

## Anaerobik Rumen Fungusu *Caecomyces* sp. GMLF12'nin Linoleat İzomeraz Enzim Varlığının Belirlenmesi

Uğur ÇÖMLEKÇİOĞLU<sup>1</sup>, Emin ÖZKÖSE<sup>2</sup>, Bülent KAR<sup>2</sup>, İsmail AKYOL<sup>2</sup>, M. Sait EKİNCİ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>KSÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı, Kahramanmaraş

<sup>2</sup>KSÜ, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği Laboratuvarı, Kahramanmaraş

Geliş Tarihi (Received) : 12.08.2011

Kabul Tarihi (Accepted) : 12.12.2011

**ÖZET:** Bu çalışmada anaerobik rumen fungusu *Caecomyces* sp. GMLF12'de linoleat izomeraz enziminin varlığı araştırılmıştır. Linoleat izomeraz enzimi linoleik asitin konjuge linoleik asite izomerizasyonunu sağlamaktadır. Farklı konsantrasyonlarda linoleik asit içeren besi ortamına inokule edilen *Caecomyces* sp. GMLF12 izolatının gelişmediği görülmüştür. Bunun üzerine glikozlu besi ortamında geliştirilmiş *Caecomyces* sp. GMLF12'nin küresel rizoidleri enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Hücreler, linoleik asit ile muamele edilmiş ve belirli zaman aralıklarında enzimatik reaksiyon durdurularak konjuge linoleik asit düzeyleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. En yüksek konjuge linoleik asit düzeyi 45. dakika sonunda 8.22 µg/ml olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar *Caecomyces* sp. GMLF12'nin linoleat izomeraz enzimine sahip olduğu ve bu enzimin hücre yüzeyinde bulunduğunu göstermiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Rumen, *Caecomyces*, Biyohidrojenasyon, Linoleat izomeraz, Konjuge Linoleik Asit

### Determination of Linoleate Isomerase Enzyme Activity of Anaerobic Rumen Fungus *Caecomyces* sp. GMLF12

**ABSTRACT:** In this study, the presence of linoleate isomerase enzyme was investigated in *Caecomyces* sp. GMLF12. Linoleate isomerase enzyme enables the isomerisation of linoleic acid to conjugated linoleic acid. *Caecomyces* sp. GMLF12 isolate was inoculated to different concentrations of linoleic acid-containing media, but the fungi were not developed. Upon this, *Caecomyces* sp. GMLF12 was grown in glucose containing medium and spherical rhizoids were used as enzyme source. Cells were treated with linoleic acid, and enzymatic reaction was halted at given time intervals and CLA levels were measured by spectrophotometrically. The maximum CLA level was measured as 8.22 µg/ml at 45. min. The results showed that *Caecomyces* sp. GMLF12 have linoleate isomerase enzyme and this enzyme was found in cell surface.

**Key Words:** Rumen, *Caecomyces*, Biohydrogenation, Linoleate isomerase, Conjugated Linoleic Acid

### GİRİŞ

Meradaki bitkisel materyalin yağ kompozisyonu glikolipid ve fosfolipid şeklindedir ve başlıca doymamış yağ asitleri linolenik (C<sub>18:3</sub>) ve linoleik (C<sub>18:2</sub>) asittir (Bauman ve ark., 1999). Rumende bitki materyallerinin fermentasyonundan sonra ikinci büyük transformasyon doymamış yağ asitlerinin biyohidrojenasyonudur (Bauman ve ark., 2003). Linoleat izomeraz (EC 5.2.1.5), linoleik asitin (LA) *cis*-9, *cis*-12 çift zincirli bağlarını konjuge forma dönüştürmekle sorumlu bir enzimdir (Kepler ve Tove, 1967). Biyohidrojenasyon, iki adet çift bağ içeren linoleik asitin öncelikle izomerizasyona uğratılarak konformasyonunun değiştirilmesini daha sonrada hidrojen ile doyurularak önce vaksenik asit sonra da stearik asite dönüştürülmesini kapsamaktadır (Harfoot ve Hazlewood, 1988). Konjuge linoleik asit (KLA) biyohidrojenasyon işleminin ara ürünüdür ve çift bağlara sahip doymamış bir yağ olan linoleik asitin (*cis*-9, *cis*-12 C<sub>18:2</sub>, LA) pozisyonel ve geometrik izomerleri için kullanılan genel bir ifadedir (Kim ve ark., 2001). KLA izomerleri içerisinde biyolojik olarak aktif olanlar *cis*-9, *trans*-11-KLA ve *trans*-10, *cis*-12-KLA'dır (Lawson ve ark., 2001). Antikarsinojenik etkisi olan *cis*-9, *trans*-11-KLA'in sütte bol bulunması

nedeniyle süt ineklerinin KLA metabolizması tüm dünyada büyük bir ilgi uyandırmıştır (Kay ve ark., 2004). KLA, doğal olarak pek çok gıda maddesinde bulunmasına rağmen esas kaynağı ruminant hayvanlardan elde edilmiş süt ve et ürünleridir (Chin ve ark., 1992). KLA ile yapılan çalışmalar sonucunda KLA'in antioksidant mekanizmalarında yer aldığı (Ha ve ark., 1990) ve kanser ile tümör oluşumunun başlamasını da engellediği bildirilmiştir (Ip ve ark., 1991). Ayrıca vücuttaki yağ oranını düşürdüğü, kas miktarını arttırdığı (Park ve ark., 1997), bağışıklık sistemini kontrol ettiği (Cook ve ark., 1993), serum kolesterolünü düşürdüğü (Yeung ve ark., 2000) ve dolayısıyla atherosclerosis'i indirdiği (Nicolosi ve ark., 1997) rapor edilmiştir.

Rumen bakterilerinin biyohidrojenasyondaki rolleri üzerine pek çok çalışma yapılsa da rumen funguslarının biyohidrojenasyondaki rolleri ilk defa Nam ve Garnsworthy (2007a) tarafından bildirilmiştir. Rumen funguslarının gerçekleştirdikleri biyohidrojenasyon basamaklarının Grup A rumen bakterileri tarafından gerçekleştirilen biyohidrojenasyon ile aynı olduğu görülmüştür. LA rumen fungusları tarafından önce

KLA'ya sonrada VA'ya dönüştürülmüştür (Nam ve Garnsworthy, 2007a). Ancak çözülebilir karbonhidratlar ile vitamin ve uçucu yağ asitleri gibi büyüme faktörlerinin besi ortamında artırılması biyohidrojenasyonu durdurmuştur (Nam ve Garnsworthy, 2007b). Ayrıca farklı bir çalışmada *P. communis* M014'ün C<sub>18</sub> doymamış yağ asitlerinin toksik etkisinden korunmak için biyohidrojenasyon işlemlerini gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Kim ve ark., 2008).

Rumen funguslarının KLA biyosentezi ile ilgili bilgiler yeni olmakla beraber henüz yeterli düzeyde değildir. Bu konu ile ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmanın amacı biyohidrojenasyon işleminde ülkemizden izole edilmiş rumen fungusu *Caecomyces* sp. GMLF12 (Çömlekcioglu ve ark., 2008)'nin muhtemel rolü üzerine bir araştırma yapmaktır. Bu kapsamda mikroorganizmalar üzerinde toksik etkisi olduğu bilinen linoleik asitin rumen fungusunun gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca linoleik asitin biyohidrojenasyonu sırasında ortaya çıkan ve pek çok faydalı etkisi olduğu düşünülen konjuge linoleik asitin sentezinde görev alan linoleat izomeraz enziminin varlığı *Caecomyces* sp. GMLF12'de araştırılmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Mikroorganizma ve Kültür Koşulları

Bu çalışmada kullanılan anaerobik rumen fungusları Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootehni Bölümü'nde yer alan "Anaerobik Fungus Kültür Koleksiyonu (Çömlekcioglu ve ark., 2008)"ndan temin edilmiştir. Mikroorganizmaların geliştirildiği anaerobik besiyeri Orpin (1976)'e göre hazırlanmıştır. Besiyeri 150 ml/lt rumen sıvısı, 6 g/lt NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 g/lt maya özütü, 10 g/lt peptone, 1 g/lt L-sistein hidroklorür, ve 1 mg/lt resazurin içermektedir. Besiyerinde kullanılan mineral solusyonlar ayrı hazırlanmıştır ve 150 ml/lt oranında ilave edilmiştir. Mineral Solusyon I: %0.3 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; Mineral Solution II: %0.3 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, %0.6 NaCl, %0.6 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, %0.06 CaCl<sub>2</sub>, ve %0.06 MgSO<sub>4</sub>, içermektedir. Besiyeri içerisindeki oksijenin uzaklaştırılması amacıyla bir yandan CO<sub>2</sub> ile muamele edilirken aynı zamanda kaynama noktasına kadar ısıtılarak yine CO<sub>2</sub> (%99) gazı altında Hungate tüplerine aktarılmış ve otoklav ile 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir.

### Linoleik Asitin Miselleştirilmesi

Linoleik asitin (Sigma) besiyerinde homojen olarak dağılması için 56 µl linoleik asit, %2'lik Tween 80 ile karıştırılarak 0.1 g/ml'lik stok solusyon hazırlanmıştır. Hazırlanan solusyon ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır (Kim ve ark., 2000).

### Anaerobik Fungusların Linoleik Asit ile İnkübasyonu

Hazırlanan miselleştirilmiş stok linoleik asit solusyonundan içerisinde 10 ml glikozlu anaerobik besi ortamı bulunan Hungate tüplerine CO<sub>2</sub> gaz akımının

altında 10, 20, 40, 80, 100 ve 200 µl ilave edilmiştir. Tüplere anaerobik glikozlu besi ortamında yetişmiş fungal kültürlerden enjeksiyon yardımı ile inokulasyon yapılmıştır. Funguslar, anaerobik inkübasyon koşulları altında gelişimleri takip edilmek üzere 3 gün süre ile 39 °C'de çalkalamasız inkübatörde inkübe edilmişlerdir.

### Anaerobik Fungusların KLA Üretiminin Araştırılması

Glikozlu anaerobik besi ortamında üretilmiş 3 günlük kültür santrifüj yoluyla hücreleri ayrılmış ve % 0.85'lik NaCl ile 2 defa yıkanmıştır. Yıkanmış hücreler, 5 mg miselleştirilmiş linoleik asit içeren 1 ml 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.5) ile süspansiyon edilmiş ve çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi 0, 2, 4, 5, 15, 30, 45 ve 60. dakikalarda sonlandırılarak KLA oluşumunu belirlemek için lipit miktarı tayini için örnekler alınmıştır.

### Lipit Ekstraksiyonu

Lipid ekstraksiyonu Bligh ve Dyer (1959)'a göre yapılmıştır. Buna göre her 1 ml örnek için 3.75 ml kloroform:metanol (1/2, v/v) eklenmiş ve vortekslenmiştir. Daha sonra 1.25 ml kloroform daha ilave edilerek, vorteks ile karıştırılmıştır. Son olarak 1.25 ml saf su eklenerek tekrar vorteks ile karıştırılmıştır. Tüpler 100 g'de 2 dk santrifüj edilerek fazların birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Alt faz pastör pipeti yardımı ile toplanmış ve azot akımı ile konsantre hale getirilmiştir.

Lipitlerin hızlı ekstraksiyonu için ise örneklerin üzerine önce 2 ml isopropanol eklenerek 30 sn vortekslenmiştir. Daha sonra lipitler heksan ile ekstrakte edilmiş ve kısa bir santrifüj ile fazların birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Organik faz toplanarak azot akımı altında konsantre hale getirilmiştir (Coakley ve ark., 2003).

### KLA'nın Spektrofotometrik Analizi

KLA'nın belirlenmesi için UV spektrum analiz yöntemi kullanılmıştır. Örnekler 200 nm'den 350 nm'ye kadar taranmış ve KLA'nın maksimum absorbans verdiği dalga boyu belirlenmiştir. Kalibrasyon için 0.5, 2.5, 5.0 ve 10.0 µg/ml konsantrasyonlarda KLA heksanda çözünerek standartlar hazırlanmış ve absorbansları 233 nm'de ölçülmüştür. hazırlanan standart eğrisine göre her bir örnekteki KLA konsantrasyonu hesaplanmıştır (Wang ve ark., 2007).

### BULGULAR ve TARTIŞMA

Linoleik asitin rumen funguslarının gelişimi üzerine etkisini araştırmak üzere kullanılan besi ortamında linoleik asitin homojen bir şekilde dağılmasını sağlayan Tween 80 (% 2, v/v) linoleik asiti miselleştirmek için kullanılmıştır. Tween 80 kullanılarak stok linoleik asit solusyonu (30 mg/ml) hazırlanmıştır. Bu stok solusyondan glikozlu anaerobik tüplere anaerobik şartlar altında son linoleik asit konsantrasyonu 30, 60,

120, 240, 300 ve 600 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Kontrol grupları olarak hiç linoleik asit ilave edilmemiş besi ortamı ve Tween 80'nin etkisinin araştırılması için Tween 80 solusyonundan (% 2, v/v) 100 ve 200 µl ilave edilmiş besi ortamları kullanılmıştır. Küresel rizoide sahip *Caecomyces* sp. GMLF12'nin taze kültüründen hazırlanan besi ortamlarına inoküle edilmiştir. Fungus gelişimi 3 gün boyunca mikroskop altında takip edilmiştir. İnkübasyon sonucunda *Caecomyces* sp. GMLF12'nin gelişimi Çizelge 1'de verilmiştir. *Caecomyces* sp. GMLF12'nin, linoleik asit içermeyen ve sadece Tween 80 içeren kontrol besi ortamlarında geliştiği, linoleik asit içeren besi ortamlarının hiç birisinde gelişmediği görülmüştür. Bu durum linoleik asitin *Caecomyces* sp. GMLF12 üzerine toksik bir etkisinin olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre *Caecomyces* sp. GMLF12 suşunun ilk inokulasyon aşamasında ortamda bulunan linoleik asite karşı duyarlı oldukları görülmektedir. Benzer sonuç Kim ve ark. (2008) tarafından da elde edilmiş, linoleik ve linolenik asitin *P. communis* M014'ün gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir. Orpin ve Greenwood (1986)'un çalışmasında ise linoleik asitin düşük konsantrasyonlarında (5 µg/ml) fungusların çimlenme oranının kontrol grubuna göre % 102, yüksek konsantrasyonda ise (50 µg/ml) % 19 olduğu bildirilmiştir. Ancak Nam ve Garnsworthy (2007a, 2007b)'nin yaptıkları çalışmada anaerobik fungusun inokulasyonundan sonra 39 °C'de 24 saat inkübasyonun ardından ortama ilave edilen 700 µM linoleik asite rağmen fungal gelişim ve KLA oluşumu gözlenmiştir. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde başlangıç aşamasında linoleik asitin rumen funguslarının büyümesini engellemesi, inoküle edilen fungus hücre sayısının linoleik asiti detoksifiye etmesine yetmediği bu nedenle yeni hücrelerin oluşmadığını düşündürmektedir. Nam ve Garnsworthy (2007a, 2007b)'nin çalışmalarında olduğu gibi gelişen kültür ile linoleik asitin bir araya gelmesi linoleik asitin hızlı bir şekilde dönüştürülmesine neden olmuştur. Buna göre rumen içerisine giren büyük miktarlardaki bitkisel biyokütle'nin degradasyonu ile ortaya çıkan linoleik asit ve linolenik asit rumen içerisinde o anda var olan rumen mikroorganizmaları tarafından hızlı bir şekilde dönüştürüldüğü böylelikle rumen mikroorganizmalarının gelişimi üzerine etki etmediğini göstermektedir. Kim ve ark. (2000), *Butyrivibrio fibrisolvens* A38'in besi ortamında bulunan 15 µmol linoleik asit konsantrasyonunda gelişemediğini ancak gelişen koloni üzerine ilave edilen 10 kat fazla linoleik asiti tolere edebildiğini bildirmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda bakterilerin linoleat izomeraz enziminin membran üzerinde bulunduğu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2000; Peng ve ark., 2007).

Bu nedenle çeşitli bakteriler ile yapılan çalışmalarda enzim kaynağı olarak bakterilerin kendisi kullanılmış ve yıkanmış hücreler ile elde edilen sonuçların kültür ortamında elde edilenden 10-100 kat daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir (Ogawa ve ark. 2005). Ayrıca membran fraksiyonlarının linoleik asiti KLA'ya dönüştürebilmesi, hücreler ölse veya parçalansa bile rumende linoleik asiti KLA'ya dönüştürmesine neden olabilir (Kim ve ark., 2000). Buradan yola çıkılarak rumen funguslarının linoleat izomeraz enziminin de hücre duvarı üzerinde olabileceği düşünülmüş ve enzim kaynağı olarak hücrelerin kendisinin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla enzimatik reaksiyon sırasında homojenliğin sağlanması açısından küresel rizoidlere sahip *Caecomyces* sp. GMLF12 izolatu tercih edilmiştir.

Linoleat izomeraz aktivitesi ortaya çıkan KLA tespitinde spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. KLA ve KLA'nın ekstrakte edileceği hekzanın spektrofotometrede 200 – 350 nm arasında spektrumu alınmıştır (Şekil 1).

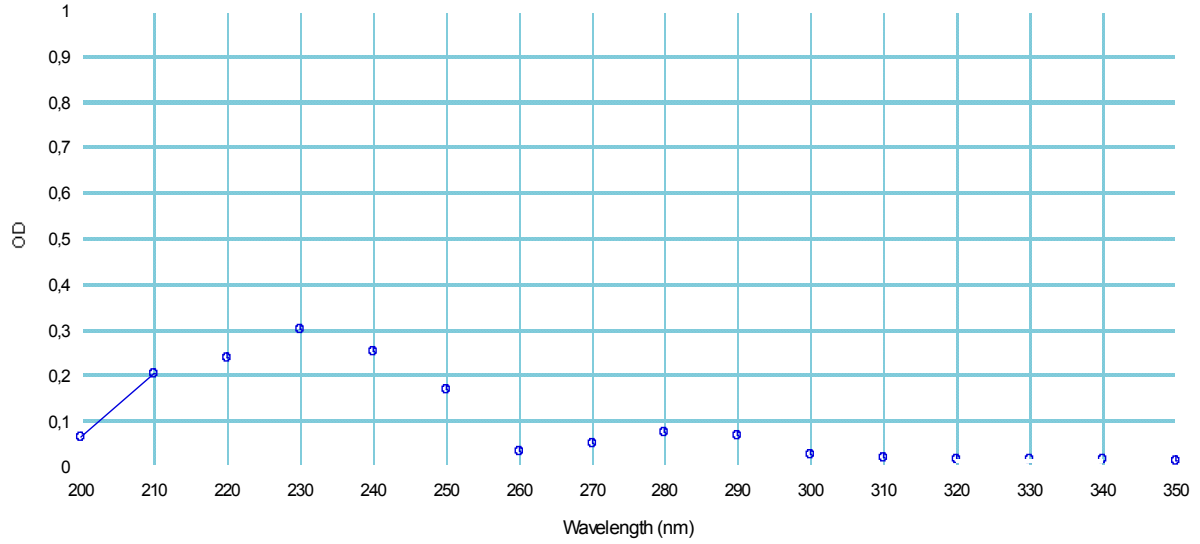
Spektrum sonucunda hekzanın bu dalga boyları arasında absorpsiyon oluşturmadığı, KLA'nın ise 230 nm'de maksimum absorpsiyon verdiği görülmüştür. KLA, 233 nm'de maksimum düzeyde absorpsiyon verdiği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Lin, 2006; Wang ve ark., 2007). Ölçüm şartları belirlendikten sonra glikozlu ortamda yetiştirilen *Caecomyces* sp. GMLF12'nin hücreleri toplanarak yıkanmıştır. Linoleat izomeraz enziminin oldukça hızlı olduğu ve 2 dk'dan sonra KLA miktarının düştüğü görülmüştür (Kim ve ark., 2000) bu nedenle reaksiyon belli zaman aralıklarında durdurularak konjuge linoleik asit oluşumu incelenmiştir.

Reaksiyon sıvısından lipit özütlemesi yapıldıktan sonra hekzan ile yağ asitleri ekstrakte edilmiştir. Hekzan azot akımı ile uçurulduktan sonra yağ asitleri eşit hacimde hekzan ile çözülmüş ve hemen spektrofotometrede absorpsiyon değerleri okunmuştur. *Caecomyces* sp. GMLF12 tarafından sentezlenen KLA düzeyleri Şekil 2'de gösterilmiştir. Linoleik asitin 2. dakikadan itibaren konjuge linoleik asite dönüşümünün başladığı görülmektedir. İlk dört dakika içerisinde 0.404 µg/ml konjuge linoleik asitin oluştuğu 45. dakikaya kadar 8.22 µg/ml'ye ulaştığı görülmüştür. Bakteriler ile yapılan çalışmalarda *L. acidophilus*'un 106.5 µg/ml (Lin ve ark., 1999), *Bifidobacterium breve* NCFB 2258'in yaklaşık 400 µg/ml (Coakley ve ark., 2003), *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*'un ise 209 µg/ml (Lin, 2006) KLA sentezlediği bildirilmiştir. *Caecomyces* sp. GMLF12 KLA sentezi gerçekleştirirse de KLA düzeyinin bakterilerin çok altında olduğu görülmektedir.

Çizelge 1. Linoleik asit ve Tween 80'nin *Caecomyces* sp. GMLF12'nin gelişimi üzerine etkisi.

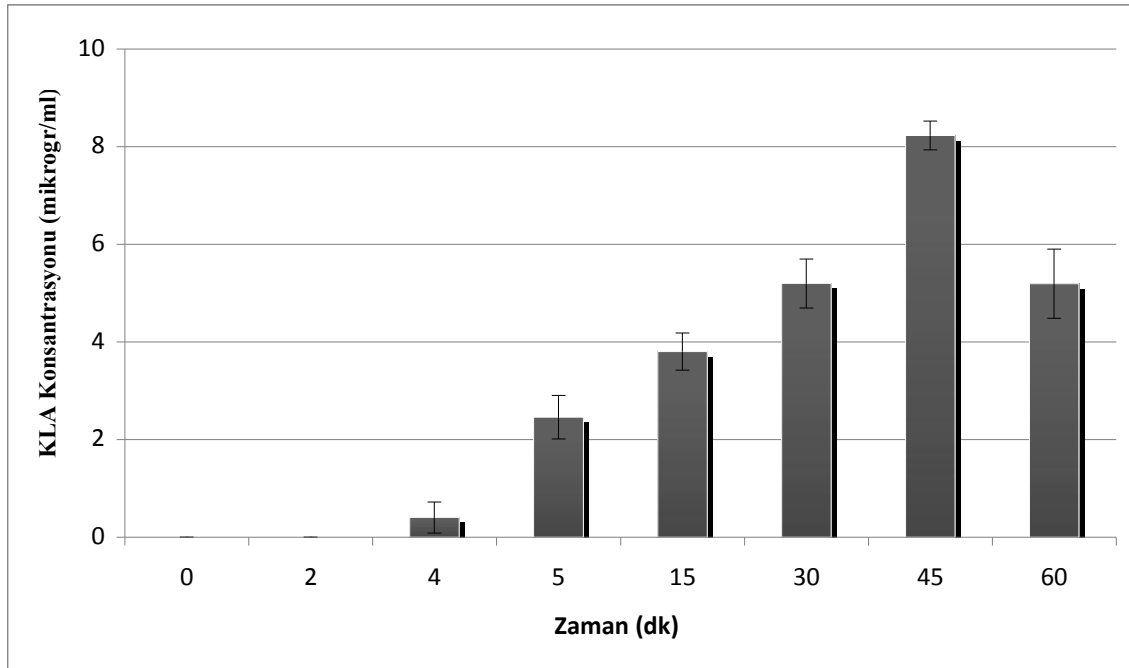
	Linoleik Asit Konsantrasyonları (µg/ml)						Tween 80 (µl)		
	0	30	60	120	240	300	600	100	200
<b>GMLF12</b>	+	-	-	-	-	-	-	+	+

(+) Üreme gözlemlendi, (-) Üreme gözlemedi



Well C4  
Lambda at Maximum 230,00

Şekil 1. KLA standartının 200 – 350 nm arasındaki spektrumunun grafiği.

Şekil 2. *Caecomyces* sp. GMLF12'nin linoleat izoremaz aktivitesi sonucunda ortaya çıkan ve belli zaman aralıklarında ölçülen KLA miktarı.

*Caecomyces* sp. GMLF12'nin KLA sentezi 45. dakikadan sonra azalmış ve 60. dakikada KLA düzeyi 5.193 µg/ml'ye gerilemiştir. Biyohidrojenasyon,

linoleik asitin doyurulması işlemi olup KLA bu metabolik yolda ara ürün olarak oluşmaktadır. Bu nedenle belli bir zaman sonra KLA miktarının azalması

*Caecomyces* sp. GMLF12'nin biyohidrojenasyonun ileriki aşamalarını da gerçekleştirebildiğini göstermektedir.

Rumen bakteriyel kültürüne linoleik asit eklendiği zaman biyohidrojenasyon 100 dk. içerisinde tamamlanırken rumen funguslarının biyohidrojenasyonu ancak 24 saatte tamamladığı, hatta *P. communis* M014'ün tamamlayamadığı bildirilmiştir. Bunun nedeni olarak rumen funguslarının yaşam döngüsünün uzun olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Anaerobik funguslar, bakterilere göre bitkisel materyalin sindiriminde daha etkili olduklarından dolayı funguslar genellikle bitkisel materyalde bulunan glikolipitlerin, bakteriler ise konsantrale halde bulunan trigliseritlerin biyohidrojenasyonunda görev alabileceği bildirilmiştir (Nam ve Garnsworthy, 2007a; Kim ve ark., 2008). *Orpinomyces* sp. F-14 oldukça yüksek biyohidrojenasyon aktivitesi göstermiştir. Bu izolatın bitki materyalini oldukça hızlı degradasyona uğratması, biyohidrojenasyonunda hızlı bir şekilde tamamlanmasına neden olabilir (Nam ve Garnsworthy, 2007a). Rumen funguslarının biyohidrojenasyonu besi ortamındaki glikoz ve sellobiyoz varlığında azaldığı, linoleik asitin tam biyohidrojenasyonu için uygun pH'nın 6.5, KLA sentezi için ise 7.0 olduğu belirlenmiştir (Nam ve Garnsworthy, 2007b).

Rumendeki biyohidrojenasyonun büyük bir bölümünde bakterilerin sorumlu olduğu düşünülse de anaerobik funguslarında bu sürece katkıda bulunabileceği gösterilmiştir. Ayrıca KLA izomerizasyonunda görev alan bakterilerin aynı zamanda selülitik özellikte olması dikkat çekmektedir (Fujimoto ve ark., 1993). İnekler fibril oranı yüksek besin ile beslendiği zaman sütteki KLA miktarının artması rumendeki selülitik ve hemiselülitik aktivitenin artması ile ilişkili görülmektedir (Kim ve ark., 2000). Selülitik ve hemiselülitik aktiviteleri oldukça yüksek olan rumen funguslarının KLA sentezinde rollerinin olması şaşırtıcı olmayacaktır. Ancak henüz anaerobik fungusların KLA sentezindeki metabolizmasının detayları, enzimlerin karakteristikleri, gen organizasyonu açık değildir. Bu nedenle bu ilginç mikroorganizmaların biyohidrojenasyondaki rollerini daha net ortaya koymak için ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

#### KAYNAKLAR

- Bauman, D.E., Baumgard, L.H., Corl, B.A., Griinari, J.M. 1999. Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid in Ruminants. Proceedings of the American Society of Animal Science, 1-11.
- Bauman, D.E., Perfield, J.W., Veth, M.J., Lock, A.L. 2003. New Perspectives on Lipid Digestion and Metabolism in Ruminants. Proc. Cornell Nutrition Conference: 175-189.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A Rapid Method for Total Lipid Extraction and Purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37:911-917.
- Chin, S.F., Liu, W., Storkson, J.M., Ha, Y.L., Pariza, M.W. 1992. Dietary Sources of Conjugated Dienoic Isomers of Linoleic Acid, a Newly Recognised Class of Anti-Carcinogens. J. Food Composition and Analysis 5: 185-197.
- Coakley, M., Ross, R.P., Nordgren, M., Fitzgerald, G., Devery, R., Stanton, C. 2003. Conjugated Linoleic Acid Biosynthesis by Human-Derived *Bifidobacterium* Species. J. Appl. Microbiol. 94: 138-145.
- Cook, M.E., Miller, C.C., Park, Y., Pariza, M.W. 1993. Immune Modulation by Altered Nutrient Metabolism: Nutritional Control Immune-Induced Growth Depression. Poultry Sci. 72: 1301-1305.
- Çömlekcioglu, U., Akyol, İ., Kar, B., Özköse, E., Ekinci, M.S. 2008. Anaerobik Rumen Funguslarının İzolasyonu, Tanımlanması ve Kültür Koleksiyonunun Oluşturulması. Hayvansal Üretim, 49 (2): 29-35.
- Fujimoto, K., Kimoto, H., Shishikura, M., Endo, Y., Ogimoto, K. 1993. Biohydrogenation of Linoleic Acid by Anaerobic Bacteria Isolated from Rumen. Biosci. Biotech. Biochem. 57(6): 1026-1027.
- Ha, Y.L., Storkson, J., Pariza, W. 1990. Inhibition of Benzo (A) Pyrene-Induced Mouse Forestomach Neoplasia by Conjugated Dienoic Derivatives of Linoleic Acid. Cancer Res. 50: 1097-1101.
- Harfoot, C.G., Hazlewood, G.P. 1988. Lipid Metabolism in the Rumen. Ed. Hobson, P.N. The Rumen Microbial Ecosystem, Elsevier, New York: 285-322.
- Ip, C., Chin, S.F., Scimeca, J.A., Pariza, M.W. 1991. Mammary Cancer Prevention by Conjugated Dienoic Derivative of Linoleic Acid. Cancer Res. 51: 6118-6124.
- Kay, J.K., Mackle, T.R., Auldist, M.J., Thomson, N. A., Bauman D.E. 2004. Endogenous Synthesis of *cis*-9, *trans*-11 Conjugated Linoleic Acid in Dairy Cows Fed Fresh Pasture. J. Dairy Sci. 87: 369-378.
- Kepler, C.R., Tove, S.B. 1967. Biohydrogenation of Unsaturated Fatty Acids. III. Purification and Properties of a Linoleate  $\Delta^{12}$ -*cis*,  $\Delta^{11}$ -*trans*-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. J. Biological Chem. 242: 5686-5692.
- Kim, Y.J., Liu, R.H., Bond, D., Russell, J.B. 2000. The Effect of Linoleic Acid Concentration on the Conjugated Linoleic Acid (CLA) Production of *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. Appl. Environ. Microbiol. 66: 5226-5230.
- Kim, Y.H., Yoon, C.S., Lee, K.W. 2001. Transesterification of Conjugated Linoleic Acid Tricaprylin by Lipases in Organic Solvents. Food Res. Internat. 34: 301-306.
- Kim, C.H., Lee, S.J., Ha, J.K., Kim, W.Y., Lee, S.S. 2008. Effects of Emulsified Octadecanoic Acids on Gas Production and Cellulolysis by the Rumen Anaerobic Fungus, *Piromyces communis* M014. Anaerobe 14: 19-28.

- Lawson, R.E., Moss, A.R., Givens, D.I. 2001. The Role of Dairy Products in Supplying Conjugated Linoleic Acid to Man's Diet: A Review. *Nutrition Res. Rev.* 14: 153-172.
- Lin, T.Y., Lin, C.W., Lee, C.H. 1999. Conjugated Linoleic Acid Concentration as Affected by Lactic Cultures and Added Linoleic Acid. *Food Chem.* 67: 1-5.
- Lin, T.Y. 2006. Conjugated Linoleic Acid Production by Cells and Enzyme Extract of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* with Additions of Different Fatty Acids. *Food Chem.* 94: 437-441.
- Nam, I.S., Garnsworthy, P.C. 2007a. Biohydrogenation of Linoleic Acid and Production of Conjugated Linoleic Acid by Rumen Fungi Compared with Rumen Bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, 103: 551-556.
- Nam, I.S., Garnsworthy, P.C. 2007b. Factors Influencing Biohydrogenation and Conjugated Linoleic Acid Production by Mixed Rumen Fungi. *J. Microbiol.* 45(3): 199-204.
- Nicolosi, R.J., Rogers, E.J., Kritchevsky, D., Scimeca, J.A., Hunt, P.J. 1997. Dietary Conjugated Linoleic Acid Reduces Plasma Lipoproteins and Early Aortic Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Hamsters. *Artery* 22: 266-277.
- Ogawa, J., Kishino, S., Ando, A., Sugimoto, S., Mihara, K., Shimizu, S. 2005. Production of Conjugated Fatty Acids by Lactic Acid Bacteria. *J. Biosci. Eng.* 100 (4): 355-364.
- Orpin, C.G. 1976. Studies on the Rumen Flagellate *Sphaeromonas communis*. *J. Gen. Microbiol.* 94: 270-280.
- Orpin, C.G., Greenwood, Y. 1986. Nutritional and Germination Requirements of the Rumen Chytridiomycete *Neocallimastix patriciarum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 86: 103-109.
- Park, Y., Albright, K.J., Liu, W., Storkson, J.M., Cook, M.E., Pariza, M.W. 1997. Effect of Conjugated Linoleic Acid on Body Composition in Mice. *Lipids* 32(8): 853.
- Peng, S.S., Deng, M.D., Grund, A.D., Rosson, R.A. 2007. Purification and Characterization of a Membrane-Bound Linoleic Acid Isomerase from *Clostridium Sporogenes*. *Enz. Microbiol. Technol.* 40 (4): 831-839.
- Wang, L.M., Lu, J.P., Chu, Z.Q., Cui, Y.Y., Ren, X.H. 2007. Production of Conjugated Linoleic Acid by *Propionibacterium freudenreichii*. *Food. Chem.* 103(2): 313-318.
- Yeung, C.H., Yang, L., Huang, Y., Wang, J., Chen, Z. Y. 2000. Dietary Conjugated Linoleic Acid Mixture Affects the Activity of Intestinal Acyl Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase in Hamsters. *Br. J. Nutrition* 84: 935-941.