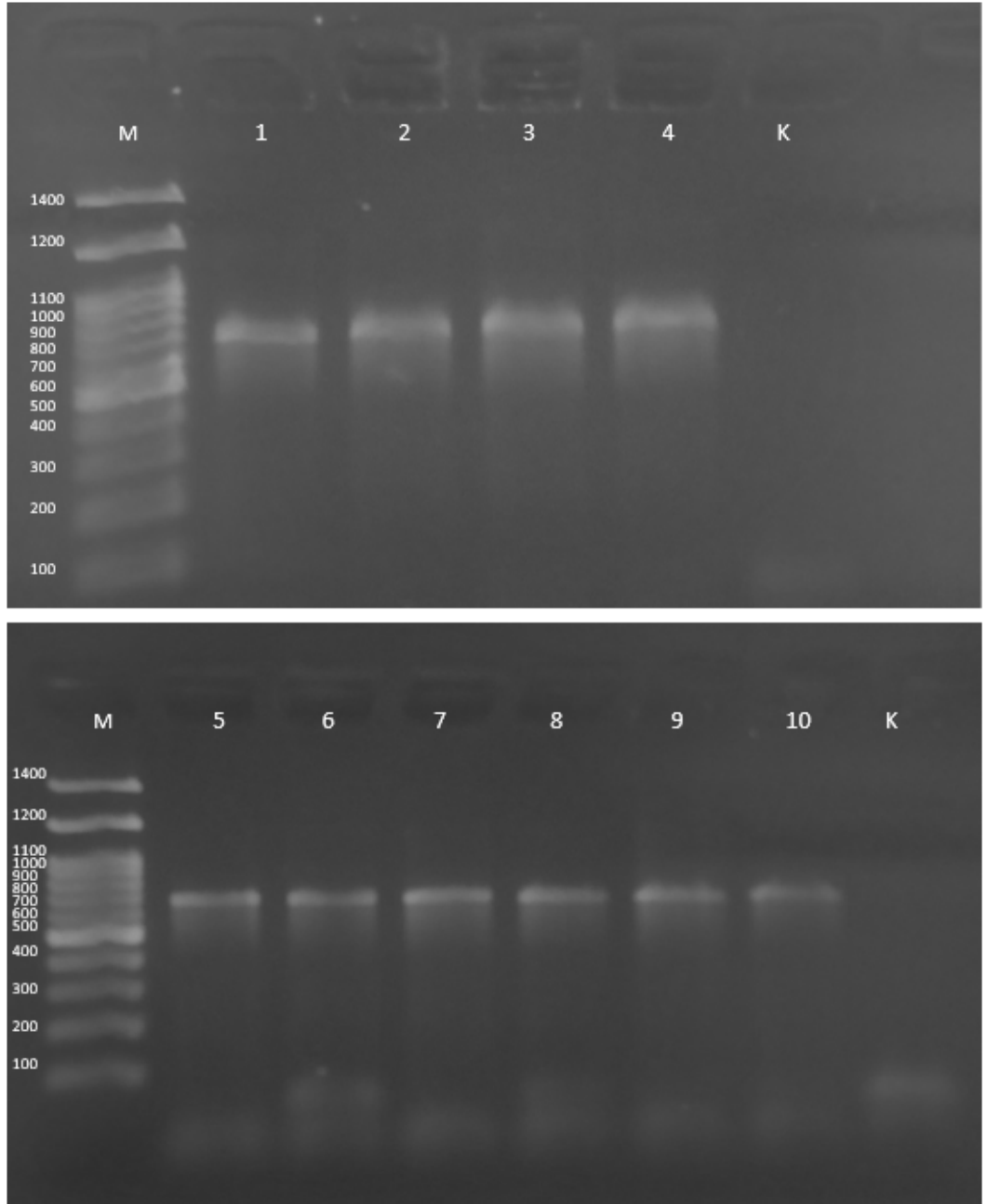
Şekil 4.6, 284 kodlu izolatın makroskobik ve mikroskobik özelliklerini göstermektedir. Geniş spektrumlu antimikrobiyal yeteneğe sahip 10 izolatın ITS PCR ürünlerinin jel görüntüsü Şekil 4.7'de verilmiştir. ITS dizilerinin NCBI gen bankası ile karşılaştırılması üzerine 10 izolatın *R. oryzae* türü olduğu kanıtlanmıştır. NCBI erişim numarası ve izolasyon kaynakları Tablo 4.7'te görülmektedir.



Şekil 4.5. a. 7 gün, 25°C'de MEA üzerinde büyütülen 284 kodlu *Rhizopus* izolatin petri görüntüsü b. 400x büyütmede rhizoid şekli ve sporangioforlarının dallanması, c. 400x büyütmede sporangiumun şekli, d. 1000x büyütme altında sporangiosporlarının şekli.

Tablo 0.4. Moleküler olarak tanılanan *Rhizopus* spp.'lerin DNA dizi analizi sonuçları

Suş Kodu	Gene Bank Accession numarası	Homoloji	Sekans Sonucu	İzolasyon Kaynağı
32	MZ067002	99%	<i>Rhizopus oryzae</i>	Elma toprağı
43/1	MW785818	100%	<i>Rhizopus oryzae</i>	Pamuk toprağı
61	MZ067005	100%	<i>Rhizopus oryzae</i>	Mısır toprağı
86	MW785819	99%	<i>Rhizopus oryzae</i>	Patates toprağı
92/1	MW785828	100%	<i>Rhizopus oryzae</i>	Şeftalı toprağı
103	MW785831	100%	<i>Rhizopus oryzae</i>	Kiraz toprağı
123	MW785832	98%	<i>Rhizopus oryzae</i>	Manadalina toprağı
228	MW785833	100%	<i>Rhizopus oryzae</i>	Soğan toprağı
236/2	MW785834	100%	<i>Rhizopus oryzae</i>	Domates toprağı
284	MW785835	100%	<i>Rhizopus oryzae</i>	Biber toprağı



Şekil 0.6. 10 adet *Rhizopus* izolatının ITS1–5,8S–ITS2 PCR sonucu elde edilen ürünlerin jel görüntüsü. M: Molekül ağırlığı standardı K: Negatif kontrol, 1:43/1, 2:92/1, 3:103, 4: 236/2 5:32, 6:61, 7:86, 8:123, 9:228, ve 10:284.

4.7. *Rhizopus oryzae* suşlarının Fermentasyon kapasitesinin Araştırılması

4.7.1 *Rhizopus oryzae* suşlarının ticari yemi fermentasyon kapasitesinin araştırılması

Tablo 4.7, 2 ve 4 günlük fermentasyondan sonra TY üzerinde büyüyen 92/1, 236/2 ve 284 *Rhizopus* izolatlarının kuru ağırlıklarını göstermektedir.

Fermentasyon sonucu elde edilen veriler fermente edilmemiş ticari yem UTY (kontrol) ile karşılaştırıldığında, fungus kuru ağırlığı 2 gün sonra artmıştır (92/1 ve 236/2 izolatları için önemli bir fark yoktu, ancak 284 izolat için önemli bir fark vardı) ve 4 gün sonra dramatik bir artış göstermiştir. Tablo 4.8'de gösterildiği gibi, kullanılan 3 test organizması için ($p < 0,05$)'de oldukça anlamlı olan) 4 günlük fermentasyondan sonra, *Rhizopus* fungal büyümesi fermentasyon kavanozlarında çıplak gözle bile açıkça görülmüştür.

Tablo 0.5. Ticari yemin fermentasyonundan önce ve sonra test *Rhizopus* izolatlarının kuru maddeleri.

İzolat Kodu	İnkübasyon Günleri	Fungal Kuru Madde (g/10 g)
92/1	0	0,2245 ($\pm 0,0156$)
92/2	2	0,3785 ($\pm 0,0204$)
92/3	4	0,7502 ($\pm 0,0268$) ***
236/2	0	0,2698 ($\pm 0,0114$)
236/3	2	0,4028 ($\pm 0,0189$)
236/4	4	0,6983 ($\pm 0,0227$) **
284	0	0,2108 ($\pm 0,0105$)
284	2	0,3967 ($\pm 0,0197$) *
284	4	0,7425 ($\pm 0,0264$) ***

$\pm$ SEM: Ortalamaların standart hatası (n=3)

* ($p < 0,05$)'te önemi, ** ($p < 0,01$)'de önemi, *** ($p < 0,001$)'de önemi

Tablo 0.6. Fermentasyondan önce ve sonra ticari yemin (TY) kuru madde içeriği karşılaştırılmıştır. Farkı ve önemi gösteren istatistiksel analiz.

Suşlar	2 gün fermentasyon			4 gün fermentasyon		
TY	Fark	P değeri	Açıklama	Fark	P değeri	Açıklama
92/1	0,1540	$P > 0,05$	ns	0,5257	$P < 0,001$	***
236/2	0,1330	$P > 0,05$	ns	0,4285	$P < 0,01$	**
284	0,1859	$P < 0,05$	*	0,5317	$P < 0,001$	***

ns: önemi yok * ($p < 0,05$)'te önemi, ** ($p < 0,01$)'de önemi, *** ($p < 0,001$)'de signifikan

Fermente ticari yemin (FTY) kimyasal bileşimleri Tablo 4.9'te sunulmaktadır. UTY ile karşılaştırıldığında, FTY'deki ham protein, 3 *R. oryzae* izolatı ile 2 ve 4 günlük fermentasyondan sonra artmıştır. Bununla birlikte, ham proteindeki en yüksek artış (%14,5) 236/2 izolatı ile 4 gün boyunca

fermentasyondan sonra görülmüştür. Genel olarak, FTY'nin ham lif içeriği fermentasyondan sonra azaldı. En yüksek düşüş (%56 ile) 92/1 izolatında 4 gün ve 236/2 izolatında 2 gün fermentasyondan sonra meydana geldi. Fermentasyondan sonra ham kül, ham yağ, şeker ve nişastada hafif artış veya azalma değişiklikleri oldu. Bir yemin verimliliğini temsil eden metabolize edilebilir enerjiye gelince, her zaman bir artış olmadı, ancak en iyi sonuç 284 izolatı, 4 gün sonra %7,16 ve 2 günlük fermentasyondan sonra %8,64 oldu. İki yönlü ANOVA testi ile gösterildiği gibi (tablo 4.10), 2 gün sonra metabolize edilebilir enerji dışında, 92/1, 236/2 ve 284 kodlu izolatlar tarafından 2 ve 4 günlük fermentasyondan sonra analiz edilen bileşenlerin değerlerinde önemli bir değişiklik olmamıştır. 284 izolat ile fermentasyonda ($p < 0,01$) önemli bir farklılık göstermiştir.

Tablo 4.9. Fermentasyon öncesi ve sonrası ticari yemin kimyasal bileşimini ve metabolize edilebilir enerjideki değişiklikleri gösteren tablo.

	İkubasyon Günleri	Kimyasal Bileşimi							Metabolize Edilebilir Enerji	
		Kuru madde %	Ham Protein %	Ham Kül %	Ham Yağ %	Ham Fiber %	Şeker %	Nişasta %	Kcal/Kg	Metabolize Edilebilir Enerji
										değişimi %
TY		90,08	17,05	5,28	2,51	2,50	2,67	34,3	2455,778	0,00
		(±0,78)	(±0,68)	(±0,24)	(±0,11)	(±0,09)	(±0,32)	(±1,03)	(±144,07)	
92/1 izolat ile		91,06	19,10	5,46	2,23	1,29	4,03	29,70	2372,74	
FTY	2	(±0,92)	(±0,64)	(±0,37)	(±0,08)	(±0,11)	(±0,45)	(±0,97)	(±153,30)	-3,38
92/1 izolat ile		90,05	18,66	5,15	2,07	1,10	4,15	35,76	2599,74	
FTY	4	(±0,69)	(±0,57)	(±0,19)	(±0,25)	(±0,10)	(±0,25)	(±0,75)	(±141,92)	5,86
236/2 izolat ile		89,98	19,12	5,17	2,14	1,10	3,14	35,91	2589,15	
FTY	2	(±0,57)	(±0,37)	(±0,38)	(±0,14)	(±0,13)	(±0,28)	(±0,78)	(±130,41)	5,43
236/2 izolat ile		90,02	19,53	5,42	2,37	1,20	2,59	31,33	2411,52	
FTY	4	(±0,82)	(±0,47)	(±0,41)	(±0,26)	(±0,08)	(±0,18)	(±0,86)	(±149,52)	-1,80
284 izolat ile		89,99	18,76	4,96	2,57	2,10	3,25	37,14	2667,97 **	
FTY	2	(±0,69)	(±0,46)	(±0,30)	(±0,23)	(±0,25)	(±0,26)	(±0,84)	(±144,37)	8,64
284 izolat ile		90,04	18,68	5,38	2,58	1,82	3,78	35,83	2631,71	
FTY	4	(±0,65)	(±0,39)	(±0,29)	(±0,21)	(±0,18)	(±0,34)	(±0,74)	(±140,15)	7,16

TY: Fermente edilmemiş ticari yem

FTY: Fermente edilmiş ticari yem

(**) ($p < 0,01$)'de Önemi

Değerler ortalama ± SEM'dir (n = 3)

Tablo 4.7. 3 *Rhizopus* suşu ile fermentasyondan önce ve sonra ticari yemin (TY) bileşimlerinin ve metabolize edebilir enerji (ME) değişiminin karşılaştırılması ve önemini gösteren tablo

Suşlar	2 gün			4 gün		
TY	Fark	P değeri	Açıklama	Fark	P değeri	Açıklama
92/1 Kuru madde	0,9800	P > 0,05	ns	-0,03000	P > 0,05	ns
92/1 Ham protein	2,050	P > 0,05	ns	1,610	P > 0,05	ns
92/1 Kül	0,1800	P > 0,05	ns	-0,1300	P > 0,05	ns
92/1 Ham yağ	-0,2700	P > 0,05	ns	-0,4400	P > 0,05	ns
92/1 Ham Fiber	-1,210	P > 0,05	ns	-1,400	P > 0,05	ns
92/1 Şeker	1,360	P > 0,05	ns	1,480	P > 0,05	ns
92/1 Nişasta	-4,600	P > 0,05	ns	1,460	P > 0,05	ns
92/1 ME	-83,04	P > 0,05	ns	144,0	P > 0,05	ns
236/2 Kuru madde	-0,1000	P > 0,05	ns	-0,06001	P > 0,05	ns
236/2 Ham protein	2,070	P > 0,05	ns	2,480	P > 0,05	ns
236/2 Kül	-0,1100	P > 0,05	ns	0,1400	P > 0,05	ns
236/2 Ham yağ	-0,3700	P > 0,05	ns	-0,1300	P > 0,05	ns
236/2 Ham Fiber	-1,400	P > 0,05	ns	-1,300	P > 0,05	ns
236/2 Şeker	0,4700	P > 0,05	ns	-0,08000	P > 0,05	ns
236/2 Nişasta	1,610	P > 0,05	ns	-2,970	P > 0,05	ns
236/2 ME	133,4	P > 0,05	ns	-44,26	P > 0,05	ns
284 Kuru madde	-0,09000	P > 0,05	ns	-0,04000	P > 0,05	ns
284 Ham protein	1,710	P > 0,05	ns	1,630	P > 0,05	ns
284 Kül	-0,3200	P > 0,05	ns	0,1000	P > 0,05	ns
284 Ham yağ	0,06000	P > 0,05	ns	0,07000	P > 0,05	ns
284 Ham Fiber	-0,4000	P > 0,05	ns	-0,6800	P > 0,05	ns
284 Şeker	0,5900	P > 0,05	ns	1,110	P > 0,05	ns
284 Nişasta	2,840	P > 0,05	ns	1,530	P > 0,05	ns
284 ME	212,2	P<0,01	**	175,9	P > 0,05	ns

ns: önemi yok * ($p < 0,05$)'te önemi, ** ($p < 0,01$)'de önemi, *** ($p < 0,001$)'de önemi

4.7.2 *Rhizopus oryzae* suşlarının Zeytin posasını fermentasyon kapasitesinin araştırılması

ZP'nin fermentasyonundan önce ve sonra üç *R. oryzae* suşunun kuru ağırlığı. Tablo 4.11'te gösterilmektedir. Fermentasyonun sonrasında elde edilen

veriler fermente edilmemiş zeytin posası ile karşılaştırılarak fungus kuru ağırlığı saptanmıştır. İki yönlü bir ANOVA testi yapıldığında (tablo 4.12); 236/2 ve 92/1 kodlu suşlar için anlamlı bir fark görülmedi. Bununla birlikte, 284 kodlu suş, ($p < 0,05$) önemli bir fark gösterdi. Fermentasyondan önce ve 14 günlük fermentasyondan sonra kuru madde ağırlığı karşılaştırıldığında, 236/2 ve 92/1 kodlu suşlar ($p < 0,05$) için fark anlamlı iken ve 284 kodlu suş için ($p < 0,001$) anlamsız olarak bulunmuştur. Bu, 284 suşun fermentasyon sırasında diğer iki suştan daha fazla büyüdüğünü göstermektedir.

Tablo 4.8. ZP'nin fermentasyondan önce ve sonra test *R. oryzae* suşlarının kuru maddesi.

İzolat Kodu	İnubasyon Günleri	Fungal kuru maddesi (g/10 g)
92/1	0	0,2366 ($\pm 0,0116$)
92/1	7	0,3624 ($\pm 0,0196$)
92/1	14	0,5508 ($\pm 0,0244$) *
236/2	0	0,2472 ($\pm 0,0139$)
236/2	7	0,3528 ($\pm 0,0175$)
236/2	14	0,5760 ($\pm 0,0202$) *
284	0	0,2214 ($\pm 0,0127$)
284	7	0,4657 ($\pm 0,0184$) *
284	14	0,6253 ($\pm 0,0249$) **

$\pm$ SEM: Ortalamaların standart sapması (n=3) * ($p < 0,05$)'te anlamlı, ** ($p < 0,01$)'de anlamsız,

*** ($p < 0,001$)'de anlamlı

Tablo 4.9. Fermentasyondan önce ve sonra zeytin posasının (ZP) kuru maddesini karşılaştırmanın farkını ve önemini gösteren istatistiksel analiz.

Suşlar	7 gün fermentasyon			14 gün fermentasyon		
	Fark	P değeri	Açıklam a	Fark	P değeri	Açıklam a
92/1	0,1258	$P > 0,05$	ns	0,3142	$P < 0,05$	*
236/2	0,1056	$P > 0,05$	ns	0,3288	$P < 0,05$	*
284	0,2443	$P < 0,05$	*	0,4039	$P < 0,01$	**

ns: önemi yok, * ($p < 0,05$)'te önemi, ** ($p < 0,01$)'de önemi

ZP'nin fermentasyon öncesi ve sonrası kimyasal bileşimleri ve fermentasyondan sonra hesaplanan ME (metabolize edilebilir enerji) değerleri Tablo 4.13'te gösterilmektedir. ZP'nin 3 *R. oryzae* suşu ile hem 7 hem de 14 gün fermentasyonunun ardından ham kül, ham yağ, ham lif ve şeker dahil tüm kimyasal bileşenlerin değerleri düşmüştür. Artan tek bileşen, 7 günlük

fermentasyondan sonra 284 kodlu suş tarafından (%3,60' lük bir artış ile) ZP'nin ME'sinde bir artışa yol açan proteindi. 7 ve 14 günlük fermentasyondan önce ve sonra kimyasal bileşimin ortalama değerlerini karşılaştırmak için kullanılan iki yönlü ANOVA testi (tablo 4.14), tüm kimyasal bileşimlerde önemli farklılıklar göstermedi; bununla birlikte, 362/2 suşu ile 7 gün ($p < 0,05$) ve 284 kodlu suş ile hem 7 gün ($p < 0,05$) hem de 14 günden ($p < 0,01$) sonra ME'de önemli bir fark saptanmıştır.



Tablo 4.13. Fermentasyon öncesi ve sonrası zeytin posasının kimyasal bileşimi ve metabolize edilebilir enerjiadaki değişiklikler											
	İkubasyon Günleri	Kimyasal Bileşimi						Metabolize		Metabolize	
		Kuru madde %	Ham Protein %	Ham Kül %	Ham Yağ %	Ham Fiber %	Şeker %	Niçast a %	Edilebilir Enerji Kcal/Kg	Edilebilir Enerji	değişimi %
ZP	0	78,42 (0,59)	5,05 (0,27)	7,28 (0,36)	9,19 (0,11)	39,45 (0,81)	0,59 (0,21)	0,00 (0,00)	1054,19 (93,20)		0,00
92/1 izolat ile FZP	7	78,37 (0,48)	6,20 (0,31)	6,93 (0,32)	8,92 (0,16)	37,94 (0,72)	0,54 (0,08)	0,00 (0,00)	1078,84 (88,11)		2,34
92/1 izolat ile FZP	14	78,38 (0,56)	6,11 (0,29)	7,12 (0,26)	8,93 (0,51)	36,80 (0,21)	0,52 (0,09)	0,00 (0,00)	1077,11 (121,48)		2,17
236/2 izolat ile FZP	7	79,02 (0,71)	5,90 (0,35)	6,90 (0,38)	9,10 (0,46)	38,21 (0,79)	0,53 (0,08)	0,00 (0,00)	1082,31 (122,50) *		2,67
236/2 izolat ile FZP	14	78,4 (0,55)	6,07 (0,40)	7,06 (0,40)	8,95 (0,53)	37,11 (0,67)	0,53 (0,11)	0,00 (0,00)	1075,95 (123,60)		2,06
284 izolat ile FZP	7	78,39 (0,48)	6,34 (0,28)	7,09 (0,45)	9,01 (0,47)	36,08 (0,79)	0,52 (0,13)	0,00 (0,00)	1092,11 (132,57) **		3,60
284 izolat ile FZP	14	77,14 (0,78)	6,33 (0,57)	7,11 (0,42)	8,90 (0,42)	35,57 (0,64)	0,49 (0,07)	0,00 (0,00)	1081,40 (121,34) *		2,58

ZP: Fermente edilmemiş zeytin posası

FZP: Fermente edilmiş zeytin posası

(*) ($p < 0,05$)'te Önemi, (**) ($p < 0,01$)'de Önemi

Değerler ortalama $\pm$ SEM'dir (n = 3)

Tablo 4.10. 3 *Rhizopus* suşu ile fermentasyondan önce ve sonra zeytin posasının (ZP) bileşimlerinin ve metabolize edebilir enerji verilerinin karşılaştırılması ve önemini gösteren istatistiksel analiz.

Suşlar	7 gün			14 gün		
ZP	Fark	P değeri	Açıklama	Fark	P değeri	Açıklama
92/1 Kuru madde	-0,05000	P > 0,05	ns	-0,2600	P > 0,05	ns
92/1 Ham protein	1,150	P > 0,05	ns	-2,650	P > 0,05	ns
92/1 Kül	-0,3500	P > 0,05	ns	-0,07000	P > 0,05	ns
92/1 Ham yağ	-0,2700	P > 0,05	ns	22,92	P > 0,05	ns
92/1 Ham Fiber	-1,510	P > 0,05	ns	-0,02000	P > 0,05	ns
92/1 Şeker	-0,05000	P > 0,05	ns	1,020	P > 0,05	ns
92/1 ME	24,65	P > 0,05	ns	-0,2200	P > 0,05	ns
236/2 Kuru madde	0,6000	P > 0,05	ns	-0,2400	P > 0,05	ns
236/2 Ham protein	0,8500	P > 0,05	ns	-2,340	P > 0,05	ns
236/2 Kül	-0,3800	P > 0,05	ns	-0,0600	P > 0,05	ns
236/2 Ham yağ	-0,09000	P > 0,05	ns	21,76	P > 0,05	ns
236/2 Ham Fiber	-1,240	P > 0,05	ns	-1,280	P > 0,05	ns
236/2 Şeker	-0,0600	P > 0,05	ns	1,280	P > 0,05	ns
236/2 ME	28,12	P < 0,05	*	-0,1700	P > 0,05	ns
284 Kuru madde	-0,03000	P > 0,05	ns	-0,2900	P > 0,05	ns
284 Ham protein	1,290	P > 0,05	ns	-3,880	P > 0,05	ns
284 Kül	-0,1900	P > 0,05	ns	-0,1000	P > 0,05	ns
284 Ham yağ	-0,1800	P > 0,05	ns	27,21	P > 0,05	ns
284 Ham Fiber	-3,370	P > 0,05	ns	-0,2600	P > 0,05	ns
284 Şeker	-0,07000	P > 0,05	ns	-2,650	P > 0,05	ns
284 ME	37,92	P<0,01	**	-0,07000	P < 0,05	*

ns: önemi yok * ($p < 0,05$)'te önemi, ** ($p < 0,01$)'de önemi

4.7.3. *Rhizopus oryzae* suşlarının Fermente zeytin posası ile desteklenen ticari yemi fermentasyon kapasitesinin araştırılması

Üç farklı *Rhizopus oryzae* suşunun zeytin posasını fermentasyon kapasiteleri araştırılmış ve en iyi sonucu 284 kodlu suşun verdiği belirlenmiştir. Bu suş ile fermentasyonun ardından elde edilen fermente zeytin posası farklı

zeytin posasının fermentasyonundan elde edilmiş fermente zeytin posası farklı oranlarda (%20, %30 ve %40) ticari yemin içerisine eklenmiş ve yemin analizi tekrar yapılmıştır.

Ticari yem (kontrol) ve %20, %30 ve %40 oranlarında fermente edilmiş zeytin posası içeren ticari yem örneklerinin kimyasal bileşimleri ve ME'leri Tablo 4.15'te gösterilmektedir. Eklenen fermente zeytin posası oranı arttıkça ham protein ve nişasta miktarı azalmıştır. Bununla birlikte, ham kül, ham yağ ve şeker miktarı arttı. Ancak TY'e daha fazla fermente edilmiş zeytin posası ilave edildiğinde ham lif miktarı önemli ölçüde arttı. ME hesaplandığında, %20 oranında fermente zeytin posası ile takviye edilmiş ticari yem örneğinin ME içeriği %8,38 arttı, %30 oranında fermente zeytin posası ile takviye edilmiş ticari yem örneğinin ME içeriği ise %2,83 artmış bulundu. Bununla birlikte, FZP tarafından TY takviyesi %40'a ulaştığında ME, %4,27 azaldı. Bu deneyin istatistiksel analizi (tablo 4.16), TY'e %20 FZP ilavesi üzerine ME'deki artış sadece anlamlı ($p < 0,05$) bulunmuştur. Diğer tüm değişiklikler, aynı p değerinde istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 0.15. FZP ile takviyeli ve takviyesiz TY'nın kimyasal bileşimi ve metabolize edilebilir enerjisi, takviyeden sonra metabolize edilebilir enerjideki değişiklikleri gösterilir.

	Kimyasal Bileşimi							Metabolize	
	Kuru madde %	Ham Protein %	Ham Kül %	Ham Yağ %	Ham Fiber %	Şeker %	Nişasta %	Metabolize Edilebilir Enerji Kcal/Kg	Metabolize Edilebilir Enerji değişimi %
TY	90,08	17,05	5,28	2,51	2,50	2,67	34,3 (1,03)	2455,778	0,00
	(0,78)	(0,68)	(0,24)	(0,11)	(0,09)	(0,32)		(144,07)	
TY + %20 284	88,94	17,01	5,31	5,37	7,97	2,83	33,24	2661,50 *	8,38
izolat ile FZP	(0,54)	(0,67)	(0,36)	(0,33)	(0,31)	(0,38)	(0,65)	(149,01)	
TY + %30 284	89,05	15,41	5,46	5,95	12,06	2,90	30,20	2525,30	2,83
izolat ile FZP	(0,47)	(0,71)	(0,41)	(0,36)	(0,44)	(0,36)	(0,54)	(147,70)	
TY + %40 284	89,45	12,52	5,77	6,38	19,16	2,85	27,82	2350,93	-4,27
izolat ile FZP	(0,76)	(0,58)	(0,30)	(0,40)	(0,51)	(0,27)	(0,57)	(143,84)	

TY: Fermente edilmiş ticari yem

FZP: Fermente edilmiş zeytin posası

(*) ($p < 0,05$)'te Önemi Değerler ortalama $\pm$ SEM'dir (n = 3)

Tablo 4.11. 3 *Rhizopus* suşu ile fermente zeytin posası (FZP) ile takviyeden önce ve sonra ticari yemin bileşimlerinin ve metabolize edilebilir enerjisinin (ME) karşılaştırılmasının farkını ve önemini gösteren istatistiksel analiz.

Suşlar	%20 FZP ile			%30 FZP ile			%40 FZP ile		
	Fark	P değeri	Açıklama	Fark	P değeri	Açıklama	Fark	P değeri	Açıklama
284 Kuru madde	- 1,140	P > 0,05	ns	- 1,030	P > 0,05	ns	- 0,630	P > 0,05	ns
284 Ham protein	- 0,470	P > 0,05	ns	- 1,640	P > 0,05	ns	- 4,530	P > 0,05	ns
284 Kül	0,030 00	P > 0,05	ns	0,18 00	P > 0,05	ns	0,480 0	P > 0,05	ns
284 Ham yağ	2,780	P > 0,05	ns	2,63 0	P > 0,05	ns	3,220	P > 0,05	ns
284 Ham Fiber	5,470	P > 0,05	ns	9,56 0	P > 0,05	ns	16,66	P > 0,05	ns
284 Şeker	1,680	P > 0,05	ns	1,95 0	P > 0,05	ns	1,270	P > 0,05	ns
284 Nişasta	- 3,290	P > 0,05	ns	- 4,110	P > 0,05	ns	- 6,480	P > 0,05	ns
284 ME	205,8	P < 0,05	*	69,1 2	P > 0,05	ns	- 116,9	P > 0,05	ns

ns: önemi yok * ($p < 0,05$)’te

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yiyecekleri korumanın en eski ve etkili yollarından biri fermentasyondur. Fermentasyon sadece gıdayı korumakla kalmaz, aynı zamanda besin değerine, güvenliğine ve organoleptik özelliklerine de katkıda bulunur (Bourdichon et al., 2012). *Zygomycetes*, özellikle *Rhizopus* cinsi, Tempeh ve Sufuehtze gibi fermente soya gıda maddelerinin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Lackner and Hertweck, 2011; Lackner et al., 2011). Bununla birlikte, gıda fermentasyonunda kullanmak için herhangi bir toksisiteye yol açmayacağından emin olmak çok önemlidir. Rohm et al. tarafından 2010 yılında Sufu üretiminde starter kültür olarak kullanılan *Rhizopus* suşunun toksijenik endobakteriler içerdiği gösterilmiştir. Araştırmacılar starter kültürlerin önemli miktarlarda rhizoksin türevlerini ürettiğini gösterdiler. Bu bileşikler, özellikle Femto/picomolar ölçeğinde işlev gören antimikotik maddelerdir (Rohm et al., 2010; Dolatabadi et al., 2016). Rhizoksinler güçlü antimikotik aktiviteye sahip toksinler olduğundan, gıda ürünlerinde bu sekonder metabolitlerin varlığı ciddi bir öneme sahiptir. Başka bir çalışmada, farklı kaynaklardan izole edilen *Rhizopus* suşlarının %21'inin rhizoksin üreten hücre içi bakteri hücreleri içerdiği gösterilmiştir (Dolatabadi et al., 2016).

R. oryzae biyoürünleri FDA tarafından GRAS olarak kabul edilmesine ve yüzyıllardır gıda fermentasyonuna entegrasyonuna rağmen, miselyumlarında barındırabilecekleri toksik bakteri türlerinin miselyumlarından salınması durumunda sepsis ve daha ciddi sorunlara neden olacağından dolayı, bu bakterilerin var olup olmadıklarının araştırılması çok önemlidir (Birol ve Gunyar, 2021). Bu çalışmada, floresan mikroskopisi ile izolatların 94'ünün hiçbirinin

endofungal bakteri içermediği gösterilmiştir, bu da kullanılan suşların güvenli oldukları ve ileri probiyotik özelliklerinin taranması için aday olabilecekleri anlamına gelir.

Probiyotik olarak kullanılacak organizmaların sahip olması gereken özelliklerden antimikrobiyal aktivite, zararlı patojenik mikroorganizmaları ortadan kaldırma potansiyeli sağladığı için önemlidir (Shah, 2007; Dhama et al., 2011; Missotten et al., 2015; Sugiharto, 2016). Çalışmamızda ilk olarak tüm izolatlarımızın antimikrobiyal aktivitesi olup olmadığı açısından test edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite tayini için, disk difüzyon, kuyu difüzyonu veya agar seyreltme gibi çeşitli yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu un yanında akış sitometrisi ve biyoluminesans yöntemleri gibi yöntemler antimikrobiyal ajanın etkilerini hızlı bir şekilde görmeyi, canlılık ve test edilen mikroorganizmaya verilen hücre hasarı daha iyi anlaşılmasını sağlarlar bile özel ekipman, standardizasyon ve sonuçların tekrar edilebilirliği açısından daha yaygın olarak kullanılmaz (Balouiri et al., 2016). Bu nedenle çalışmamızda geleneksel disk difüzyon tekniğini kullanmaya tercih ettik.

Sugiharto et al. tarafından 2015 yılında yapılan bir çalışmada, iki filamentli fungus olan *Acremonium charticola* ve *R. oryzae* izolatlarının, patojenik bakteri olarak *E. coli*'ye ve patojenik fungus türü olarak *A. flavus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlar ve her ikisinin de antibakteriyel ve antifungal aktivitelere sahip olduğunu göstermişlerdir. Dos Santos et al. (2015), *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Lasiodiplodia*, *Mycelia*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis* ve *Phomopsis*'in farklı türlerinden 18 fungus izolatın bizim de çalışmamızda kullandığımız üç bakteriyel patojene (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) ek olarak *B. subtilis* ve *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı değişken antibakteriyel aktivitelere

sahip olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda, *Rhizopus* izolatları, kullanılan patojenlere karşı ya antibakteriyel, anti-maya ya da antifungal aktiviteye sahipti. Ancak piliçler farklı patojenik ajanlara (bakteri, maya ve fungus enfeksiyonları) maruz kaldıklarından, her tür patojenin büyümesini engelleyebilecek bir probiyotik bulmak oldukça verimli olacaktır. Bu nedenle 94 adet *Rhizopus* izolatı ile çalışmalara başlanmış fakat hem bakteri hem maya, hem de filamentli funguslara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip 10 izolat ile çalışmalara devam edilmiştir.

Probiyotik bir organizmanın sindirim sistem koşullarında çoğalabilmesi için gastrointestinal koşullarda canlı kalabilmesi gerekmektedir. Bir tavuğun sindirim sisteminden geçen yemi ortalama tutma süresi 340 dakika (5,5 saat), ortalama maksimum yem tutma süresi ise 449 dakikadır (7,5 saat) (Svihus and Itani, 2019). Buna göre, fungal suşlar 0, 4 ve 8 saat % 2 safra tuzuna (BS) ve pH 2 simüle mide suyuna (SGJ) maruz bırakılarak dayanıklılık düzeylerini saptanmıştır (Lian et al., 2003, Sugiharto et al., 2015).

Sugiharto et al. (2015) tarafından yapılan çalışmada, hem *A. charticola* hem de *R. oryzae* asidik pH 3 ve alkali pH 8 koşullarında hayatta kalmıştır. *A. charticola* pH 2'ye (simüle mide suyu koşulları) 8 saatlik maruziyette hayatta kalmayı başarmış, ancak %2 BS'ye sadece 4 saatlik maruziyetin arkasından canlı kalırken, 8 saat sonra canlılığını kaybetmiştir. Aynı çalışmada, kullanılan *R. oryzae* izolatı, SGJ pH 2'ye maruz kaldıktan sonra sadece 2 saat hayatta kaldı, ancak %2 BS' de hiçbir koşulda yaşayamamıştır. Bizim kullandığımız, 10 izolat asidik, alkali koşullara ve %0,8'e kadar BS'ye 20 dakika boyunca maruz kaldığı halde hayatta kalmış ayrıca SGJ pH 2 ve ve %2 BS'ye 8 saatlik maruziyetin

arkasından da canlı kalabilmiştir. Bu nedenle iyi probiyotik mikroorganizma adayları olarak kabul edilebilir.

Basidiomycetes, Ascomycetes ve Zygomycetes sınıflarına ait filamentli fungusların doğal antioksidan kaynakları olduğu kanıtlanmıştır. Antioksidanlar açısından zengin gıda ürünleri her geçen gün popüleritesini artırmaktadır. Tahıl ve baklagillerin filamentli funguslarla fermente edilmesi ile içindeki antioksidan maddelerin arttığı ve diyabetes mellitus, nörodejeneratif bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar, solunum hastalıkları, katarakt gelişimi, romatoid artrit ve çeşitli kanserler gibi serbest radikal aracılı hastalıkları önleyebileceği belirtilmekte ve etlik piliçlerin diyetinin de esas olarak tahıl ve baklagillerden oluştuğu vurgulanmaktadır. Ayrıca, bazı çalışmalar, tarımsal atıkların funguslar ile fermente edilmesi ve dolayısıyla piliç diyetlerine eklenmesi yoluyla antioksidan aktivitesinin arttığını göstermektedir. Yani fungal suşların antioksidan aktivitesinin değerlendirilmesi sadece probiyotik potansiyelinin belirlenmesi için değil aynı zamanda fermentasyon yöntemi ile hazırlanan yemin antioksidan aktivitesine katkıda bulunduğu için de önemlidir.

Belirli bir metabolitin antioksidan aktivitesini belirlemek için kullanılan birçok farklı analiz vardır. Hidrojen atomunun transferine dayalı testlerden bazıları Oksijen Radikal Absorpsiyon Kapasitesi testi, Hidroksil Radikal Antioksidan Kapasite testi, Toplam Peroksil Radikal Yakalayıcı Antioksidan Parametre testi ve Toplam Oksiradikal Süpürme Kapasitesi testidir. Bir elektron transferine dayalı testler, Bakır İndirgeyici Antioksidan Güç testi, Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç testi ve Folin–Ciocalteu testini içerir. Hem bir hidrojen atomunun hem de bir elektronun transferini içeren karma testler, 2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit testi ve DPPH testini içerir. Tüm bu

deneyler kimyasal reaksiyonlara dayanır ve kinetiği değerlendirmek veya denge durumuna ulaşmak, karakteristik renklerin oluşmasını veya analiz edilecek çözeltilerin renk değiştirmesini ön kabul eden, spesifik dalga boyu adsorpsiyonu ile izlenen süreçler olan spektrofotometriye dayanır (Munteanu and Apetrei, 2021). Bu çalışmada hem bir hidrojen atomunun hem de bir elektronun transferini analiz ettiği için DPPH testini uyguladık. Bu yöntemin avantajı, DPPH reaktifinin en zayıf antioksidanlar da dahil olmak üzere karışımdaki tüm maddelerle etkileşime girebilmesi ve hem hidrofilik hem lipofilik antioksidanlarla reaksiyona girebilmesidir (Seyhan, 2019).

Sunulan çalışmada, geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye ve gastrointestinal toleransa sahip 10 *R. oryzae* izolatının antioksidan kapasitesi incelenmiştir. Sonuçlara göre hepsi aynı türe ait farklı suşlar olmasına rağmen farklı antioksidan aktivite gözlenmiştir. Sadece iki tanesi çok yüksek (236/2 ve 284) antioksidan aktiviteye sahip bulunmuştur, birinin (92/1) nispeten yüksek aktiviteye ve geri kalanının ise orta (228, 123, 103 ve 32) ile düşük (61 ve 43/1) aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Aynı türün farklı suşlarının antioksidan yeteneklerindeki farklılık, farklı izolasyon kaynaklarından kaynaklanabilir.

Fermantasyon işlemi sırasında starter kültür olarak kullanılabilecek çeşitli mikroorganizma türleri vardır. Bakteri ve mayaların yanı sıra, filamentli funguslar, fermantasyon başlatıcıları olarak kullanılabilecek diğer mikroorganizmalardır. Birkaç filamentli fungusun, yem veya yem bileşenlerinin besin içeriğini iyileştirdiği rapor edilmiştir. Örneğin, Lateef et al. (2008), filamentli fungus *Rhizopus stolonifer* LAU 07 ile kakao pod kabuğu, manyok kabuğu ve hurma çekirdeği kekinin fermantasyonu sonucu lif ve siyanür içeriğinde azalma, protein içeriğinde artma saptamışlardır. Diğer bir çalışmada, *A.*

niger ile fermentasyonun ardından hurma çekirdeği kekinin ham protein ve esansiyel amino asitlerinin arttığı, ham lif, selüloz, hemiselüloz, nötr deterjan lifi ve nitrojen içermeyen ekstraktlarının azaldığı gözlenmiştir (Marzuki et al., 2008).

Daha önceki bir çalışma ayrıca *A. niger* kullanılarak yapılan fermentasyonun lifi azaltabileceğini ve manyok katı atıklarının ham protein içeriğini yükseltebileceğini gösterdi. (Obadina et al., 2006). Buna göre Ramin et al., (2011), manyok ham protein içeriğini artırmada *A. niger*'in kapasitesini fark etmiştir. Sugiharto et al., (2015) *A. charticola* ve *R. oryzae* türlerini kullanarak ham proteini artırma ve manyok hamurunun lif içeriğini düşürme yeteneğine sahip olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca *Chrysonilia crassa* kullanılarak yapılan katı hal fermentasyonu manyok küspesi, muz kabuğu ve pirinç kepeği gibi bazı tarımsal endüstriyel yan ürünlerin ham lifini ve ham protein ve amino asit içeriğini azaltmıştır (Sugiharto et al., 2018b). Fermentasyon başlatıcı olarak yaygın olarak kullanılan diğer bir fungus türü ise *Trichoderma* türleridir. Obadina et al. (2006) çalışmasında, *Trichoderma* sp ile fermentasyonun ardından manyok katı atığının ham protein içeriğinin arttığı ve lif içeriğinin ise azaldığı gösterilmiştir. Buna uygun olarak, *Trichoderma viride* kullanılarak yapılan fermentasyon, manyok kabuğunda ham protein, gerçek protein ve kül içeriğinin artmasıyla sonuçlanmıştır (Ezekiel and Aworh., 2013). Bahsedilen ikinci çalışmada ayrıca manyok kabuğundaki ham lifin, ham yağın ve siyanürün de azaldığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, *T. viride* fermentasyonu, kopra küspesinde azalan lif ve artan ham protein içeriği ile ilişkilendirilmiştir (Hatta et al., 2014). Yem bileşenlerinin beslenme ölçütlerini iyileştirmeye yönelik başarılı girişimin yanı sıra, farklı sonuçlara sahip çalışmalar da vardır. Örneğin, Ramin et al. (2011), fermentasyon başlatıcı olarak *R. oryzae* kullanarak fermentasyon yoluyla

manyoktaki protein içeriğini arttırmayı başaramamıştır. Ayrıca, *R. oryzae* veya *C. crassa* kullanılarak yapılan fermentasyon, pirinç kepeğinin ham protein içeriğini önemli ölçüde artırmamıştır (Sugiharto et al, 2017). Fungus türlerindeki farklılıklar, substratların doğası ve fermentasyon koşulları, bahsedilen tutarsızlıktan sorumlu görülmektedir (Sugiharto, 2019).

Etlik piliç üretiminde en önemli ama en pahalı girdi yemdir. Son yıllarda Türkiye'de yem fiyatlarında radikal bir artış olmuştur. Aralık 2019 ile karşılaştırıldığında, Aralık 2020'ye kadar etlik piliç yem fiyatında %158 (USDA, 2021a) ve piliç eti piyasa fiyatında %30'luk bir artış (USDA, 2021b, c) olmuştur. *R. oryzae* 'nin, daha önce etlik piliç yemlerinin veya doğrudan tüketilen gıdaların fermentasyon başlatıcısı olma özelliğinden dolayı probiyotik özelliği araştırılmıştır (Gao et al., 2012; Pratiwi, 2014; Sugiharto et al., 2015; Isroli et al., 2017; Fatmawati et al., 2018). Ticari yem (TY) zaten besinler açısından zengindir, ancak funguslar ile fermentasyon üzerine etkinliği daha da artırılabilir. Ham protein, metabolize edilebilir enerjiyi ve dolayısıyla yemin verimini etkiler. *R. oryzae* tarafından fermentasyon, proteolitik enzimler ürettiği için ham proteinlerin biyoyararlanımını artırır (İbrahim, 2018). Ek olarak, fermentasyon sırasında fungus tek hücreli protein üretimi olarak çoğalır ve yemin ham protein içeriği de artar (Lado et al., 2020). Bu çalışmada, önceki çalışmalarda olduğu gibi (Sugiharto and Ranjitkar 2019), tüm izolatlarda 2 veya 4 günlük fermentasyon sonrasında ham protein içeriğinde artış olmuş, artış %9,44 ile %14,5 arasında değişmiştir. Daha önceki çalışmalarda açıklandığı gibi, ham proteindeki artış muhtemelen fermentasyon sırasında amino asit mevcudiyetinin artmasından kaynaklanmaktadır, çünkü fermente edici organizmalar bitkide lignoselülozik materyalleri kullanır ve ihtiyaç duydukları amino asitleri üretirler (Dierick, 1989).

Ancak bazı amino asitler fungus ihtiyacına göre diğerlerinden daha fazla üretilir (Hong et al., 2004).

Lif kanatlı hayvan beslemede sindirimde sınırlı bir role sahiptir ve daha az miktarda enerji verir, ancak *Rhizopus*, uzun selüloz zincirlerini daha basit sindirilebilir moleküllere parçalayabilen selülaz enzimi üretir. Bu nedenle, bir yemdeki ham lif ne kadar az olursa, yem o kadar iyi olur. TY'nin *R. oryzae* izolatları tarafından fermente edilmesi, önceki deneylerde (Sugiharto and Ranjitkar 2019) görüldüğü gibi tüm deneylerde ham lif içeriğini azalttı ve düşüş %16 ila 56 arasında değişti. Ham yağ ve nişasta içeriğindeki hafif artış, *Rhizopus*'un bol miktarda amilaz ve lipaz gibi hücre dışı enzimler üretmesi ve fungusun büyümek ve çoğalmak için bu besin maddelerini kullanmasına bağlı olabilir (Londoño-Hernández et al., 2017). Protein içeriğindeki artışa eşlik eden lif içeriğindeki tutarlı azalma, fungusun ihtiyaç duyduğu amino asitleri oluşturmak için lignoselülozu kullandığı gerçeğini de açıklayabilir (Joseph et al., 2008).

Enerji bir besin maddesi olmamasına rağmen, bir yemin en pahalı içeriği ve en önemli özelliğidir. Protein, yağ ve karbonhidrat içeriği ile belirlenir. Bir pilicin ette verim vermesini sağlayan kapasite yem enerjisidir. Bir diyetteki enerji seviyeleri ne kadar yüksek olursa, besin yoğunluğu da o kadar yüksek olur. Böylece piliç besin gereksinimlerini elde etmek için daha az yem kullanabilir. Dolayısıyla, geliştirilmiş yem verimliliği üretkenliğin artmasına sebep olur (Siegel, 2014; Abdollahi et al., 2021). Bizim çalışmamızda *R. oryzae* izolatları tarafından yapılan fermantasyon, çoğunlukla yemdeki metabolize edilebilir enerjiyi arttırmıştır. Metabolize edilebilir enerjideki (ME') artış %5,43 ile %8,64 arasında değişmekte olup, bu, özellikle probiyotiklerin diğer faydalı özellikleri

göz önüne alındığında, ticari bir etlik piliç tesisinde üretkenlik üzerinde iyi bir etkiye sahip olacaktır.

Çalışmamızda sadece geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite ve gastrointestinal sistem toleransına sahip 10 *Rhizopus* izolatu genotipik olarak tanımlanmıştır. Genotipik tanımlama üzerine 10 izolatu *R. oryzae* türü olduğu gösterildi. Ancak farklı antimikrobiyal aktivitelere, safra tuzlarına ve mide suyuna farklı reaksiyonlara ve farklı antioksidan yeteneklerinin yanı sıra farklı fermentatif kapasitelere sahip oldukları çalışmamızda saptanmıştır. Bunun nedeni, aynı enzimleri üretmeleri, ancak farklı formlarda ve dolayısıyla farklı özellikler vermeleri olabilir (Maheshwari et al., 2000). Başka bir açıklama, bu farklı suşların, nem ve sıcaklık gibi çevresel faktörlere farklı şekilde cevap vermeleri olabilir (Lugauskas and Krikštaponis 2004). Ayrıca, bu *R. oryzae* suşlarının tarım topraklarından izole edilmelerine rağmen, bu topraklardaki bitki türlerinin farklı olması, toprak özelliklerini değiştirmekte ve toprak funguslarının (Canini et al. 2019), dolayısıyla suşun fizyolojik özelliklerini etkilemektedir. Bitki örtüsünün toprak fungusunun fizyolojik özellikleri üzerindeki etkisi yeterince araştırılmamıştır (Vukicevich et al., 2019) ve ayrıntılı olarak test edilmelidir.

Filamentli fungusları kullanarak yetersiz besleyici özelliği olan tarımsal atıkların fermentasyonu ve besin değerinin artırılması çalışmaları önemlidir (de Siqueira et al., 2010; Panesar et al., 2015; Sadh et al., 2018; Jha et al., 2020). Funguslar gezegende yaşayan (Izzaty et al., 1967; Bonneville et al., 2020), doğal ve sentetik bileşiklerin çok çeşitli biçimlerini parçalayabilen en geniş sindirim enzimi yelpazesini üreten bir numaralı saprofit olarak kabul edilirler. Bu nedenle, bunları tarımsal sanayi yan ürünlerinin fermentasyon başlatıcıları olarak benimsemek, yalnızca ucuz atıkların kullanılmasında değil, aynı zamanda

çevredeki kirliliklerin giderilmesinde de sınırsız fayda sağlayabilir (Denardi-Souza et al., 2018). *R. oryzae*, mısır samanı, manyok, patates küspesi, pirinç kepeği, elma atıkları, portakal kabuğu, buğday atıkları, arpa kepeği ve diğer birçok lignoselülozik atık gibi birçok tarımsal atıkta yetişmesini sağlayan amilazlar, selülozlar, pektinazlar ve ksilanazlar gibi karbonhidratlar için geniş bir enzim yelpazesine sahiptir. Bunun yanı sıra toksin üretmemesi nedeni ile detoksifikasyonda da kullanılmaktadır (Ibarruri and Hernández, 2018).

Zeytinyağı endüstrisinin bir yan ürünü olarak zeytin değirmeni atığı yıllık tonlarca olarak üretilir ve yem bileşenleri olarak hala faydalı olabilecek birçok bileşen içerir. Bu bileşenlerin bazıları, oleik, palmitik ve linoleik asitler gibi yağ asitleri içerdiğinden bir enerji kaynağı olarak kullanılabilen nispeten yüksek bir ham yağ içeriğidir (yaklaşık %9) (Chiofalo et al., 2004). Ayrıca arginin ve glisin amino asitleri içeren önemli bir protein içeriğine (yaklaşık %5) sahiptir (Zarei et al., 2011). Makul seviyelerde manganez ve çinko ile kalsiyum, bakır ve kobalt gibi bazı elementler içerir. Ayrıca zeytinyağı üretim yan ürünlerinde bulunan tanenler, ligninler, uzun zincirli yağ asitleri, indirgenmiş şekerler, proteinler ve fenolik bileşiklerin antioksidan ve antimikrobiyal kapasiteleri vardır (Gerasopoulos et al., 2015).

Birçok çalışma, zeytin posası (ZP) eklemenin faydalarını göstermiştir. Örneğin, El Hachemi et al. (2007), ZP'nin etlik piliçlerin rasyonlarına %9'a kadar yem maddesi olarak dahil edilebileceğini ve büyüme performansı üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığını bildirmiştir. Abo Omar (2005), 100 g/kg'a kadar olan etlik piliç rasyonlarında ZP kullanımının canlı ağırlığını arttırdığını bildirmiştir. Ayrıca, ZP'nin diyeteye eklenmesi, yumurta ağırlığı ve yumurta sarısı indeksi açısından yumurta piliçlerinin performansı üzerinde faydalı bir etkiye

sahip olacağı belirtilmiştir (Zarei et al., 2011). Afsari et al. (2014), ZP'nin yumurta piliç diyetlerine %16'ya kadar dahil edilebileceğini ve üretkenlik performansı üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığını bulmuşlardır. Zangeneh and Torki (2011), yumurta piliçlerinin diyetlerine ZP'nin %9'a kadar eklenmesinin, kanatlıların üretkenlik performansı üzerinde zararlı etkileri olmadığını da bildirmiştir. Ne yazık ki, ZP'nin kanatlı diyetlerinde kullanımı sınırlıdır, çünkü bu yan ürün, monogastrik türler tarafından iyi sindirilmeyen (yaklaşık 136,3 g/kg) (NRC, 1994) lif bakımından yüksektir (Zarei et al., 2011). Ayrıca, ZP hücre duvarlarında yem kullanımı ve kanatlı verimliliği üzerinde besleyici olmayan ksiloglukan (nişasta olmayan polisakkaritler) mevcuttur (Rosario and Domingues, 2002). Nişasta olmayan polisakkaritlerin yem alımın azalttığını ve düşük etlik piliç performansına neden olduğu bildirilmiştir. Farag et al. (2010) tarafından radyasyon uygulamalarının nişasta olmayan polisakkaritlerin olumsuz etkilerini büyük ölçüde hafiflettiği, protein, yağ, lif ve nişasta sindirilebilirliğini iyileştirdiği, lifin tamamen parçalanmasına yardımcı olduğu radyasyonun bir sonucu olarak mevcut enerjideki iyileşmenin %35'e kadar ulaştığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, rasyonlara sarı mısır tanelerinin %5 ve %10' oranları yerine diyetle aynı oranlarda ZP eklenmesinin yumurtlayan Japon bıldırcınlarının biyolojik performansı üzerindeki etkisini araştırılmıştır ve ısıtılmış zeytin atıklarının, yumurtacı bıldırcın yemlerinde, biyolojik performansları üzerinde zararlı bir etki olmaksızın, diyet sarı mısır yerine %10'a varan seviyelerde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (İbrahim et al., 2018).

Ancak genel olarak, zeytin yan ürünlerinin kullanımı, tek mideli hayvanlar tarafından sindirilmesi zor olan nispeten yüksek miktarda lignoselülozik lifler (yaklaşık %40) içerdiğinden dolayı sınırlıdır (Zarei et al., 2011). Ayrıca, nişasta

eksikliği yem bileşeni olarak bir dezavantajdır. Çünkü nişasta, yemin ME'sinin yükseltilmesinde önemli bir rol oynar, dolayısıyla üretkenliğini artırır. Bu sorunu çözmek için bazı araştırmalar, gama ışınları ile zeytin posası ışınlamasına başvurmuş ve yumurtacı bıldırcınların beslenmesinde olumlu sonuçlar alınmıştır (İbrahim et al., 2018). Zeytin atığının güvenli mikroorganizmalar tarafından fermentasyonu bir başka avantajlı çözümdür. Örneğin, bir çalışmada ZP *Pleurotus ostreatus* ve *Pleurotus pulmonarius*'un fermentasyonu, %7 ila 29 arasında değişen önemli CP artışlarına yol açtı. (Brozzoli et al., 2010). Başka bir çalışma, ZP'nin *Beauveria bassiana*, *Fusarium flocciferum*, *Rhizodiscina cf. lignyota* ve *A. niger* 15 gün fermentasyonda, kimyasal bileşim ve enzim aktiviteleri belirlendi ve sonuçlar protein içeriğinde %94'e varan bir artış gösterdi. Chebaibi et al., 2019). Başka bir çalışmada ZP'nin *A. oryzae* FK-923 tarafından fermentasyonu, ham protein içeriğinde %9.5'ten %17.4'e bir artış sağladı (Fadel & El- Ghonemy, 2015). Başka bir çalışmada, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma reesei* ve *S. Cerevisiae*, ham ZP'deki ham protein seviyesini %5,9'dan FZP'de %40,3'e çıkardı (Haddadin et al., 1999). Ayrıca Shataby et al. (2009) yapısal karbonhidratları parçalamak için *P. ostreatus* kullandı, böylece sindirilebilirliğini geliştirdi.

Tüm bu nedenlerden dolayı biz çalışmamızda sadece zeytin posasını fermente ederek zeytin posasının kalitesini ve ayrıca fermente edilmiş zeytin posasını belli oranlarda yeme ekleyerek yine yemin kaltesine etkisini yaptığımız çalışmada araştırdık. TY fermentasyonunda kullandığımız suşları yine bu çalışmada kullandık. 92/1 ve 236/2 suşları ile karşılaştırıldığında, 284 *R. oryzae* suşu, TY'nin fermentasyonunda olduğu gibi, zeytin öğütme agro-endüstriyel atıklarının fermentasyonundan sonra kuru maddede en yüksek artışa sahipti. Her

iki fermentasyon prosesi de yaklaşık olarak aynı inokulum ile başlasa da tarımsal-endüstriyel ZP'nin 14 günlük fermentasyonundan sonra 0,6253 g kuru maddeye ulaşılırken, TY'nin fermentasyonu ile 0,7425 g'lık nispeten daha yüksek bir kuru maddeye sadece 4 gün sonunda ulaşıldı. Tablo 4.9 ve 4.13'te gözlemlendiği gibi, ZP ham protein, şeker ve nişasta için sırasıyla %5,05, %0,59 ve %0,00 değerlerine sahiptir ve TY, aynı bileşenler için %17,05, %2,67 ve %34,3 değerlerine sahiptir. Bununla birlikte, ham yağ ve ham lif gibi parçalanması daha zor olan kompleks bileşenler, ZP'de (sırası ile %9,19 ve %39,40) TY'den (sırası ile %2,51 ve %2,50) daha fazladır. Bu, farklı besin bileşenlerinin zenginliğinin ve varlığının fungus büyümesi ile doğru orantılı olduğunu kanıtlamaktadır.

284 kodlu *R. oryzae* suşu ile ZP fermentasyonun ardından gösterilen kuru maddedeki yüksek artışa, ham protein bileşenlerindeki en yüksek artış eşlik etmiştir. Ayrıca ME'de en yüksek artışa yol açan ham lifteki en yüksek düşüş eşlik etmiştir. Bu, fermente eden organizma ne kadar hızlı büyürse fermentasyon kapasitesinin o kadar iyi olduğunu göstermektedir. Fadel & El- Ghonemy, 2015 tarafından yapılan benzer bir çalışmada, yedi filamentli fungus (*Trichoderma reesei* F- 418, *T. harzianum* F- 416, *T. virdie* F- 520, *T. koningii* F- 322, *A. oryzae* FK- 923, *A. fumigatus* F-993 ve *A. awamori* F- 524) aynı zamanda zeytinyağı endüstrisinin bir yan ürünü olan zeytin küspesini fermente etmek için kullanılmış ve 7 günlük fermentasyondan sonra ham proteinde artış ve ME'de bir artışa yol açan ham selülozda azalma gözlenmiştir. En iyi sonuçlar, fermentasyon öncesine kıyasla ME'de %9'luk bir artış gösteren *A. oryzae*' den elde edilmiştir. Bu çalışma ile bizim çalışmamız arasındaki fark fermentasyonun 36°C'de yapılmış olmasıdır, bu da enzimlerin katalitik etkisini arttırmış olabilir, ancak bizim çalışmamızda, yemin ticari olarak üretim potansiyeli düşünülerek maliyeti azaltmak için

fermantasyon oda sıcaklığında yapılmıştır. Farklı zeytin atıkları üzerinde, hayvan yemlerine uygulamak amacıyla farklı fermente edici organizmalar kullanılarak başka çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, çekirdekli zeytin ezmesinin özelliklerini geliştirmek için bir *Pleurotus* 'un bir türü kullanılmış ve hemiselüloz bileşenlerini azaltırken ham proteini yükseltmiştir (Brozzoli et al., 2010). *A. niger*, Chebaibi et al. (2019) tarafından bildirilen bir çalışmada zeytin kekinin protein içeriğini artırmayı başardı.

TY'nin bir kısmının besleyici olarak zayıf ve ucuz bir ZP ile değiştirilmesini test etmek için %20, %30 ve %40 oranları önerilmiştir. Çünkü %20'den azı ekonomik olarak çok faydalı olmayacak ve %40'tan fazla takviye yapıldığında TY'nin beslenme avantajının büyük bir kısmı kaybedilecektir. Ve bu, ME'nin bu oranda (%40) %4,27 oranında düştüğü çalışma ile kanıtlanmıştır. Zengin besleyici TY'nin %20 ve %30'unun yetersiz besleyici ZP ile değiştirilmesinin ME'de bir azalmaya yol açması bekleniyordu; ancak sırasıyla %8,38 ve %2,83'lük bir artış olmuştur. Bu, karmaşık bileşiklerin analizle tespit edilebilen daha kolay erişilebilir basit bileşiklere parçalanmasına yol açan fermentasyonun etkisiyle açıklanabilir. Ayrıca, bazı bileşenlerdeki artış, fermentasyon işlemi sırasında misellerde protein ve yağ içeriği arttıkça, analizden önce kurutulan ve öğütülen fermente edilmiş zeytin posasında (FZP) bulunan fungus miselleri ile açıklanabilir (Ibarruri and Hernández, 2018). TY fermentasyon sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, TY'yi fermente etmek için 284 kodlu suş kullanıldığında, 2 günlük fermentasyondan sonra ME %8,64 arttı, bu da TY'nin %20'sinin FZP ile değiştirilmesinin sonucuna çok yakın (%8,38) bir değerdir.

Tablo 4.13'te görüldüğü gibi, ham protein ve ilave edilen FZP arasında ters orantılı bir ilişki saptanmıştır. Ancak ham yağ ile yemdeki FZP arasında doğru orantılı bir ilişki saptanırken, kül içeriğinde yaklaşık olarak hiçbir değişiklik görülmemiştir. Benzer şekilde FZP'deki artışla yağ içeriğindeki aynı artış, Christodoulou tarafından laktasyon koyunları rasyanyonlarında gerçekleştirilen bir çalışmada da saptanmıştır. Araştırmacılar bu çalışmada yemleri FZP ile %10 ve %20 oranında desteklemişlerdir. Ancak bu çalışmada yemdeki FZP oranındaki artış, protein içeriğini de kül içeriğini de değiştirmemiştir.

Organik atıklar da dahil olmak üzere yenilenebilir kaynaklar kullanılarak fermantasyon yoluyla protein üretimi, çevresel ve endüstriyel atıklara bir çözüm olarak dünya çapında ilgi görmüştür (Oliveira, 2001). Okpako et. al. (2008) ham protein içeriğini %5,50'den %24,40'a çıkarmak için manyok kabuğunu *A. niger* ve *Lactobacillus rhamnosus* karışımıyla fermente etti. *Trichoderma viride* daha önce çeşitli gıda işleme atıklarının fermantasyonunda kullanılmıştır; De Gregorio et al. (2002) limon hamurunu *T. viride* ve *A. niger* ile bulamaç hal fermantasyon yöntemi (slurry-state fermentation) ile fermente etmişler, kalıntıda elde edilen protein içeriği *T. viride* ile *A. niger* ile olduğundan daha yüksek olmuştur. Hem kimyasal olarak hidrolize edildiğinde hem de *T. viride*'nin büyümesi için kullanıldığında çok düşük protein içeriğine sahip palmye ağacı yaprakçıkları ve orta damarları proteinle zenginleştirilmiştir (Ezekiel et al., 2010).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, izole edilen ve taranan 10 *Rhizopus* suşun güvenli hem bakteriyel hem de fungal patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip ve 8 saatlik maruziyetten sonra bile gastrointestinal sistem koşullarına tolerans gösterdikleri gösterilmiştir. Bu 10 izolattan üçü; sırasıyla 284, 236/2 ve 92/1 kodlu suşlar,

yüksek antioksidan aktiviteye de sahiptir. TY için fermentasyon kapasiteleri test edildiğinde, özellikle 284 kodlu suş olmak üzere iyi fermentasyon kapasitesi göstermiştir. Sonuçlar bu suşun etlik piliç yeminin besleyicilik verimini artırmada ve böylece piliç üretimini artırmak için bir fermentasyon starter kültürü olarak kullanılabileceği anlamına gelir. Bununla birlikte, piliçlerin fermentasyonunun etkisini test etmek için daha ileri çalışmalar yapılmalıdır.

Ayrıca, bu suşların fermentasyon yolu ile bitki atıklarının veya endüstriyel yan ürünlerin besleyici değerini artırıp artıramayacaklarını görmek için aynı 3 suş (284, 236/2 ve 92/1) kullanılmıştır. Pahalı yem bileşenlerine geleneksel olmayan bir alternatif olarak zeytin posası kullanılmıştır. Sonucunda, etlik piliç endüstrisinde girdi olarak yüksek yem fiyatını düşürmenin bir yolu olarak, ticari yeme %30' a kadar oranda yine 284 kodlu suş ile fermente edilmiş zeytin posası kullanılabilmektedir. Bununla birlikte, TY'de FZP takviyesinin doğrudan etkisi, tavuk sağlığı üzerindeki etkisi ve ek olarak verimliliği hakkında daha net bir fikir edinmek ve ayrıca 284 kodlu *R. oryzae* suşunun probiyotik özellikleri doğrudan piliç ile üzerinde in vivo olarak test edilmelidir. Bunu gerçekleştirmek için üç ana adım atılmalıdır: 1- *R. oryzae* suşlarının hem kümes hayvanlarında hem de insanlarda kullanılan geniş spektrumlu antibiyotiklere karşı antibiyotik direnci hem de kolesterol asimilasyonu dahil olmak üzere ek probiyotik özellikler açısından in vitro testi, 2- Hayvan ve insan tüketimi için güvenliklerinden tamamen emin olmak için *R. oryzae* suşlarının in vivo oral toksisite ve in vitro virülans faktörleri testi, 3- Ham tavuk yemine probiyotik olarak en iyi *R. oryzae* suşları ile takviye edilmesinin ve yemi aynı suşla fermente etmenin etkisini test etmek için hayvan deneyleri.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aarestrup, F. M.**, 1999, Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12(4), 279–85.
- Ab Jalil, A., Abdullah, N., Alimon, A. R., and Abd-Aziz, S.**, 2014, Nutrient Enhancement of Ground Sago (Metroxylon sagu Rottboll) Pith by Solid State Fermentation with *Rhizopus oligosporus* for Poultry Feed, *Journal of Food Research*, 4(2), 1.
- Abd El-Hack, M. E., Samak, D. H., Noreldin, A. E., El-Naggar, K., and Abdo, M.**, 2018, Probiotics and plant-derived compounds as eco-friendly agents to inhibit microbial toxins in poultry feed: a comprehensive review, *Environmental Science and Pollution Research*, 25(32), 31971–86.
- Abdollahi, M. R., Wiltafsky-Martin, M., and Ravindran, V.**, 2021, Application of apparent metabolizable energy versus nitrogen-corrected apparent metabolizable energy in poultry feed formulations: A continuing conundrum, *Animals*, 11(8), 1–15.
- Abo-Omar J**, 2005, Carcass composition and visceral organ mass of broiler chicks fed different levels of olive pulp, *J Islamic Univ Gaza*, 13:75–84.
- Ibrahim, A.D., Farouq, A.A., Muazu, A.J., Mahmuda, A., Aliyu, R.M., Saâ, M. and Aliero, A.A.**, 2018, Effects of Replacing Maize with *Rhizopus Oryzae* Fermented Mangifera Indica Seed Kernels on Broilers Chicken Growth Performance, *Nutrition & Food Science International Journal*, 4(5), 2–6.
- Afolabi, S. S., Oyeyode, J. O., Shafik, W., Sunusi, Z. A., and Adeyemi, A. A.**, 2021, Proximate Analysis of Poultry-Mix Formed Feed Using Maize Bran as a Base, *International Journal of Analytical Chemistry*, 2021(7).
- Al-Arif, M. A., Suwanti, L. T., Estoepangestie, A. S., and Lamid, M.**, 2017,

The Nutrients Contents, Dry Matter Digestibility, Organic Matter Digestibility, Total Digestible Nutrient, and NH₃ Ruminal Production of Three Kinds of Cattle Feeding Models, *KnE Life Sciences*, 3(6), 338.

Al-harhi, M. A., El-deek, A. A., Yakout, H. M., and Al-refaee, M., 2009, Mohamed A. Al-Harhi + , Ahmed A. El-Deek + , Haitham M. Yakout , and Maged AL-Refae + , *Japan poultry science association*.

Al-Harhi, M. A., 2016, The efficacy of using olive cake as a by-product in broiler feeding with or without yeast, *Italian Journal of Animal Science*, 15(3), 512–20.

Aldayyat, E. A., Saidan, M. N., Al-Hamamre, Z., Al-Addous, M., and Alkasrawi, M., 2021, Pyrolysis of solid waste for bio-oil and char production in refugees' camp: A case study, *Energies*, 14(13), 1–11.

Allievi, F., Vinnari, M., and Luukkanen, J., 2015, Meat consumption and production - Analysis of efficiency, sufficiency and consistency of global trends, *Journal of Cleaner Production*, 92, 142–51.

Anadón, A., Rosa Martínez-Larrañaga, M., and Aranzazu Martínez, M., 2006, Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45(1), 91–5.

Andremon, A., 2000, Conséquences de l'antibiothérapie sur l'écosystème intestinal, *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 19(5), 395–402.

Apata, D. F., 2011, Effect of Terminalia catappa Fruit Meal Fermented by *Aspergillus niger* as Replacement of Maize on Growth Performance, Nutrient Digestibility, and Serum Biochemical Profile of Broiler Chickens , *Biotechnology Research International*, 2011, 1–6.

Aro, S. O., 2008, Improvement in the nutritive quality of cassava and its by-products through microbial fermentation, *African Journal of Biotechnology*,

7(25), 4789–97.

Arora, D. S., and Chandra, P., 2010, Assay of antioxidant potential of two *Aspergillus* isolates by different methods under various physio-chemical conditions, *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3), 765–77.

Atilgan, C., and Çiçek, Ş. K., 2021, Hayvanların Beslenmesinde Probiyotik ve Prebiyotiklerin Önemi ve Sağlık Üzerine Etkileri Importance of Probiotics and Prebiotics in Animal Nutrition and Their Effects on Health, 10(2146–8168), 24–35.

Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibnsouda, S. K., 2016, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–9.

Barzegar, S., Wu, S. B., Choct, M., and Swick, R. A., 2020, Factors affecting energy metabolism and evaluating net energy of poultry feed, *Poultry Science*, 99(1), 487–98.

Baumann, U., Bisping, B., 1995. Proteolysis during tempe fermentation. *Food Microbiol.* 12 (0), 39–47.

Bayitse, R., Hou, X., Laryea, G., and Bjerre, A. B., 2015, Protein enrichment of cassava residue using *Trichoderma pseudokoningii* (ATCC 26801), *AMB Express*, 5(1), 1–6.

Beski, S. S. M., Swick, R. A., and Iji, P. A., 2015, Specialized protein products in broiler chicken nutrition: A review, *Animal Nutrition*, 1(2), 47–53.

Bhanja Dey, T., and Kuhad, R. C., 2014, Upgrading the antioxidant potential of cereals by their fungal fermentation under solid-state cultivation conditions, *Letters in Applied Microbiology*, 59(5), 493–9.

Bierbaum, G. & Sahl, H.-G., 2009, Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1): 2–18.

- Bilginer, H., and Çetin, B.,** 2019, Probiyotikler ve Belirlenmelerinde Kullanılan in vitro Testler, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50(3), 312–25.
- Birol, D., ve Gunyar, O. A.,** 2021, Investigation of presence of endofungal bacteria in *Rhizopus* spp. isolated from the different food samples, *Archives of Microbiology*, 2251(4).
- Bonneville, S., Delpomdor, F., Preat, A., Chevalier, C., Araki, T., Kazemian, M., Steele, A., Schreiber, A., Wirth, R., and Benning, L. G.,** 2020, Molecular identification of fungi microfossils in a Neoproterozoic shale rock, *Science Advances*, 6(4).
- Borda-Molina, D., Seifert, J., and Camarinha-Silva, A.,** 2018, Current Perspectives of the Chicken Gastrointestinal Tract and Its Microbiome, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 16, 131–9.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I. B., Prajapati, J. B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijelaars, S., and Hansen, E. B.,** 2012, Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use, *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 87–97.
- Brozzoli, V., Bartocci, S., Terramoccia, S., Contò, G., Federici, F., D’Annibale, A., and Petruccioli, M.,** 2010, Stoned olive pomace fermentation with *Pleurotus* species and its evaluation as a possible animal feed, *Enzyme and Microbial Technology*, 46(3–4), 223–8.
- Burlingame, B., Nishida, C., Uauy, R. and Weisell, R.,** 2009, Fats and fatty acids in human nutrition: introduction, *Annals of Nutrition and Metabolism*, 55(1-3), pp.5-7.
- Büyükgök, E. B., ve Saygin Gümüşkesen, A.,** 2017, Influence of Olive Ripeness Degree and Harvest Year on Chemical and Sensory Properties of Kilis Yağlık and Memecik Olive Oil, *Gıda / the Journal of Food*, 42, 799–808.

- Cai, S., Wang, O., Wu, W., Zhu, S., Zhou, F., Ji, B., Gao, F., Zhang, D., Liu, J., and Cheng, Q.,** 2012, Comparative study of the effects of solid-state fermentation with three filamentous fungi on the total phenolics content (TPC), flavonoids, and antioxidant activities of subfractions from oats (*Avena sativa* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), 507–13.
- Candela, C.G., López, L.B. and Kohen, V.L.,** 2011, Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health. Nutritional recommendations, *Nutricion hospitalaria*, 26(2), pp.323-329.
- Canini, F., Zucconi, L., Pacelli, C., Selbmann, L., Onofri, S., and Geml, J.,** 2019, Vegetation, pH and Water Content as Main Factors for Shaping Fungal Richness, Community Composition and Functional Guilds Distribution in Soils of Western Greenland, *Frontiers in Microbiology*, 10(October), 1–16.
- Cantabrana, I., Perise, R., and Hernández, I.,** 2015, Uses of *Rhizopus oryzae* in the kitchen, *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 2(2), 103–11.
- Cárdeno, A., Sánchez-Hidalgo, M., and Alarcón-de-la-Lastra, C.,** 2013, An Up-date of Olive Oil Phenols in Inflammation and Cancer: Molecular Mechanisms and Clinical Implications, *Current Medicinal Chemistry*, 20(37), 4758–76.
- Carrasco, J. M. D., Casanova, N. A., and Miyakawa, M. E. F.,** 2019, Microbiota, gut health and chicken productivity: What is the connection?, *Microorganisms*, 7(10), 1–15.
- Cetingul, I. S., and Yardimci, M.,** 2008, The Importance of Fats in Farm Animal Nutrition, *Kocatepe Vet. J.*, 1, 77–81.
- Chebaibi, S., Leriche Grandchamp, M., Burgé, G., Clément, T., Allais, F., and Laziri, F.,** 2019, Improvement of protein content and decrease of anti-nutritional factors in olive cake by solid-state fermentation: A way to

valorize this industrial by-product in animal feed, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 128(3), 384–90.

Cheikhyoussef, A., Pogori, N., Chen, W. & Zhang, H., 2008, Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application, *International Journal of Food Microbiology*, 125(3): 215–222.

Chiofalo, B., Liotta, L., Zumbo, A., and Chiofalo, V., 2004, Administration of olive cake for ewe feeding: Effect on milk yield and composition, *Small Ruminant Research*, 55(1–3), 169–76.

Choi, Y. J., Lee, S. R., and Oh, J. W., 2014, Effects of dietary fermented seaweed and seaweed fusiforme on growth performance, carcass parameters and immunoglobulin concentration in broiler chicks, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(6), 862–70.

Christodoulou, V., Bampidis, V. A., Robinson, P. H., Israilides, C. J., Giouzelyiannis, A., and Vlyssides, A., 2007, Nutritional and net energy value of fermented olive wastes in rations of lactating ewes, *Czech Journal of Animal Science*, 52(12), 456–62.

Commane, D.M., Shortt, C.T., Silvi, S., Cresci, A., Hughes, R.M. & Rowland, I.R., 2005, Effects of fermentation products of pro-and prebiotics on trans-epithelial electrical resistance in an in vitro model of the colon, *Nutr. Cancer* 51(1): 102-109. *Nutrition and Cancer-An International Journal*, 51(1): 102–109.

Cotter, P. D., Hill, C. & Ross, R.P., 2005, Bacteriocins: developing innate immunity for food, *Nature Reviews in Microbiology*, 3(10): 777–788.

Dai, Z., Cui, L., Li, J., Wang, B., Guo, L., Wu, Z., Zhu, W., and Wu, G., 2019, Fermentation techniques in feed production, *Animal Agriculture: Sustainability, Challenges and Innovations*, 407–29.

Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T. A., and Qin, W., 2010, Fungal

biodegradation and enzymatic modification of lignin, *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1(1), 36–50.

Daskiran, M., Onol, A. G., Cengiz, O., Unsal, H., Turkyilmaz, S., Tatli, O. & Sevim, O., 2012, Influence of dietary probiotic inclusion on growth performance, blood parameters, and intestinal microflora of male broiler chickens exposed to posthatch holding time. *Journal of Applied Poultry Research*, 21(3): 612–622.

Dawood, M. A. O., Magouz, F. I., Mansour, M., Saleh, A. A., Asely, A. M. E., Fadl, S. E., Ahmed, H. A., Al-Ghanim, K. A., Mahboob, S., and Al-Misned, F., 2020, Evaluation of Yeast Fermented Poultry By-Product Meal in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Feed: Effects on Growth Performance, Digestive Enzymes Activity, Innate Immunity, and Antioxidant Capacity, *Frontiers in Veterinary Science*, 6(February).

De Gregorio A, Mandalari G, Arena N, Nucita F, Tripodo MM, Lo Curto R., 2002, Single cell protein and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps, *Bioresour. Technol.*, 83(2): 89-94.

Delgado Adámez, J., Gamero Samino, E., Valdés Sánchez, E., and González-Gómez, D., 2012, In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.), *Food Control*, 24(1–2), 136–41.

Denardi-Souza, T., Massarolo, K. C., Tralamazza, S. M., and Badiale-Furlong, E., 2018, Monitoreo de la biomasa micótica modificada por *Rhizopus oryzae* en relación con el perfil de aminoácidos y ácidos grasos esenciales de harina de soya (soja), trigo y arroz, *CYTA - Journal of Food*, 16(1), 156–64.

Denter, J., Rehm, H.-J., Bisping, B., 1998, Changes in the contents of fat-soluble vitamins and provitamins during tempe fermentation, *Int. J. Food Microbiol.*, 45 (2), 129–134.

Dhama, K., Verma, V., Sawant, P., Tiwari, R., Vaid, R., and Chauhan, R.,

2011a, Applications of Probiotics in Poultry: Enhancing Immunity and Beneficial Effects on Production Performances and Health - A Review, *Journal of Immunology and Immunopathology*, 13(1), 1–19.

Dhama, K., Verma, V., Sawant, P. M., Tiwari, R., Vaid, R. K., and Chauhan, R. S., 2011b, Applications of Probiotics in Poultry: Enhancing Immunity and Beneficial Effects on Production Performances and Health - A Review, *Journal of Immunology and Immunopathology*, 13(1), 1–19.

Dhillon, G. S., Kaur, S., and Brar, S. K., 2013, Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 789–805.

Dierick, N. A., 1989, Biotechnology aids to improve feed and feed digestion: enzymes and fermentation., *Archiv für Tierernährung*, 39(3), 241–61.

Dijksterhuis, J., and Samson, R. A., 2006, Zygomycetes, *Food spoilage microorganisms*, 415–36.

Dinesh Babu, P., Bhakayaraj, R., Vildhyalakshmi, R., 2009, A low cost nutritious food “tempeh”– A review, *World J. Dairy Food Sci.*, 4 (1), 222–227.

Doğan-Sağlamtimur, N., Bilgil, A., Szechyńska-Hebda, M., Parzych, S., and Hebda, M., 2021, Eco-friendly fired brick produced from industrial ash and natural clay: A study of waste reuse, *Materials*, 14(4), 1–15.

Dolatabadi, S., Scherlach, K., Figge, M., Hertweck, C., Dijksterhuis, J., Menken, S. B. J., and de Hoog, G. S., 2016, Food preparation with mucoralean fungi: A potential biosafety issue?, *Fungal Biology*, 120(3), 393–401.

Early, R., 2012, Dairy products and milk-based food ingredients, *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings*, 417–45.

- Eid, Y. Z., Ebeid, T. A., Badawi, N., and Hayashi, K.,** 2010, Effect of *Aspergillus Niger* on Broilers(30), 1017–29.
- Eleroğlu, H., and Yildirim, A.,** 2014, Organik Tavukçulukta Mera Kompozisyonu , Be sleme ve Barındırma Teknikleri * Pastures Composition , Feeding and Housing Techniques in Organic Poultry, 11(1), 21–7.
- Ezekiel, Aworh, O. C., Blaschek, H. P., and Ezeji, T. C.,** 2010, Protein enrichment of cassava peel by submerged fermentation with *Trichoderma viride* (ATCC 36316), *African Journal of Biotechnology*, 9(2), 187–94.
- Ezekiel, O.O. and Aworh, O.C.,** 2013, Solid state fermentation of cassava peel with *trichoderma viride* (ATCC 36316) for protein enrichment.
- Ezema,** 2013, Probiotics in animal production : A review, *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 5(11), 308–16.
- Fadel, M., and El-Ghonemy, D. H.,** 2015, Biological fungal treatment of olive cake for better utilization in ruminants nutrition in Egypt, *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 4(4), 261–71.
- Fajardo, P., Pastrana, L., Mendez, J., Rodriguez, I., Fucinos, C. & Guerra, N. P.,** 2012, Effects of feeding of two potentially probiotic preparations from lactic acid bacteria on the performance and faecal microflora of broiler chickens, *Scientific World Journal*, Art. No. 562635.
- Falconer, T. M., Kern, S. E., Brzezinski, J. L., Turner, J. A., Boyd, B. L., and Litzau, J. J.,** 2017, Identification of the potent toxin bongkreikic acid in a traditional African beverage linked to a fatal outbreak, *Forensic Science International*, 270, e5–11.
- FAO/WHO,** 2001, Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria; FAO/WHO: American Córdoba Park Hotel, Córdoba,

Argentina, pp. 1-34.

Farag, M. D., Khayyal, E. D., El-Sayaad, A. A., & Mekawy, H. M. S., 2010, Effect of feeding diets containing irradiated olive cake on carcass traits and blood haemato- logical parameters of growing New Zealand White rabbits, *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*, 13(3), 519–531.

Fas, A., Adeyemi, O.A., Oluwole, O.B., Oladunmoye, O.O., Ayo-Ajasa, O.Y., Anuoluwatelemini, J.O., 2015, Effects of Treated Banana Peel Meal on the Feed Efficiency, Digestibility and Cost Effectiveness of Broiler Chickens Diet, *J Vet Sci Anim Husbandry*, 1.

Fatmawati, A., Agustriyanto, R., and Liasari, Y., 2013, Enzymatic hydrolysis of alkaline pretreated coconut coir, *Bulletin of Chemical Reaction Engineering and Catalysis*, 8(1), 34–9.

Fatmawati, A., Lidiawati, T., Hadinata, S., and Adiarto, M., 2018, Solid-state fermentation of banana peels potential study for feed additive, *MATEC Web of Conferences*, 215.

Fayol-Messaoudi, D., Berger, C.N., Coconnier-Polter, M.-H., Lievin-Le Moal, V. & Servin, A.L., 2005, pH-, Lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic *Lactobacilli* against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, *Applied Environmental Microbiology*, 71(10): 6008–6013.

FDA, 2018. *GRAS Notice 783* | *FDA*. [online] Available at: <https://www.fda.gov/media/129971> (Erişim tarihi 12 May 2019).

Fellenberg, M. A., and Speisky, H., 2006, Antioxidants: Their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability, *World's Poultry Science Journal*, 62(1).

Femenía-Ríos, M., García-Pajón, C. M., Hernández-Galán, R., Macías-Sánchez, A. J., and Collado, I. G., 2006, Synthesis and free radical scavenging activity of a novel metabolite from the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 16(22), 5836–9.

- Flynn, S., van Sinderen, D., Thornton, G.M., Holo, H., Nes, I.F. & Collins, J.K.,** 2002, Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118, *Microbiology*, 148(4): 973–984.
- Fry, J. P., Mailloux, N. A., Love, D. C., Milli, M. C., and Cao, L.,** 2018, Feed conversion efficiency in aquaculture: Do we measure it correctly?, *Environmental Research Letters*, 13(2).
- Gao, F., Cai, S., Robert Nout, M. J., Wang, Y., Xia, Y., Li, Y., and Ji, B.,** 2012, Production of oat-based synbiotic beverage by two-stage fermentation with *Rhizopus oryzae* and *Lactobacillus acidophilus*, *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10(2), 175–9.
- Gerasopoulos, K., Stagos, D., Kokkas, S., Petrotos, K., Kantas, D., Goulas, P., and Kouretas, D.,** 2015, Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens, *Food and Chemical Toxicology*, 82, 42–9.
- Ghaemmaghami, S. S., Modirsaneii, M., Khosravi, A. R., and Razzaghi-Abyaneh, M.,** 2016, Study on mycoflora of poultry feed ingredients and finished feed in Iran, *Iranian Journal of Microbiology*, 8(1), 47–54.
- Godfray, H. C. J., Aveyard, P., Garnett, T., Hall, J. W., Key, T. J., Lorimer, J., Pierrehumbert, R. T., Scarborough, P., Springmann, M., and Jebb, S. A.,** 2018, Meat consumption, health, and the environment, *Science (New York, N.Y.)*, 361(6399).
- Gökçebağ, M., Diraman, H., and Özdemir, D.,** 2013, Classification of Turkish monocultivar (Ayvalık and Memecik cv.) Virgin olive oils from north and south zones of Aegean region based on their triacylglycerol profiles, *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(11), 1661–71.
- Graminha, E. B. N., Gonçalves, A. Z. L., Pirota, R. D. P. B., Balsalobre, M.**

A. A., Da Silva, R., and Gomes, E., 2008, Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition, *Animal Feed Science and Technology*, 144(1–2), 1–22.

Groschwitz, K.R. & Hogan, S.P., 2009, Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(1): 3–20.

Guneser, O., Demirkol, A., Yuceer, Y. K., Togay, S. O., Hosoglu, M. I., and Elibol, M., 2017, Production of flavor compounds from olive mill waste by *Rhizopus oryzae* and *Candida tropicalis*, *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(2), 275–85.

El Hachemi, A., El Mecherfi, K. E., Benzineb, K., Saidi, D., and Kheroua, O., 2007, Supplementation of olive mill wastes in broiler chicken feeding, *African Journal of Biotechnology*, 6(15), 1848–53.

Haddadin, M. S., Abdulrahim, S. M., Al-Khawaldeh, G. Y., and Robinson, R. K., 1999, Solid state fermentation of waste pomace from olive processing, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(7), 613–8.

Haghighi, H. R., Abdul-Careem, M. F., Dara, R. A., Chambers, J. R., and Sharif, S., 2008, Cytokine gene expression in chicken cecal tonsils following treatment with probiotics and *Salmonella* infection, *Veterinary Microbiology*, 126(1–3), 225–33.

Hajjaj, H., Duboc, P., Fay, L. B., Zbinden, I., Macé, K., and Niederberger, P., 2005, *Aspergillus oryzae* produces compounds inhibiting cholesterol biosynthesis downstream of dihydrolanosterol, *FEMS Microbiology Letters*, 242(1), 155–9.

Hameed, A., Hussain, S. A., Yang, J., Ijaz, M. U., Liu, Q., Suleria, H. A. R., and Song, Y., 2017, Antioxidants potential of the filamentous fungi (*Mucor circinelloides*), *Nutrients*, 9(10), 1–20.

- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I., Diep, D. & Lotfipour, F.,** 2012, Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance, *Journal of Applied Microbiology*, 113(4): 723–736.
- Hatta, U., Sjöfjan, O., Subagiyo, I., Sundu, B.,** 2014, Effects of fermentation by *Trichoderma viride* on nutritive value of copra meal, cellulase activity and performance of broiler chickens, *Livest. Res. Rural. Dev.*, 26, 61.
- Hernández, J.L. and Buckley, C.J.,** 2019, Mucormycosis.
- Herwig, E., Abbott, D., Schwean-Lardner, K. V., and Classen, H. L.,** 2019, Effect of rate and extent of starch digestion on broiler chicken performance, *Poultry Science*, 98(9), 3676–84.
- Higgins, S. E., Higgins, J. P., Wolfenden, A. D., Henderson, S. N., Torres-Rodriguez, A., Tellez, G., and Hargis, B.,** 2008, Evaluation of a *Lactobacillus*-based probiotic culture for the reduction of *Salmonella* enteritidis in neonatal broiler chicks, *Poultry Science*, 87(1), 27–31.
- Hoffmann, D.E., Fraser-Liggett, C.M., Palumbo, F.B., Ravel, J., Rothenberg, K.H. & Rowthorn, V.,** 2013, Probiotics: Finding the right regulatory balance. http://digitalcommons.law.umaryland.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2401&context=fac_publications Accessed 23 November 2014.
- Hong, K. J., Lee, C. H., and Sung, W. K.,** 2004, *Aspergillus oryzae* GB-107 fermentation improves nutritional quality of food soybeans and feed soybean meals, *Journal of Medicinal Food*, 7(4), 430–5.
- Huang, M. K., Choi, Y. J., Houde, R., Lee, J. W., Lee, B., and Zhao, X.,** 2004, Effects of lactobacilli and an acidophilic fungus on the production performance and immune responses in broiler chickens, *Poultry Science*, 83(5), 788–95.
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Hyde, K.D., Corke, H., Sun, M.,** 2007, Endophytic

fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity, *World J. Microbiol. Biotechnol*, 23, 1253–1263.

Hughes, D.T. & Sperandio, V., 2008, Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts, *Nature Reviews in Microbiology*, 6(2): 111–120.

Hung, A.T., Lin, S.-Y., Yang, T.-Y., Chou, C.-K., Liu, H.-C., Lu, J.-J., Wang, B., Chen, S.-Y. & Lien, T.-F., 2012, Effects of *Bacillus coagulans* ATCC 7050 on growth performance, intestinal morphology, and microflora composition in broiler chickens, *Animal Production Science*, 52(9): 874–879.

Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y. C., Choi, I., and Kim, G. B., 2014, Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods, *Food Chemistry*, 160, 346–56.

Hussein, A. S., Al Ghurair, J., John, P. G. K., Habib, H. M., and Sulaiman, M., 2016, Graded levels of sugar syrup in broiler rations and its effect on growth performance and blood biochemical parameters, *Animal Nutrition*, 2(3), 180–5.

Ibarruri, J., and Hernández, I., 2018, *Rhizopus oryzae* as Fermentation Agent in Food Derived Sub-products, *Waste and Biomass Valorization*, 9(11), 2107–15.

Ibrahim, N. S., Sabic, E. M., and Abu-Taleb, A. M., 2018, Effect of inclusion irradiated olive pulp in laying quail diets on biological performance, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 11(4), 340–6.

International olive council, 2022 <https://www.internationaloliveoil.org/> (Erişim tarihi 04 Eylül 2022)

Isroli, I., Yudiarti, T., and Sugiharto, S., 2017, Gambaran Biokimia dan Leukosit Darah Ayam Kampung Umur 25 Hari yang Diberi Probiotik Fungi *Rhizopus oryzae* (biochemical and blood leukocytes descriptions of 25 days

age of kampong chicken feedwith fungi), *Jurnal Veteriner*, 18(1), 46–50.

Izzaty, R.E., Astuti, B., Cholimah, N., 1967, Fungal Biology, *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952.

Jagtap, N., Ranadive, K. R., Belsare, M. H., Deokule, S. S., Jagtap, N. V., Jadhav, H. K., and Vaidya, J. G., 2013, Glimpses of antimicrobial activity of fungi from World, *Journal on New Biological Reports*, 2(2), 142–62.

Jannathulla, R., Dayal, J. S., Ambasankar, K., Yuvarpushpa, R., Kumar, J. A., and Muralidhar, M., 2019, Evaluation of Fungal Fermented Rapeseed Meal as a Fishmeal Substitute in the Diet of *Penaeus vannamei*, *Journal of Coastal Research*, 86(sp1), 82–9.

Jha, R., Das, R., Oak, S., and Mishra, P., 2020, Growth and Laying Performance , and Gut Health :, *animals*, 1–18.

Jin, B., Zepf, F., Bai, Z., Gao, B., and Zhu, N., 2016, A biotech-systematic approach to select fungi for bioconversion of winery biomass wastes to nutrient-rich feed, *Process Safety and Environmental Protection*, 103, 60–8.

Joseph, I., Raj, R. P., and Bhatnagar, D., 2008, Effect of solid state fermentation on nutrient composition of selected feed ingredients, 55(4), 327–32.

Joshi, R., Sharma, V., and Kuila, A., 2018, Part I PRINCIPLES OF FERMENTATION Fermentation Technology : Current Status and Future Prospects, *Principles and Applications of Fermentation Technology*, 1–13.

K. D. Pratiwi, S. dan T. Y., 2014, Pengaruh penambahan probiotik, 3(3), 483-91.

Kabir, S. M. L., 2009, The role of probiotics in the poultry industry, *International Journal of Molecular Sciences*, 10(8), 3531–46.

Kadaikunnan, S., Rejiniemon, S. S., Khaled, J. M., Alharbi, N. S., and

Mothana, R., 2015, In-vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and functional properties of *Bacillus amyloliquefaciens*, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(1), 1–11.

Kang, H. Y., Yang, P. Y., Dominy, W. G., and Lee, C. S., 2010, Bioprocessing papaya processing waste for potential aquaculture feed supplement - Economic and nutrient analysis with shrimp feeding trial, *Bioresource Technology*, 101(20), 7973–9.

Kapellakis, I. E., Paranychianakis, N. V., Tsagarakis, K. P., and Angelakis, A. N., 2012, Treatment of olive mill wastewater with constructed wetlands, *Water (Switzerland)*, 4(1), 260–71.

Karimi, S., Soofiani, N. M., Lundh, T., Mahboubi, A., Kiessling, A., and Taherzadeh, M. J., 2019, Evaluation of filamentous fungal biomass cultivated on vinasse as an alternative nutrient source of fish feed: Protein, lipid, and mineral composition, *Fermentation*, 5(4).

Kazda, M., Langer, S., and Bengelsdorf, F. R., 2014, Fungi open new possibilities for anaerobic fermentation of organic residues, *Energy, Sustainability and Society*, 4(1), 1–9.

Khempaka, S., Thongkratok, R., Okrathok, S., and Molee, W., 2014, An evaluation of cassava pulp feedstuff fermented with *a. oryzae*, on growth performance, nutrient digestibility and carcass quality of broilers, *Journal of Poultry Science*, 51(1), 71–9.

Klasing, K. C., 2005, Poultry nutrition: A comparative approach, *J. Appl. Poult. Res.*, 14:426–436.

Kleyn, F. J., and Ciacchiariello, M., 2021, Future demands of the poultry industry: will we meet our commitments sustainably in developed and developing economies?, *World's Poultry Science Journal*, 77(2), 267–78.

Kralik, G., Kralik, Z., Grčević, M., and Hanžek, D., 2018, Quality of Chicken

Meat, *Animal Husbandry and Nutrition*, 63.

Krishna, C., 2005, Solid-state fermentation systems - An overview, *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(1–2), 1–30.

Krysiak, K., Konkol, D., and Korczyński, M., 2021, Review overview of the use of probiotics in poultry production, *Animals*, 11(6), 1–24.

Kupski, L., de Carvalho Silvello, M. A., Fontes, M. R. V., Lima, T. S., Treichel, H., and Badiale Furlong, E., 2015, R. Oryzae cellulases: A new approach to degrading lignocellulosic material, *Journal of Food Biochemistry*, 39(2), 129–38.

Lackner, G., Möbius, N., Scherlach, K., Partida-Martinez, L. P., Winkler, R., Schmitt, I., and Hertweck, C., 2009, Global distribution and evolution of a Toxinogenic burkholderia-rhizopus symbiosis, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9), 2982–6.

Lackner, G., Moebius, N., Partida-Martinez, L. P., Boland, S., and Hertweck, C., 2011, Evolution of an endofungal Lifestyle: Deductions from the Burkholderia rhizoxinica Genome, *BMC Genomics*, 12.

Lackner, G., and Hertweck, C., 2011, Impact of endofungal bacteria on infection biology, food safety, and drug development, *PLoS Pathogens*, 7(6), 5–8.

Lado, K., Sube, L., Daniel, J., Lako, W., Stephen, C., Lumori, G., Yengkopiong, J. P., Augustino, J., Utong, M., Binyason, S. A., Samuel, Y., Ngerja, L., Kalisto Moilinga, M., Lado, T. F., and Kheiralla, A. H., 2020, Diversity and distribution of medicinal plants in the republic of South Sudan, *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 2020(01), 2581–9615.

Lateef, A., Oloke, J. K., Gueguim Kana, E. B., Oyeniya, S. O., Onifade, O. R., Oyeleye, A. O., Oladosu, O. C., and Oyelami, A. O., 2008, Improving the

quality of agro-wastes by solid-state fermentation: Enhanced antioxidant activities and nutritional qualities, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10), 2369–74.

Le Marrec, C., Hyronimus, B., Bressollier, P., Verneuil, B. & Urdaci, M.C., 2000, Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new anti-listerial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I4, *Applied Environmental Microbiology*, 66(12): 5213–5220.

Lee, K., Lillehoj, H. S., and Siragusa, G. R., 2010, Direct-fed microbials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens, *Journal of Poultry Science*, 47(2), 106–14.

Lee, K. W., Soo, K. L., and Bong, D. L., 2006, *Aspergillus oryzae* as probiotic in poultry - A review, *International Journal of Poultry Science*, 5(1), 1–3.

Lee, S. H., Lillehoj, H. S., Dalloul, R. A., Park, D. W., Hong, Y. H., and Lin, J. J., 2007, Influence of *Pedococcus*-based probiotic on coccidiosis in broiler chickens, *Poultry Science*, 86(1), 63–6.

Lian, W. C., Hsiao, H. C., and Chou, C. C., 2003, Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution, *International Journal of Food Microbiology*, 86(3), 293–301.

Lin, J., Sahin, O., Michel, L. O., and Zhang, Q., 2003, Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*, *Infection and Immunity*, 71(8), 4250–9.

Liu, D., Coloe, S., Baird, R., and Pedersen, J., 2000, Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR [5], *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 471.

Lodemann, U., 2010, Effects of Probiotics on Intestinal Transport and Epithelial Barrier Function. pp. 303 et seq. in: *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*, Academic Press, Waltham, USA.

- Londoño-Hernández, L., Ramírez-Toro, C., Ruiz, H. A., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilar-Gonzalez, M. A., Rodríguez-Herrera, R., and Aguilar, C. N.,** 2017, *Rhizopus oryzae* – Ancient microbial resource with importance in modern food industry, *International Journal of Food Microbiology*, 257, 110–27.
- López, E., Deive, F. J., Longo, M. A., and Sanromán, M. A.,** 2010, Strategies for utilisation of food-processing wastes to produce lipases in solid-state cultures of *Rhizopus oryzae*, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(8), 929–35.
- Lugauskas, A., and Krikštaponis, A.,** 2004, Microscopic fungi found in the libraries of Vilnius and factors affecting their development, *Indoor and Built Environment*, 13(3), 169–82.
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G., and Bhat, M. K.,** 2000, Thermophilic Fungi : Their Physiology and Enzymes †, 64(3), 461–88.
- Makkar, H. P. S.,** 2018, Review: Feed demand landscape and implications of food-not feed strategy for food security and climate change, *Animal*, 12(8), 1744–54.
- Mandey, J. S., Tulung, B., Leke, J. R., and Sondakh, B. F. J.,** 2018, Performance and carcass quality of broiler chickens fed diet containing pineapple waste meal fermented by “ragi tape,” *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 102(1).
- Marangoni, F., Corsello, G., Cricelli, C., Ferrara, N., Ghiselli, A., Lucchin, L., and Poli, A.,** 2015, Role of poultry meat in a balanced diet aimed at maintaining health and wellbeing: An Italian consensus document, *Food and Nutrition Research*, 59, 1–11.
- Marzuki, M. A., Babji, A. S., and Hassan, H.,** 2008, Protein quality of

Aspergillus niger fermented palm kernel cake, *Journal Trop. Agric and Fd. Sc.*, 36(2), 1–11.

Massi, P. A., Lima, C. A. R., Machado, N. J. B., Dilelis, F., Brasil, R. J. M., Corrêa, G. S. S., and Curvello, F. A., 2018, Metabolizable energy for broilers with different genetic growth potentials under a free-range system, *Boletim de Indústria Animal*, 75(75).

Medellin-Peña, M.J., Wang, H., Johnson, R., Anand, S. & Griffiths, M.W., 2007, Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157: H7, *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13): 4259–4267.

Mersmann, H. J., 1998, Lipoprotein and Hormone-Sensitive Lipases in Porcine Adipose Tissue, *Journal of Animal Science*, 76(5), 1396–404.

Mgbeahuruike, A. C., Ejiofor, T. E., Ashang, M. U., Ojiako, C., Obasi, C. C., Ezema, C., Okoroafor, O., Mwanza, M., Karlsson, M., and Chah, K. F., 2021, Reduction of the adverse impacts of fungal mycotoxin on proximate composition of feed and growth performance in broilers by combined adsorbents, *Toxins*, 13(6), 1–14.

Miller, M.B. & Bassler, B.L., 2001, Quorum sensing in bacteria, *Annual Review of Microbiology*, 55(1): 165–199.

Missotten, J. A. M., Michiels, J., Degroote, J., and De Smet, S., 2015, Fermented liquid feed for pigs: An ancient technique for the future, *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6(1), 1–9.

Moebius, N., Üzümlü, Z., Dijksterhuis, J., Lackner, G., and Hertweck, C., 2014, Active invasion of bacteria into living fungal cells, *eLife*, 3, e03007.

Montagne, L., Pluske, J. R., and Hampson, D. J., 2003, A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals, *Animal Feed Science and Technology*, 108(1–4), 95–117.

- Moon, B.S., Ryoo, I.J., Yun, B.S., Bae, K.S., Lee, K.D., Yoo, I.D., Kim, J.P.,** 2006, Glyscavins A, B and C, new phenolic glycoside antioxidants produced by a fungus *Mycelia sterilia* F020054, *J. Antibiot.*, 59, 735–739.
- Mota de Carvalho, N., Oliveira, D. L., Saleh, M. A. D., Pintado, M. E., and Madureira, A. R.,** 2021, Importance of gastrointestinal in vitro models for the poultry industry and feed formulations, *Animal Feed Science and Technology*, 271(July 2020), 114730.
- Mottet, A., and Tempio, G.,** 2017, Global poultry production: Current state and future outlook and challenges, *World's Poultry Science Journal*, 73(2), 245–56.
- Mountzouris, K. C., Tsirtsikos, P., Kalamara, E., Nitsch, S., Schatzmayr, G., and Fegeros, K.,** 2007, Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities, *Poultry Science*, 86(2), 309–17.
- Munteanu, I. G., and Apetrei, C.,** 2021, Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7).
- Nadelman, P., Magno, M. B., da Cruz, M. F., da Cruz, A. G., Pithon, M. M., Fonseca-Gonçalves, A., and Maia, L. C.,** 2010, The effect of probiotics on oral health, *Natural Oral Care in Dental Therapy*(May), 171–95.
- Neifar, M., Jaouani, A., Ellouze-Ghorbel, R., Ellouze-Chaabouni, S., and Penninckx, M. J.,** 2009, Effect of culturing processes and copper addition on laccase production by the white-rot fungus *Fomes fomentarius* MUCL 35117, *Letters in Applied Microbiology*, 49(1), 73–8.
- Nezih Okur, Mesut Turkoglu, Hasan Eleroğlu, Serdar Ozlü, and Ahmet Ucar,** 2016, Features and New Trends in Turkish Poultry Industry, *Journal of Environmental Science and Engineering A*, 5(6).

- Nguyen, T. A. D., Kim, K. R., Han, S. J., Cho, H. Y., Kim, J. W., Park, S. M., Park, J. C., and Sim, S. J.,** 2010, Pretreatment of rice straw with ammonia and ionic liquid for lignocellulose conversion to fermentable sugars, *Bioresource Technology*, 101(19), 7432–8.
- Niba AT, Beal JD, Kudi AC, Brooks PH,** 2009, Potential of bacterial fermentation as a biosafe method of improving feeds for pigs and poultry, *Afr J Biotechnol*, 8: 1758-67.
- Nkhata, S. G., Ayua, E., Kamau, E. H., and Shingiro, J. B.,** 2018, Fermentation and germination improve nutritional value of cereals and legumes through activation of endogenous enzymes, *Food Science and Nutrition*, 6(8), 2446–58.
- Nout, M. J. R., and Kiers, J. L.,** 2005, Tempe fermentation, innovation and functionality: Update into the third millenium, *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), 789–805.
- Obadina, A. O., Oyewole, O. B., Sanni, L. O., and Abiola, S. S.,** 2006, Fungal enrichment of cassava peels proteins, *African Journal of Biotechnology*, 5(3), 302–4.
- Oduguwa, O. O., Edema, M. O., and Ayeni, A. O.,** 2008, Physico-chemical and microbiological analyses of fermented corn cob, rice bran and cowpea husk for use in composite rabbit feed, *Bioresource Technology*, 99(6), 1816–20.
- Ogbe, A. O., Atawodi, S. E., Abdu, P. A., Sannusi, A., and Itodo, A. E.,** 2009, Changes in weight gain, faecal oocyst count and packed cell volume of *Eimeria tenella*-infected broilers treated with a wild mushroom (*Ganoderma lucidum*) aqueous extract, *Journal of the South African Veterinary Association*, 80(2), 97–102.
- Ohimain, E. I., and Ofongo, R. T. S.,** 2012, The Effect of Probiotic and Prebiotic Feed Supplementation on Chicken Health and Gut Microflora : A Review, *International Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4(2),

135–43.

- Okpako CE, Ntui VO, Osuagwu AN, Obasi F.,** 2008, Proximate composition and cyanide content of cassava peels fermented with *Aspergillus niger* and *Lactobacillus rhamnos*, *J. Food Agric. Environ.*, 6(2): 251-255.
- Oliveira, M. A., Rodrigues, C., dos Reis, E. M., & Nozaki, J.,** 2001, Production of fungal protein by solid substrate fermentation of cactus *Cereus peruvianus* and *Opuntia ficus indica*, *Quimica Nova*, 24(3), 307-310.
- Olukomaiya, O., Fernando, C., Mereddy, R., Li, X., and Sultanbawa, Y.,** 2019, Solid-state fermented plant protein sources in the diets of broiler chickens: A review, *Animal Nutrition*, 5(4), 319–30.
- Panesar, R., Kaur, S., and Panesar, P. S.,** 2015, Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: A review, *Current Opinion in Food Science*, 1(1), 70–6.
- Park, J. H., Yun, H. M., and Kim, I. H.,** 2016, The effect of feeding *Rhizopus oligosporus* on growth performance, nutrient digestibility, blood profile, fecal microbiota, and fecal score in weanling pigs, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 40(6), 700–6.
- Partida-Martinez, L. P., and Hertweck, C.,** 2005, Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production, *Nature*, 437(7060), 884–8.
- Partida-Martinez, L. P., Monajembashi, S., Greulich, K. O., and Hertweck, C.,** 2007a, Endosymbiont-Dependent Host Reproduction Maintains Bacterial-Fungal Mutualism, *Current Biology*, 17(9), 773–7.
- Partida-Martinez, L. P., De Looß, C. F., Ishida, K., Ishida, M., Roth, M., Buder, K., and Hertweck, C.,** 2007b, Rhizonin, the first mycotoxin isolated from the zygomycota, is not a fungal metabolite but is produced by bacterial endosymbionts, *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 793–7.
- Partida-Martinez, L. P., Bandemer, S., Rüchel, R., Dannaoui, E., and**

Hertweck, C., 2008, Lack of evidence of endosymbiotic toxin-producing bacteria in clinical *Rhizopus* isolates, *Mycoses*, 51(3), 266–9.

Patterson, J. A., and Burkholder, K. M., 2003, Application of prebiotics and probiotics in poultry production, *Poultry Science*, 82(4), 627–31.

Peterson, L.W. & Artis, D., 2014, Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis, *Nature Reviews in Immunology*, 14(3): 141–153.

Patterson, J. A., and Burkholder, K. M., 2012, Application of prebiotics and probiotics in poultry production, *Poultry Science*, 82(4), 627–31.

Pitt, J. I., and Hocking, A. D., 2009, *Fungi and Food Spoilage 3rd Edition*, Vol. 53.

Prior, R.L., Wu, X.L., Schaich, K., 2005, Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *J. Agric. Food Chem*, 53, 4290–4430.

Ramin, M., Yaakub, H., Alimon, A. R., and Jelan, Z. A., 2011, Effects of fungal treatment on the in vitro degradation of cassava, *Livestock Research for Rural Development*, 23(7).

Rani, R., and Ghosh, S., 2011, Production of phytase under solid-state fermentation using *Rhizopus oryzae*: Novel strain improvement approach and studies on purification and characterization, *Bioresource Technology*, 102(22), 10641–9.

Rea, M.C., Clayton, E., O'Connor, P.M., Shanahan, F., Kiely, B., Ross, R.P. & Hill, C., 2007, Antimicrobial activity of lactacin 3147 against clinical *Clostridium difficile* strains. *Journal of Medical Microbiology*, 56(7): 940–946.

Renge, V. C., Khedkar, S. V, and Nandurkar, N. R., 2012, Enzyme Synthesis

By Fermentation Method : a Review, 2(6), 585–90.

Resmigazete. "Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğ".
<https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2014/04/20140419-18.html>
 (erişim tarihi: 4 Mart 2022).

Rochell, S. J., 2018, Formulation of broiler chicken feeds using distillers dried grains with solubles, *Fermentation*, 4(3).

Rohm, B., Scherlach, K., Möbius, N., Partida-Martinez, L. P., and Hertweck, C., 2010, Toxin production by bacterial endosymbionts of a *Rhizopus microsporus* strain used for tempe/sufu processing, *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 368–71.

Rosario, M., Domingues, M., 2002, Structural characterisation of underivatised olive pulp xylo-oligosaccharides by mass spectrometry using matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray ionization, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16, 2124–2132.

Rostika, R., and Safitri, R., 2012, Influence of Fish Feed Containing Corn-Cob Was Fermented By *Trichoderma* Sp, *Aspergillus* Sp, *Rhizopus Oligosporus* To The Rate of Growth of Java Barb (*Puntius Gonionitus*), *APCBEE Procedia*, 2(December), 148–52.

Rowghani, E, Zamiri, M. J., Seradj, A. R., 2008, Gas Production , Energy Content and Digestibility of Olive Cake Ensiled With Additives, *Iranian Journal of Veterinary Research*, 265(3), 213–21.

Sabu, A., Sarita, S., Pandey, A., Bogar, B., Szakacs, G., and Soccol, C. R., 2002, Solid-state fermentation for production of phytase by *Rhizopus oligosporus*, *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 102–103, 251–60.

Sadh, P. K., Duhan, S., and Duhan, J. S., 2018, Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review, *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1–15.

- Saleh, A.A., Eid, Y.Z., Ebeid, T.A., Amber, K., Badawi, N., Hayashi, K.,** 2010, Effect of *Aspergillus niger* on broilers performance, Egypt, Poult. Sci., 30, 1017–1029.
- Saleh, A.A., Eid, Y.Z., Ebeid, T.A., Amber, K., Kamizono, T., Ohtsuka, A., Hayashi, K.,** 2011a. *Aspergillus awamori* as probiotic in broiler chickens. In: The 9th Asia Pacific Poultry Conference, 20–2 March 2011, Taipei, Taiwan.
- Saleh, A.A., Eid, Y.Z., Ebeid, T.A., Kamizono, T., Ohtsuka, A., Hayashi, K.,** 2011b, Effects of feeding *Aspergillus awamori* and *Aspergillus niger* on growth performance and meat quality in broiler chickens, J. Poult. Sci., 48, 201–206.
- Saleh, A.A., Hayashi, K., Ijiri, D., Ohtsuka, A.,** 2014, Beneficial effects of *Aspergillus awamori* in broiler nutrition, Worlds Poult. Sci. J., 70, 857–864.
- Sánchez, C.,** 2009, Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi, *Biotechnology Advances*, 27(2), 185–94.
- Sato, K., Takahashi, K., Tohno, M., Miura, Y., Kamada, T., Ikegami, S., and Kitazawa, H.,** 2009, Immunomodulation in gut-associated lymphoid tissue of neonatal chicks by immunobiotic diets, *Poultry Science*, 88(12), 2532–8.
- Scanes C, Brant G, Ensminger M.,** 2004, Poultry science. 4th ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, p. 100-18.
- Schmitt, I., Partida-Martinez, L. P., Winkler, R., Voigt, K., Einax, E., Dölz, F., Telle, S., Wöstemeyer, J., and Hertweck, C.,** 2008, Evolution of host resistance in a toxin-producing bacterial-funga, *ISME Journal*, 2(6), 632–41.
- Scoditti, E., Capurso, C., Capurso, A., and Massaro, M.,** 2014, Vascular effects of the Mediterranean diet-Part II: Role of omega-3 fatty acids and olive oil polyphenols, *Vascular Pharmacology*, 63(3), 127–34.
- Semjon, B., Bartkovsk, M., Marcin, D., and Klempov, T.,** 2020, Effect of Solid-State Fermented Wheat Bran Performance , Fatty Acid Profile , and

Meat Quality of Broiler Chickens, 1–21.

Shabtay, A., Hadar, Y., Eitam, H., Brosh, A., Orlov, A., Tadmor, Y., Izhaki, I., and Kerem, Z., 2009, The potential of Pleurotus-treated olive mill solid waste as cattle feed, *Bioresource Technology*, 100(24), 6457–64.

Shah, N. P., 2007, Functional cultures and health benefits, *International Dairy Journal*, 17(11), 1262–77.

Shen, Y., Zhang, W., Wei, X., Zhou, G., Xia, H., and Liang, D., 2020, Analysis of polyphenolic content and antioxidant activity of four dark skin grapes, *E3S Web of Conferences*, 145, 2018–21.

Shim, Y., Ingale, S., Kim, J., Kim, K., Seo, D., Lee, S., Chae, B. & Kwon, I., 2012, A multi-microbe probiotic formulation processed at low and high drying temperatures: effects on growth performance, nutrient retention and caecal microbiology of broilers, *British Poultry Science*, 53(4): 482–490.

Shim, Y., Ingale, S., Kim, J., Kim, K., Seo, D., Lee, S., Chae, B. & Kwon, I., 2012, A multi-microbe probiotic formulation processed at low and high drying temperatures: effects on growth performance, nutrient retention and caecal microbiology of broilers, *British Poultry Science*, 53(4): 482–490.

Shrivastava, B., Jain, K. K., Kalra, A., and Kuhad, R. C., 2014, Bioprocessing of wheat straw into nutritionally rich and digested cattle feed, *Scientific Reports*, 4, 1–9.

Siegel, P. B., 2014, Evolution of the modern broiler and feed efficiency, *Annual Review of Animal Biosciences*, 2, 375–85.

Simon, J. J., Wootton, S. A., Johnson, T. J., Karki, B., Zahler, J. D., Baldwin, E. L., Berhow, M., Croat, J. R., and Gibbons, W. R., 2017, Solid State Fermentation of Carinata (*Brassica carinata*) Meal Using Various Fungal Strains to Produce a Protein-Rich Product for Feed Application, *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 09(02), 577–82.

- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., and Tripathi, C. K. M.,** 2017, Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review, *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN).
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., and Pandey, A.,** 2009, Recent advances in solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 13–8.
- de Siqueira, F. G., de Siqueira, E. G., Jaramillo, P. M. D., Silveira, M. H. L., Andreas, J., Couto, F. A., Batista, L. R., and Filho, E. X. F.,** 2010, The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64(1), 20–6.
- Sitanggang, A. B., Sinaga, W. S. L., Wie, F., Fernando, F., and Krusong, W.,** 2020, Enhanced antioxidant activity of okara through solid state fermentation of GRAS fungi, *Food Science and Technology*, 40(1), 178–86.
- Sklan D, Noy Y.,** 2003 Functional development and intestinal absorption in the young poultry, *Br. Poult. Sci.*, 44: 651-658.
- Smith, H., Doyle, S., and Murphy, R.,** 2015, Filamentous fungi as a source of natural antioxidants, *Food Chemistry*, 185, 389–97.
- Song, T.Y., Yen, G.C.,** 2002. Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3322–3327.
- SØrum, H., and Sunde, M.,** 2001, Resistance to antibiotics in the normal flora of animals, *Veterinary Research*, 32(3–4), 227–41.
- Subramaniyam R, Vimala R.,** 2012, Solid state and submerged fermentation for the pro- duction of bioactive substances: a comparative study, *Int J Sci Nat*, 3: 480-6.
- Sugiharto, S., Yudiarti, T., and Isroli, I.,** 2015, Functional properties of filamentous fungi isolated from the indonesian fermented dried cassava, with

particular application on poultry, *Mycobiology*, 43(4), 415–22.

Sugiharto, S., Yudiarti, T., and Isroli, I., 2016, Assay of antioxidant potential of two filamentous fungi isolated from the Indonesian fermented dried cassava, *Antioxidants*, 5(1), 2–7.

Sugiharto, S., 2016, Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry, *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(2), 99–111.

Sugiharto, S., Yudiarti, T., Isroli, I., Widiastuti, E., and Dwi Putra, F., 2017, Effect of dietary supplementation with *Rhizopus oryzae* or *Chrysonilia crassa* on growth performance, blood profile, intestinal microbial population, and carcass traits in broilers exposed to heat stress, *Archives Animal Breeding*, 60(3), 347–56.

Sugiharto, S., Yudiarti, T., Isroli, I., Widiastuti, E., Wahyuni, H. I., and Sartono, T. A., 2018, The effect of fungi-origin probiotic *Chrysonilia crassa* in comparison to selected commercially used feed additives on broiler chicken performance, intestinal microbiology, and blood indices, *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 5(3), 332–42.

Sugiharto, S., 2019, A review of filamentous fungi in broiler production, *Annals of Agricultural Sciences*, 64(1), 1–8.

Sugiharto, S., and Ranjitkar, S., 2019, Recent advances in fermented feeds towards improved broiler chicken performance, gastrointestinal tract microecology and immune responses: A review, *Animal Nutrition*, 5(1), 1–10.

Svihus, B., 2014, Starch digestion capacity of poultry, *Poultry Science*, 93(9), 2394–9.

Svihus, B., and Itani, K., 2019, Intestinal Passage and Its Relation to Digestive Processes, *Journal of Applied Poultry Research*, 28(3), 546–55.

- Swain, P. K.**, 2017, Utilisation of Agriculture Waste Products for Production of Bio-Fuels: A Novel Study, *Materials Today: Proceedings*, 4(11), 11959–67.
- Swick, R. A., Wu, S., Rodgers, N., and Choct, M.**, 2014, Energy systems for broilers - recent development and relevance for feed formulation, *International Broiler Nutritionists' Conference*(March 2016).
- Taheri, H. R., Moravej, H., Tabandeh, F., Zaghari, M., and Shivazad, M.**, 2009, Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic, *Poultry Science*, 88(8), 1586–93.
- Tejeda, O. J., and Kim, W. K.**, 2021, Role of dietary fiber in poultry nutrition, *Animals*, 11(2), 1–16.
- Tosi, S., Kostadinova, N., Krumova, E., Pashova, S., Dishliiska, V., Spassova, B., Vassilev, S., Angelova, M.**, 2010, Antioxidant enzyme activity of filamentous fungi isolated from Livingston Island, Maritime Antarctica, *Polar Biol.*, 33, 1227–1237.
- Ugwuanyi, J. O., Harvey, L. M., and McNeil, B.**, 2008, Protein enrichment of corn cob heteroxylan waste slurry by thermophilic aerobic digestion using *Bacillus stearothermophilus*, *Bioresour. Technol.*, 99, 6974e6985.
- USDA Foreign Agricultural Service**, 2017, “Turkey: Poultry and Products Annual” [https:// www. fas. usda. gov/ data/ turkey- poultry- and- products- annual-0](https://www.fas.usda.gov/data/turkey-poultry-and-products-annual-0) (Erişim tarihi: 27 Ekim 2019)
- USDA Foreign Agricultural Service**, 2019, “Turkey: Poultry and Products Annual” [https:// www. fas. usda. gov/ data/ turkey- poultry- and- products- annual-0](https://www.fas.usda.gov/data/turkey-poultry-and-products-annual-0) (Erişim tarihi: 15 Nisan 2020)
- USDA Foreign Agricultural Service**, 2020, “Livestock and Products Annual Livestock and Poultry: World Markets and Trade” <https://www.fas.usda.gov/data/livestock-and-poultry-world-markets-and-trade> (Erişim tarihi: 21 Temmuz 2020)
- USDA Foreign Agricultural Service**, 2021a, “Turkey: Grain and Feed Annual”

[https:// www. fas. usda. gov/ data/ turkey- grain- and- feed- annual-5](https://www.fas.usda.gov/data/turkey-grain-and-feed-annual-5) (Erişim tarihi 7 Haziran 2021)

USDA Foreign Agricultural Service, 2021b, “Turkey: Poultry and Products Annual” [https:// www. fas. usda. gov/ data/ turkey- poultry- and- products- annual-0](https://www.fas.usda.gov/data/turkey-poultry-and-products-annual-0) (Erişim tarihi 15 Mayıs 2021)

USDA Foreign Agricultural Service, 2021c, “Turkey: Livestock and Products Annual” [https:// www. fas. usda. gov/ data/ turkey- poult ry- and- products- annual-4](https://www.fas.usda.gov/data/turkey-poultry-and-products-annual-4) (Erişim tarihi 04 Eylül 2021)

Utama, C. S., and Hanim, C., 2017, Isolation and Identification of Fungi Type From Juice of Cabbage Waste as Probiotic Agency, 324–8.

Vaarst, M., Steinfeldt, S., and Horsted, K., 2015, Sustainable development perspectives of poultry production, *World’s Poultry Science Journal*, 71(4), 609–20.

Valta, K., Aggeli, E., Papadaskalopoulou, C., Panaretou, V., Sotiropoulos, A., Malamis, D., Moustakas, K., and Haralambous, K. J., 2015, Adding Value to Olive Oil Production Through Waste and Wastewater Treatment and Valorisation: The Case of Greece, *Waste and Biomass Valorization*, 6(5), 913–25.

Vendruscolo, F., Da Silva Ribeiro, C., Esposito, E., and Ninow, J. L., 2009, Protein enrichment of apple pomace and use in feed for nile tilapia, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152(1), 74–87.

de Vries, S., 2015, Fiber in poultry nutrition: bonus or burden, *20th European Symposium on Poultry Nutrition*(September), 1–9.

Vukicevich, E., Thomas Lowery, D., Bennett, J. A., and Hart, M., 2019, Influence of groundcover vegetation, soil physicochemical properties, and irrigation practices on soil fungi in semi-arid vineyards, *Frontiers in Ecology and Evolution*.

- Wahyono, N. D., and Utami, M. M. D.,** 2018, A Review of the Poultry Meat Production Industry for Food Safety in Indonesia, *Journal of Physics: Conference Series*, 953(1).
- Waters, C. M. & Bassler, B. L.,** 2005, Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21: 319–346.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B. & Sahl, H.-G.,** 2001, Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity, *Journal of Biological Chemistry*, 276(3): 1772–1779.
- Willis, W. & Reid, L.,** 2008, Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence, *Poultry Science*, 87(4): 606–611.
- Willis, W. L., Isikhuemhen, O. S., Minor, R. C., Hurley, S., and Ohimain, E. I.,** 2010, Comparing the feeding of fungus myceliated grain with other anticoccidial control measures on oocyst excretion of *eimeria* challenged broilers, *International Journal of Poultry Science*, 9(7), 648–51.
- Wiseman, J., J. Powles, and Salvador F.,** 1998, Comparison between pigs and poultry in the prediction of the dietary energy value of fats, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 71:1–9.
- Wong, A., Ngu, D. Y. Saint, Dan, L. A., Ooi, A., and Lim, R. L. H.,** 2015, Detection of antibiotic resistance in probiotics of dietary supplements, *Nutrition Journal*.
- Wright, A.,** 2005, Regulating the Safety of Probiotics - The European Approach, *Current Pharmaceutical Design*, 11(1), 17–23.
- Wu, S. B., Swick, R. A., Noblet, J., Rodgers, N., Cadogan, D., and Choct, M.,** 2019, Net energy prediction and energy efficiency of feed for broiler

chickens, *Poultry Science*, 98(3), 1222–34.

Wu, Z., Liu, J., Chen, J., Pirzado, S. A., Li, Y., Cai, H., and Liu, G., 2020, Effects of fermentation on standardized ileal digestibility of amino acids and apparent metabolizable energy in rapeseed meal fed to broiler chickens, *Animals*, 10(10), 1–13.

Lawan Binta Y, and , Muazu AJ , Jumare FI , Mahmuda A , Gani M , Hussaini H , Dagona AG, A. S. A. and I. A., 2018, Rhizopus Oryzae May Reduce Toxic Effects of Raw Mango Seed Kernel Amendment in the Diet of Broilers, *Nutrition & Food Science International Journal*, 4(5), 1–5.

Yadav, Klieve, A. V., Dart, P. J., and Bryden, W. L., 2016, *Antibiotics in animal nutrition*, Vol. 34.

Yamamoto, M., Saleh, F., Tahir, M., Ohtsuka, A., and Hayashi, K., 2007, The Effect of Koji-feed (Fermented Distillery By-Product) on the Growth Performance and Nutrient Metabolizability in Broiler, *The Journal of Poultry Science*, 44, 291–6.

Yana Sukaryana, Y. P., 2015, The influence of Palm Kernel Cake and Rice Bran Fermentation Product Mixture to the Broiler Carcass Quality, *International Journal of Waste Resources*, 01(01), 15–7.

Yazid, N. A., Barrena, R., Komilis, D., and Sánchez, A., 2017, Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: A review, *Sustainability (Switzerland)*, 9(2), 1–28.

Yegani, M., and Korver, D. R., 2008, Factors affecting intestinal health in poultry, *Poultry Science*, 87(10), 2052–63.

Yenilmez, F., Uruk, E., and Ministry, L., 2014, Organic Poultry in Turkey Poultry Industry, *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 1(Özel Sayı-1), 1043–8.

- Yudiarti, T., Dwi, V., and Budi, Y.,** 2014, Preparation of Dried Culture of Probiotic, 4, 874–9.
- Zangeneh S, Torki M.,** 2011, Effects of B-Mannanase supplementing of olive pulp-included diet on performance of laying hens, egg quality characteristics, humoral and cellular immune response and blood parameters, *Global Vet*, 7:391–398.
- Zarei, M., Ehsani, M., and Torki, M.,** 2011, Productive performance of laying hens fed wheat-based diets included olive pulp with or without a commercial enzyme product, *African Journal of Biotechnology*, 10(20), 4303–12.
- Zhang X., Liu S., Takano T.,** 2008, Overexpression of a mitochondrial ATP synthase small subunit gene (AtMtATP6) confers tolerance to several abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*.
- Zhang, W., Zou, H., Jiang, L., Yao, J., Liang, J., and Wang, Q.,** 2015, Semi-solid state fermentation of food waste for production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(6), 1123–32.
- Zhang, X., Zhao, L., Cao, F., Ahmad, H., Wang, G., and Wang, T.,** 2013, Effects of feeding fermented ginkgo biloba leaves on small intestinal morphology, absorption, and immunomodulation of early lipopolysaccharide-challenged chicks, *Poultry Science*, 92(1), 119–30.
- Znameroski, E. A., and Glass, N. L.,** 2013, Using a model filamentous fungus to unravel mechanisms of lignocellulose deconstruction, *Biotechnology for Biofuels*, 6(1).

Ek I. *Rhizopus* suşlarının fenotipik özellikleri

		<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>	<i>Rhizopus oligosporus</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Rhizopus sexualis</i>
37°C'de	48 saat	Zayıf veya yok	tam petri	tam petri, düşük, çok seyrekleşen	tam petri	yok
	Büçüm	tam petri	tam petri	whole Petri dışı, düşük, düz ve seyrekleşen, net olmayan kenar boşlukları ile	tam petri	tam petri, çok düşük, ve seyrekleşen
CTA'da	Şekli	siyah sporangia sadece kenarlarda	ince soluk gri miselyum, sporangia olgunlaştıkça koyu gri olur	açık kahverengi, sporangia seyrekleşen, kahverengi	ince gri miselyum ve küçük siyah gri sporangia	beyaz ile gri miselyum, az sayıda sporangia, soluk, göze çarpan siyah zigosporeler
	Ters	soluk	soluk ile donuk sarı	renksizden soluk kahverengine ters	soluk	renksiz
	Büçüm	tam petri	tam petri	tam Petri, bazen kapaga uzamıyarak	tam petri	CTA'daki benzer koloniler, ancak daha yoğun
MEA'da	Şekli	göze çarpan sporangia taşıyan floccose beyaz miselyum, önce beyaz, sonra olgunlaşma ile hızla siyahlaşır	ince soluk gri miselyum, sporangia olgunlaştıkça koyu gri olur	renkli koyu gri den siyaha, bol miktarda sporangia, siyah	ince grimsi miselyum ve küçük siyahimsi gri sporangia	
	Ters	renksiz	soluk ile donuk sarı	renksiz	soluk	
Sporangioforlar	rizidler	rizoid demetlerinden üç ila beşlik gruplar	Kötü biçimlendirilmiş rizoid demetlerinden tek başına veya 2 ila 3'lük gruplar halinde taşınır	genellikle tabanda veya yakınında iyi gelişmiş kısa rizidler ile	rizoidlerden 1 ila 3'lük demetler halinde taşınır	rizoidlerden kaynaklanır, küne başına 1 ila 3
	stip şekli ve uzunluğu	dalsız, 3 mm	dalsız, nispeten kısa, genellikle 200-500 µm uzunluğunda, kahverengi duvarlı	150-400 µm uzunluk	1500 µm uzunluğa kadar, genellikle dalsız	1500 µm uzunluğa kadar, genellikle dalsız
	Çap	100-350 µm	100-200 µm	80-120 µm	150 µm	50-150 µm
Sporangia	şekli	genellikle küresel	Siyah genellikle küresel	koyu renkli, genellikle 7 günde kırılır ve sporlar dağılır,	sporangia küresel, önce beyaz, sonra olgunlaşınca grimsi siyah oluyor	küresel, beyaz, gri oluyor
	Şekli	neredeyse küresel	küresel	kalıcı, genellikle bölünmüş, ancak küresel ile piriform	küresel, soluk kahverengi	küreselden elipsoidal
	Çap	200 µm'ye kadar	20-35 µm	25-75 µm çap veya uzunluk	10 µm'ye kadar	100 µm'ye kadar çap veya uzunluk
Kolumella	yaşlandığında	şemsiye şekilleri oluşumak için genellikle aşağı ve dışa doğru çöker	şemsiye şekilleri oluşumak için aşağı doğru çöker		şemsiye şekilleri oluşumak için aşağı doğru çöker	şemsiye şekilleri oluşumak için aşağı doğru çöker
	Çap	Uzun ekseninde 8-20 µm	3-5 µm	3-3,5 µm	5-8 µm	5-12(-25) µm
	Renk	soluk kahverengimsi			Kahverengi	
Sporangiosporlar	şekli	çizgili duvarlarla dar	ince çizgili duvarlı elipsoidal	ince dikenli duvarlarla küresel ile alt küresel	değişken şekli, elipsoidal ile geniş fusiform veya düzensiz elipsel, çizgili duvarlı	kalın gri çizgili duvarlı alt küresel, elipsoidal veya köşeli
Zigosporeler		nadir	nadir	nadir	nadir	yoğun, 80-180 mm çapında, siyah, yarı küresel
Ayırıcı özellikleri		Rhizopus stolonifer, 25°C'de kaba hifleri ve yaygın büyümesi ve ilk oluştuğunda beyaz olan ancak olgunlaştıkça siyaha dönen sporangileri ile ayırıcıdır. Sporangiosporlar çizgili duvarlı büyüktür. 25°C'deki aksine, 5 ve 37°C'de büyüme zayıfır veya yoktur.	Rhizopus microsporus, R. stolonifer'den daha kısa uçları ve daha küçük kolumellalar, beyaz olgunlaşmamış sporangiaların olmaması ve 37°C'de güçlü büyüme ile farklıdır. Daha küçük kolumella ve daha küçük sporlar üretmesiyle R. oryzae'den ayırıcıdır. R. oligosporus, R. microsporus'a çok benzer, ancak daha büyük kolumella üretir ve düzden dikenli sporlara kadar pürüzdür.	Rhizopus microsporus ile ortak olarak, R. oligosporus, R. stolonifer'den daha kısa uçları ve daha küçük kolumellalar, beyaz olgunlaşmamış sporangiaların olmaması ve 37°C'de güçlü büyüme ile farklıdır. Daha küçük kolumella ve daha küçük sporlar üretmesiyle R. oryzae'den ayırıcıdır. R. oligosporus, R. microsporus ile izolatlarından daha büyük kolumella üretir ve pürüzsüz ila spinöz sporlar oluşturur.	Butir Rhizopus stolonifer'den daha küçük sporangia ve sporları ve 37°C'de çok daha hızlı büyümesi ile ayırılır. Daha uzun stipes, daha büyük kolumellae ve daha büyük sporlar ile R. microsporus ve R. oligosporus'tan farklıdır.	Rhizopus sexualis göze çarpan siyah zigosporelerin bol üretimi ile diğer gıda kaynaklı Rhizopus ve Mucor türlerinden ayırıcıdır.

Ek. II İzole edilen *Rhizopus* suşlarının fenotipik özellikleri

[illegible]

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her konuda destek olan, tecrübelerini ve bilgisini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Özlem Abacı GÜNYAR'a, çalışmalarım süresince tecrübesiyle desteklerini her zaman hissettiğim TİK komitesinin Prof. Dr. Alev HALİKİ UZTAN ve Prof. Dr. Semra İLHAN 'a, teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmalarım boyunca yardımını esirgemeyen ve bana her konuda destek olan Sayın Laboratuvar arkadaşlarım Derya BİROL, Melike ÇELEBİ, Bengi ALDI ve Bahar MİDİLLİ'ya teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve maddi manevi destekleri ile bana her zaman güç veren değerli aileme özellikle eşim Gehad ELGEHINY'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (FDK-2019-21010). Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkür ederiz.

ÖZGEÇMİŞ

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimini İskenderiye Üniversitesi Mikrobiyoloji bölümünde tamamlamıştır. İki yıldır Borg İlaç fabrikasında kalite departmanda Mikrobiyolog olarak çalışmıştır. Dokuz yıldır İskenderiye Kütüphanesinde araştırmacı Baş Mikrobiyolog olarak çalışmıştır. Ege üniversitesi Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Doktora yapmaktadır.

