

## Silajın Aerobik Safha Sorunlarının Çözümünde Biyoteknolojik Yaklaşımlar

Bahri Devrim ÖZCAN<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı, Adana

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0002-9198-656X>

\*Sorumlu yazar: bdozcan@gmail.com

### Derleme Makalesi

### ÖZ

#### Makale Tarihiçesi:

Geliş tarihi: 27.02.2022

Kabul tarihi: 26.05.2022

Online Yayınlanma: 18.07.2022

#### Anahtar Kelimeler:

Silaj

Aerobik stabilite

Biyoteknoloji

Rekombinant silaj inokülantı

Silaj, yeşil yem materyallerinin fermantasyona uğratılması ile muhafazasında uygulanan bir yöntemdir. Anaerobik koşullar altında suda çözünür karbonhidratların laktik asit bakterilerince laktik asit ve diğer organik asitlere dönüştürmesi esasına dayanır. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen laktik asit ile pH düşer ve böylece siloda bulunan yem materyali zararlı mikroorganizmalardan korunmuş olur. Silaj yapımında ticari silaj inokülantları yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *Lactobacillus plantarum* hızlı üremesi ve pH'yı çabuk düşürmesi dolayısıyla ticari silaj inokülantları içerisinde önemli bir yere sahiptir. Son yıllarda gerek silajın yem değerinin artırılması gerekse aerobik bozulmanın önüne geçilebilmesi amacıyla yapılan biyoteknolojik çalışmalar önem kazanmıştır. Bu çalışmalar özellikle *L. plantarum* üzerine yoğunlaşmış ve moleküler genetik yöntemleriyle yeni özellikler kazandırılmış rekombinant suşlar geliştirilmiştir.

## Biotechnological Approaches in Solving the Aerobic Phase Problems of Silage

### Review Article

### ABSTRACT

#### Article History:

Received: 27.02.2022

Accepted: 26.05.2022

Published online: 18.07.2022

#### Keywords:

Silage

Aerobic stability

Biotechnology

Rekombinant silage inoculant

Silage is a method used to preserve fresh forage materials by fermentation. It is based on converting water-soluble carbohydrates into lactic acid and other organic acids by lactic acid bacteria under anaerobic conditions. The pH decreases by lactic acid produced by lactic acid bacteria and thus forage is protected against detrimental microorganisms in the silo. Commercial silage inoculants are widely used in silage making. *Lactobacillus plantarum* is the most important species found in commercial silage inoculants since it grows rapidly and lowers pH quickly. Biotechnological studies have gained importance in recent years, whether to increase the food value of silage or to prevent aerobic spoilage. These studies have mainly focused on *L. plantarum* and new recombinant species that acquired new properties and were developed by molecular genetic methods.

**To Cite:** Özcan BD. Silajın Aerobik Safha Sorunlarının Çözümünde Biyoteknolojik Yaklaşımlar. Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2022; 5(2): 1105-1115.

### 1. Giriş

Silaj, yeşil yem bitkilerinin veya bir kısım sanayi artığı sulu kaba yemlerin anaerobik koşullar altında fermente edilerek saklanmasıyla elde edilen, besin madde bakımından oldukça zengin ve hayvanlar tarafından tercih edilebilir bir kaba yem kaynağıdır (Fabiszewska ve ark., 2019). Dünyada özellikle geniş getiren hayvanların beslenmesinde silaj kullanımı her gün daha büyük bir yaygınlık göstermektedir. Yeşil yemlerin diğer bir saklama yöntemi olan kuru ota göre daha düşük besin madde kaybına uğraması, her işletmede daha ucuz bir maliyetle ve kolaylıkla üretilebilmesi, her zaman

kurutma imkânının olmaması, yeşil mısır gibi bazı yemlerin kurutmaya uygun olmaması silaja gösterilen ilginin artmasının en büyük nedenleri olarak kabul edilmektedir (McDonald, 1981; Woolford, 1999; Ergül, 2000). Günümüzde ekonomik ve kârlı bir hayvansal üretim yapabilmek için yüksek kaliteli silajın üretimi ve kullanımı önemli bir önkoşuldur. Ruminantlardan elde edilecek ürünleri artıracak başta enerji düzeyi olmak üzere besleme değeri yüksek iyi kaliteli bir silaj yapımı; silajlık materyal üretimi, hasat, soldurma, parçalama, katkı maddeleri kullanımı, taşıma ve silonun doldurulması, sıkıştırma ve kapatma gibi birçok önemli kriterler ile birlikte fermantasyon kalitesine bağlıdır (Filya, 2000).

### 1.1. Silajın Mikrobiyolojisi

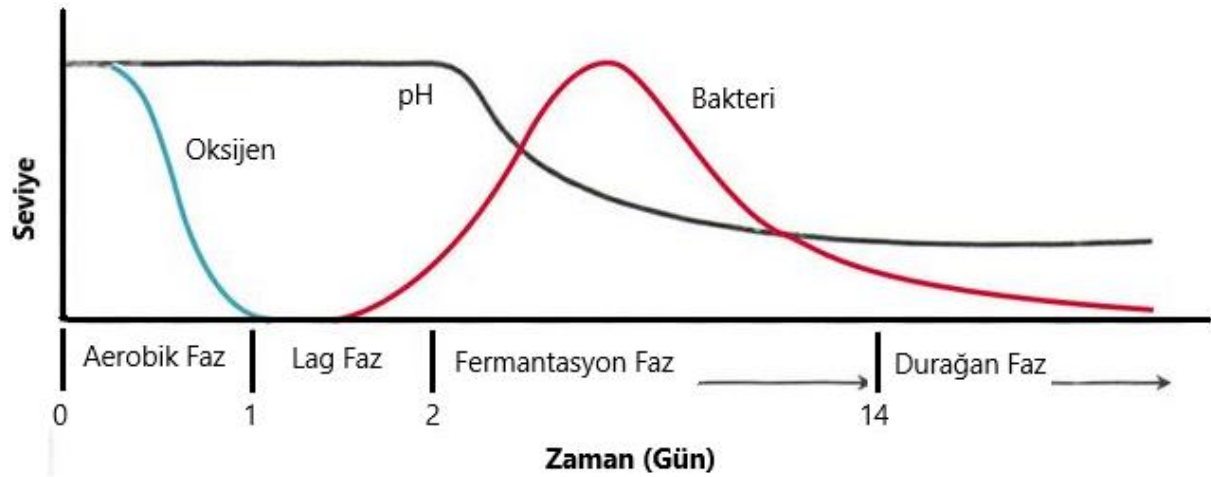
Silajın yapımı bir fermantasyon olayı olup, birçok farklı mikroorganizma grubunun kontrolü altında seyretmektedir. Fakat bu mikroorganizmaların tümünün silaja olumlu katkı sağladığı söylenemez. Zira, bunların bir kısmı silajın oluşumunda olumlu etkiye sahipken, diğer bir kısmının varlığı ve/veya belli ölçüde gelişimi silaj kalitesini olumsuz etkileyeceğinden arzu edilmez. Silaj fermantasyonunda laktik asit bakterileri istenen, buna karşılık *Clostridium*, *Enterobacteriaceae* familyasına ait olanlar, mayalar, asetik asit bakterileri, küf mantarları ve *Listeria* ise istenmeyen mikroorganizmalar grubunda yer alırlar (Çayiroğlu ve ark., 2016). Nitelikli bir silajda laktik asit bakterilerinin etkin olduğu ancak mikrobiyal kaynaklı bozulmaya maruz kalmış silajda ise küf, maya, asetik asit bakterileri gibi istenmeyen mikroorganizmaların yoğun olarak geliştiği görülür. Silajda bulunan laktik asit bakterileri homofermentatif (homolaktikler) ve heterofermentatif (heterolaktikler) olmak üzere 2 grup altında ele alınır. Homofermentatif laktik asit bakterileri glukoz ve fruktoz gibi 6 karbonlu karbonhidratları sadece laktik asite dönüştürürken heterofermentatifler bunlara ek olarak arabinoz ve ksiloz gibi pentozlardan laktik asit yanında asetik asit, etanol ve karbondioksit üretirler. Burada oluşan etanol daha sonra asetik asite okside olur. Bunun da çok az bir kısmı (%0,3-0,5) silajdaki söz konusu bakterilerin etkinliklerinde değerlendirilir (Menke ve Huss, 1975; Basmacıoğlu ve Ergül, 2002). Diğer taraftan heterofermentatif laktik asit bakterilerinin neden oldukları kimyasal reaksiyonun hızı homofermentatif laktik asit bakterilerine göre daha düşüktür. Ayrıca homofermentatif laktik asit bakterileri daha az bir enerji kaybı ile 1 mol glukozdan 2 mol laktik asit oluştururken heterofermentatiflerde laktik asit üretimi 1 mol'e düşer ve bu olaydaki pH'nın düşmesi daha yavaş olur. Buna bağlı olarak da kuru madde ve dolayısıyla enerji kaybı daha yüksektir (Woolford, 1999).

Silaj yapımında sıklıkla kullanılan mikrobiyal inokülantlar, laktik asit fermantasyonunu sağlayabilecek yoğunlukta laktik asit bakterileri ya da bakteri gruplarını içeren ürünler olarak tanımlanmaktadır. Geleneksel katkı maddelerinin dolaylı etkilerine karşın bu tip ürünler, silolanacak kitlede arzu edilen mikroorganizma bileşiminin doğrudan oluşturulması amacı ile kullanılmaktadır (Yurtman ve ark., 1997; Özdüven ve ark., 1999). İnokülant olarak kullanılan Laktik Asit Bakterileri (LAB), silajda laktik asit fermantasyonunu hızlandırarak asiditenin yükselmesine (yaklaşık pH 4) neden olarak bütirik asit bakterilerinin gelişimini de engellemiş olurlar. Zira fermantasyon kalitesi laktik asit ve bütirik asit

içeriğine göre değişiklik göstermektedir. İyi bir silajda fazla miktarda laktik asit istenirken genelde bütirik asit hiç istenmez veya çok az bulunmasına müsaade edilir (Kung, 2005). Silaj materyalinde her bir g taze materyal başına  $10^2$  ila  $10^4$  gibi düşük sayıda homofermentatif aside toleranslı laktik asit bakterisi bulunur ve silolama esnasında bu tip çok sayıda laktik asit bakterisinin, özellikle  $10^6/g$  dozunda *Lactobacillus plantarum*'un korumaya yardımcı olduğu bildirilmiştir (Fitzsimons ve ark., 1994). Bu nedenle silaj yapımında, homofermentatif LAB'lerinden birisi olan *L. plantarum* en çok kullanılan bakteri konumunda olmakla birlikte *L. acidophilus*, *Pediococcus cerevisiae*, *P. acidilactici* ve *Enterococcus faecium*'da sıklıkla kullanılmaktadır. Bu mikroorganizmaların fermantasyon esnasında pH düşüşünü hızlandırdığı, silaj kuru madde kaybını azalttığı ve birçok durumda hayvanların performansını iyileştirdiği kanıtlanmıştır (Combs ve Hoffman, 2001). Çoğu LAB inokülantları bitki materyallerinden izole edilen *L. plantarum*'dan oluşmaktadır (Ohmomo ve ark., 2002).

### 1.2. Silaj Oluşumunun Evreleri

Silaj oluşumunun evreleri genel olarak aerobik faz, lag fazı, fermantasyon fazı ve durağan faz olmak üzere dört fazdan meydana gelmektedir (Şekil 1). Bu fazları, silajın açıldığı ve hayvanlara yedirilmeye başlandığı yemleme fazı takip eder.



Şekil 1. Silaj oluşumunun safhaları (Romero ve ark., 2005)

Aerobik fazda, silaj hammaddesi bitkiler kıyıldıktan sonra da solunuma devam eder. Bitkiler ortamdan oksijeni alarak karbondioksiti salarlar. Doğal olarak ortamda bulunan aerobik bakteriler hızla azalmaya başlar. Gerek aerobik bakterilerce gerekse bitkilerin solunumu ile kullanılan oksijen hızla tükenmeye başlar ve kısa bir süre sonra anaerobik evre başlar. Silaj materyali içinde kalan oksijen miktarı lif seviyesine, nem içeriğine, silo dolum oranına ve materyalin kıyılma büyüklüğüne bağlıdır. Oksijenin tamamı karbondioksit dönüştüğü ve ortama oksijen sızıntısı olmadığı takdirde silajda maya ve küf gelişmeyecektir.

Fermentasyon faz, laktik asit bakterilerinin dominant hale geçerek ortam pH'sını 6,5-6,7'den 5,5-5,7'ye düşürdüğü evredir. Laktik asit bakterileri silajda bulunan en önemli mikroflora grubudur. Bu, silaj materyalinin laktik asit tarafından korunmasını sağlamaktadır. Diğer mikroorganizmalar Enterobacteriaceae, clostridial sporlar, mayalar ve küfler silajda negatif etki yapmaktadırlar. İstenmeyen mikroorganizmalar, fermente edilebilir karbonhidratlar için laktik asit bakterileri ile yarışır ve bunların çoğu silaj korunmasında etkili olmamakla birlikte negatif bir etki oluşturmaktadırlar (Avila ve Carvalho, 2019).

Durağan fazda düşük pH bakteriyel faaliyeti durdurur ve silaj dengeye gelir. Eğer yetersiz laktik asit şekillenirse, istenmeyen bakteriler (*clostridia*) bütirik asit üreterek proteinlerde bozulmalara neden olabilir. Yemleme fazı, silajın oluşumu tamamlandıktan sonra hayvanlara yedirilmek üzere açıldığı safhadır ve bu safhanın en büyük sorunu ise maya ve küfün üreyerek silajın aerobik bozulmaya maruz kalmasıdır (Filya 2001).

### *1.3. Silajın Aerobik Stabilitesi ve Yemleme Safhasının Sorunları*

Silo açıldıktan sonra havanın silaj yüzeyi ile temasını engellemek hemen hemen imkânsızdır. Bu safhada kuru madde ve besin madde kaybı en yüksek seviyededir. Çünkü aerobik mikroorganizmalar silajda bulunan şeker, fermentasyon ürünleri (laktik asit ve asetik asit de dahil olmak üzere) ve diğer suda çözünür besin maddelerini kullanmaya başlarlar. Bu suda çözünür bileşenler karbondioksit ve suya dönüşürken silajda ısı yükselmesi de meydana gelir. Maya ve küfler silajın bozulmasında rol oynayan birinci derecede mikroorganizmalardır. Bunların yanı sıra Enterobacteriaceae ve *Bacillus* spp.'da bazı durumlarda bozulmada önemli rol oynamaktadırlar (Woolford, 1990). Silajda, yüksek düzeyde çözülebilir besin madde kaybından başka, bazı küflerce üretilen mikotoksin ve/veya diğer toksik maddeler de gerek hayvan gerekse kontamine hayvansal gıdalarla insan sağlığını ciddi şekilde tehdit etmektedirler.

Silajın aerobik stabilitesi, silaj içi sıcaklığın düşük seviyede seyrettiği ve hava ile teması sonucunda bozulmadan kaldığı sürenin uzunluğu olarak tanımlanmaktadır (Çayiroğlu ve ark., 2016). Silajın aerobik olarak stabil (kararlı) kalması istenen bir durumdur. Genellikle silaj açıldıktan sonra yüksek miktarda mayaya (100,000-1,000,000 maya kolonisi/gr yaş silaj) maruz kalması ile hızla bozulma başlarken, düşük miktarda mayaya (100-10,000 maya kolonisi/gr yaş silaj) maruz kalması durumunda genellikle uzun bir süre stabil kalabilmektedir. Fakat uygun şartlar altında mayanın hücre sayısını 2 saat içinde ikiye katladığı düşünülürse, açıldıktan sonra hava ile temas eden silajın çabucak bozulmaya başlayacağını tahmin etmek zor değildir. Burada rol oynayan başlıca maya türleri *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Issatchhenkia* ve *Saccharomyces*'dir (Woolford, 1990). Laktik asitin mayalar tarafından yıkılması ile yükselen pH, fırsatçı bakterilerin (örneğin *Bacilli*) ile küflerin (örneğin *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium*) üremesine zemin hazırlayarak silajın kalitesinde önemli bir düşüşe sebep olur (McDonald ve ark., 1991).

Hayvanların bozulmuş silajı tüketmesi durumunda, zararlı mayalar tarafından üretilen son ürünlerin rumen fermantasyonunu değiştirmesi, performansın düşmesi ile küf ve diğer mikroorganizmalarca üretilen istenmeyen son ürünlerin (örneğin mikotoksinler) sebep olduğu diğer problemler gözlenebilir. Clostridial fermantasyon geçirmiş ve yüksek düzeyde bütirik asit konsantrasyonuna sahip silaj materyali hava ile temas ettiğinde oldukça stabildir. Bununla birlikte clostridial silajlar yüksek düzeyde kuru madde ve besin madde kaybına sebep olduğu için hiç arzu edilmez. Bunun yanında asetik asit konsantrasyonu yüksek silaj materyali de hava ile temas durumunda oldukça stabildir. Çünkü asetik asit mayaya karşı oldukça toksiktir. Fakat yüksek asetik asit konsantrasyonu da heterolaktik fermantasyonunun bir göstergesi olduğu için gene istenmeyen bir durumdur.

#### *1.4. Aerobik Stabilitiyi Artırmaya Yönelik Çalışmalar*

Silajın aerobik stabilitesini artırmak için şu ana kadar antifungal özellik taşıyan birçok kimyasal katkı maddeleri kullanılmıştır. Propiyonik asit temelli ürünler gerek korozyona sebep olmaması gerekse kullanımının güvenli olması açısından ön plana çıkmaktadır. Ayrışmamış propiyonik asit güçlü bir antifungal özelliğe sahiptir. Ayrışmamış propiyonik asit hem mikroorganizma yüzeyinde aktif kalarak hem de mikropların hücre geçirgenliğini değiştirerek fonksiyon gösterirler. Fakat propiyonik asitin bileşenlerine ayrışması pH'a bağlı bir özellik göstermekte olup, pH 6 civarlarında yaklaşık %1'i, 4,8'de ise yaklaşık %50'si ayrışmaktadır. Dolayısıyla düşük pH'lı silajda propiyonik asit kullanımından istenen verim alınmamaktadır. Bunun yanında sorbik asit, benzoik asit ve asetik asit içerikli antifungal bileşikler de kullanılmakla birlikte, bunların yüksek konsantrasyonlarda kullanılması oldukça pahalıya mal olmaktadır. Diğerlerine göre daha az kullanılmakla birlikte maya ve fungusu kontrol altında tutan maddelerden birisi de amonyaktır. Fakat amonyak kullanımındaki en önemli dezavantaj, uygulama esnasında kullanan kişinin güvenliğidir. Ayrıca amonyak ile muamele edilmiş silajların oranları rumende sindirilebilen ve sindirilemeyen protein miktarları ile tam olarak ayarlanmalıdır. Üre ise silajın aerobik stabilitesini artırmada amonyağa göre daha az etkilidir (Kung, 2005).

Homofermentatif laktik asit bakterisine dayalı bakteriyel inokülanlar fermantasyonu geliştirmek ve kuru madde içeriğini artırmak için silaja sıklıkla ilave edilmektedirler. Bununla birlikte bu inokülanların birçoğu maya gelişimini düşük düzeyde inhibe etmektedirler. Çünkü bu bakterilerce bol miktarda üretilen laktik asit düşük antifungal etkiye sahiptir ve ayrıca mükemmel bir antifungal etkiye sahip uçucu asitlerin miktarını düşürmektedir (Kung, 2005). Laktik asit bakterileri ve selülaz enzim kombinasyonları silajda aerobik stabiliteyi artırmada etkin bir şekilde kullanılmıştır (Seale, 1987). Fakat bu silaj katkı maddelerinin yüksek maliyeti nedeniyle yaygın bir şekilde kullanımını kısıtlamaktadır (Scheirlinck ve ark., 1989).

Son yıllarda, obligat heterofermentatif laktik asit bakterisi olan *Lactobacillus buchneri* değişik silajlarda aerobik stabiliteyi artırmak için silaj inokülanı olarak kullanılmaya başlanmıştır (Muck, 1996; Driehuis ve ark., 1999; Kung ve Ranjit, 2001; Kleinschmit ve ark., 2005). Silaj ortamında laktik

asit konsantrasyonunu azaltması ve asetik asit konsantrasyonunu artırması *L. buchneri*'nin silaj inokülantı olarak kullanılmasındaki en önemli etken olmuştur. *L. buchneri* kullanılması ile silaj ortamında gelişen maya sayısında 10 kata varan azalmalar gözlenmektedir. Bu da silajın aerobik stabilitesinin artmasını sağlamaktadır. Silajdaki laktik asit:asetik asit oranının 3:1 olması istenen bir durum olmakla birlikte *L. buchneri* kullanılan silajlarda bu orana genellikle ulaşamaz. *L. buchneri* kullanılarak yapılan silajlarda meydana gelen kuru madde kaybı aslında en önemli dezavantaj olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalarda, *L. buchneri*'nin kullanıldığı silajlarda meydana gelen kuru madde kaybının kontrol grubuna göre %1-2 daha fazla ortaya çıktığı gözlenmiştir (Holzer ve ark., 2003). Bu olumsuz etkisi, silaj yapımında *L. buchneri* kullanımını kısıtlayan önemli bir unsur olarak karşımıza çıkmaktadır. Fakat yemleme safhasında bozulmanın büyük boyutlarda olması durumunda, bu olumsuzluk göz ardı edilerek *L. buchneri*'nin kullanılması tavsiye edilen bir durumdur.

#### 1.5. Silajın Aerobik Stabilitesinin Artırılmasına Yönelik Biyoteknolojik Yaklaşımlar

Silajın aerobik stabilitesinin artırılması amacıyla kullanılan ve yukarıda bahsi geçen katkı maddelerinin yüksek maliyet, yeterli etkiye sahip olmaması, kullanıcı sağlığını tehdit etmesi, kuru madde kaybını artırması gibi sebeplerden dolayı kullanımının kısıtlanması, sorunu çözmek amacıyla bilim insanlarını farklı yaklaşımlara yönlendirmektedir. Bu yaklaşımların başında biyoteknoloji ve rekombinant DNA teknolojisi gelmektedir. Laktik asit bakterileri üzerine yapılan çalışmalar genellikle fermantasyonun geliştirilmesi, silajın depolanması ve hayvanlar tarafından sindirilebilirliğinin artırılmasına katkı sağlayacak laktik asit bakterilerinin geliştirilmesini hedeflemiştir (Bates ve ark., 1989; Ozkose ve ark., 2009). Maya ve fungusların ortamda gelişmesini önleyebilecek enzim veya diğer moleküllerin silaj bakterilerinde klonlanması ile bu enzim veya moleküllerin silaj ortamına doğrudan sentezlenmesi, böylece fungus ve maya gibi istenmeyen mikroorganizmaların baskılanarak silajda bozulmanın önüne geçilmesi gibi alternatif arayışlar güncelliğini korumaktadır. Bu arayışlar içerisinde, maya hücre duvarının yapısında bulunan  $\beta$ -1,3-glukanlar,  $\beta$ -1,6-glukanlar, mannopteinler ve kitinler gibi kompleks polimerlerin ilgili enzimlerce hidrolizine yönelik çalışmalar önceliğini korumaktadır. Farklı kaynaklarda *Cellulomonas cellulans*, *Oerskovia xanthineolytica* ve *Arthroacter luteus* gibi sinonim isimlerle de karşımıza çıkan *Cellulosimicrobium cellulans*, maya litik enzimleri olan endo- $\beta$ -1,3-glukanazların, proteazların ve mannanazların önemli bir üretim kaynağıdır. *C. cellulans* endo- $\beta$ -1,3-glukanaz enziminin kilit öğelerini ve maya hücre duvarı litik enzimlerini içermektedir. Bu enzim preparasyonlarının büyük kısmını endo- $\beta$ -1,3-glukanazlar oluşturmaktadır. Farklı *C. cellulans* suşlarından  $\beta$ -1,3-glukanaz genleri diğer mikroorganizmalarda klonlanarak rekombinant olarak üretimi gerçekleştirilmiştir (Doi ve Doi, 1986; Ferrer ve ark., 1996a; Ferrer ve ark., 1996b; Okazaki ve ark., 2007; Özcan ve ark., 2013a). Fakat *C. cellulans*  $\beta$ -1,3-glukanaz geninin *L. plantarum*'da klonlanarak aerobik stabiliteyi artırabilecek rekombinant bir silaj inokülantının geliştirilmiş olması (Özcan ve ark., 2013b) silajın aerobik stabilitesi açısından ayrı bir anlam taşımaktadır. Bilhassa bu mikroorganizmadan elde edilen ve Litikaz, Zimolizaz ve Kantazim ticari

ismiyle piyasada bulunan enzimler maya-litik preparatı olarak kullanıma sunulmuştur. Bu enzimler maya protoplast preparasyonlarında ve maya DNA'sı izolasyonlarında halen yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *Cellulosimicrobium cellulans*  $\beta$ -1,3-glukanazları maya ve fungus hücre duvarı yapısal analiz çalışmalarında ve temel biyolojik araştırmalarda geniş potansiyel uygulama alanı bulması sebebiyle (Ferrer, 2006) bu konu üzerindeki çalışmalar devam etmektedir. Silajın aerobik stabilitesinin artırılmasına yönelik bir başka yaklaşım, *L. buchneri* bakterisinde  $\beta$ -1,3-glukanaz ve kitinaz gibi maya ve fungus hücre duvarını lize eden enzim genlerinin klonlanarak rekombinant silaj inokülanlarının geliştirilmesi olabilir.

Rekombinant silaj inokülanı geliştirilmesinde bir diğer yaklaşım kitinaz enzimi üreten *L. plantarum* suşunun geliştirilmesi olmuştur (Nguyen ve ark., 2012). Kitin fungal hücre duvarının esansiyel bileşenlerinden birisidir ve kitinaz enzimlerince depolimerize edilebilir. Bu, özellikle silajın aerobik stabilitesinin artırılması için olumlu bir yaklaşım olabilir. Hatta kitinaz ve  $\beta$ -1,3-glukanaz enzimlerini bir arada üreten rekombinant *L. plantarum* bakterisinin geliştirilmesi, aynı anda maya ve fungus kontaminasyonlarına karşı bir koruma sağlayabileceğinden, daha iyi bir yaklaşım olabilir.

#### 1.6. Silajın Kalitesini Artırmak İçin Yapılmış Gen Aktarım Çalışmaları

Silajda kaliteyi artırmak için bazı biyoteknolojik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda vazgeçilmez bir silaj inokülanı olan *L. plantarum* yoğun bir şekilde kullanılmış ve bu mikroorganizmada bazı genler klonlanmıştır (Özcan ve Ayaşan, 2009).  $\beta$ -1,4-glukanaz geni klonlanarak geliştirilmiş *L. plantarum* bu konuda önemli bir adımdır. Çünkü  $\beta$ -1,4-glukanaz hem kuru madde kaybını azaltmakta hem de bitkilerin hücre duvarını yumuşatarak laktik asidin bitki dokularına nüfuzunu hızlandırmaktadır. Yapılan çalışmada endo-1,4- $\beta$ -glukanaz geni aktarılmış *L. plantarum* suşunun silajda kullanılması ile asitlenme kapasitesinin arttığı da bildirilmiştir (Rossi ve ark., 2001). Yine silajda kaliteyi ve sindirilebilirliği artırmak amacıyla selülaz, ksilanaz ve likenaz genleri de *L. plantarum*'a klonlanarak yeni silaj inokülanları geliştirilmiştir (Scheirlinck ve ark., 1990). Ksilanaz enziminin silaj materyalinden fermente edilebilir karbonhidratları serbest bırakacağından, ksilanaz enzimini rekombinant olarak üreten *L. plantarum* bakterisinin silaj kalitesinin artırılmasında önemli bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (Kulkarni ve ark., 1999).

Yoncanın önemli miktarda nişasta içermesi, yonca silajlarında amilolitik aktiviteye sahip silaj inokülanlarının kullanılmasını gerektirebilir. Fakat silaj inokülanı olarak kullanılan birçok laktik asit bakterisi amilolitik aktiviteden yoksundur. Bu sebeple yoncanın materyal olarak kullanıldığı silajlarda kullanılabilme üzere *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amilazını rekombinant olarak üreten *L. plantarum* bakterisi geliştirilmiştir (Fitzsimons ve ark., 1994). Benzer bir çalışmada Scheirlinck ve ark. (1989) *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -amilaz geni ile *Clostridium thermocellum* endoglukanaz genlerinin *L. plantarum* kromozomuna integrasyonunu gerçekleştirerek her iki enzimi de ekstraselüler olarak üreten rekombinant silaj inokülanı geliştirmişlerdir. Bununla birlikte, yonca silajında  $\alpha$ -amilaz geni

aktarılmış silaj inokülantının kullanılması çok anlamlı bir yaklaşım olmayabilir. Zira yoncanın sorunu, buffer kapasitesinin (asite dirençliliğinin) yüksekliğidir.

## 2. Sonuç

Silaj, su içeriği bakımından zengin kaba yemlerin oksijensiz ortamda laktik asit bakterilerince fermantasyona uğratarak elde edilen, besin değeri yüksek ve hayvancılıkta vazgeçilemeyen bir kaba yemdir. Yapımında laktik asit bakterilerinden faydalanılması dolayısıyla gerek yem değerinin gerekse açıldıktan sonra aerobik stabilitesinin artırılması konusunda biyoteknolojinin yoğun ilgisine maruz kalmıştır. Özellikle temel laktik asit bakterisi olan *L. plantarum* bu ilginin odağı haline gelmiş, silajın yem değerinin artırılmasına katkı sağlayacak bazı genler bu bakteride klonlanmıştır. Yine silaj açıldıktan sonra en büyük problem olan aerobik bozulmanın önüne geçebilmek için eklenen bazı katkı maddelerinin tek başına yeterli olmaması, maliyetinin yüksekliği, kullanıcı sağlığını tehdit etmesi, silajda kuru madde kaybına sebep olmaları gibi bazı olumsuzlukları biyoteknologların gözünden kaçmamış ve bu soruna temel çözüm bulma arayışlarına girmişlerdir. Özellikle aerobik bozulmanın en büyük nedenlerinden olan maya ve fungus gibi mikroorganizmaların, silaj açıldıktan sonra ortamda üreme ve gelişmesini önleyecek bazı enzimlere ait genlerin laktik asit bakterilerinde klonlanarak bu enzimlerin silaj ortamına doğrudan sentezlenmesine yönelik çalışmalar güncelliğini korumaktadır.

## Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarı herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazar makaleye %100 oranında katkı sağlamış olduğunu beyan eder.

## Kaynakça

- Avila CLS., Carvalho BF. Silage fermentation-updates focusing on the performance of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology* 2019; doi:10.1111/jam.14450.
- Bates EEM., Gilbert HJ., Hazlewood GP., Huckle J., Laurie JL., Mann SP. Expression of a *Clostridium thermocellum* endoglucanase gene in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 1989; 55: 2095-2097.
- Basmacıoğlu H., Ergül M. Silaj mikrobiyolojisi. *Hayvansal Üretim* 2002; 43(1): 12-24.
- Combs DK., Hoffman PC. *Lactobacillus buchneri* for silage aerobic stability. *Focus on Forage* 2001; 3(14): 1-3.
- Çayıroğlu H., Coşkun İ., Şahin A. Silajın aerobik stabilitesini etkileyen faktörler ve iyileştirme stratejileri. *Alınları* 2016; 31(B): 91-97.
- Doi K., Doi A. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for an *Arthrobacter*  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanase. *Journal of Bacteriology* 1986; 168(3): 1272-1276.



- Driehuis F., Oude Elferink SJWH., Spolestra SF. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *Journal of Applied Microbiology* 1999; 87: 583-594.
- Ergül M. Yem zararlıları ve etkileri. International Animal Nutrition Congress 2000', 4-6, Eylül 2000, Isparta-Türkiye.
- Fabiszewska AU., Zielinska KJ., Wrobel B. Trends in designing microbial silage quality by biotechnological methods using lactic acid bacteria inoculants: a minireview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2019; 35(76): 1-8.
- Ferrer P., Halkier T., Hedegaard L., Savva D., Diers I., Asenjo JA. Nucleotide sequence of a  $\beta$ -1,3-glucanase isoenzyme II<sub>A</sub> gene of *Oerskovia xanthineolytica* LL G109 (*Cellulomonas cellulans*) and initial characterization of the recombinant enzyme expressed in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 1996a; 178(15): 4751-4757.
- Ferrer P., Hedegaard L., Halkier T., Diers I., Savva D., Asenjo JA. Molecular cloning of a lytic  $\beta$ -1,3-glucanase gene from *Oerskovia xanthineolytica* LL G109: A  $\beta$ -1,3-glucanase able to selectively permeabilize the yeast cell wall. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1996b; 782(1): 555-565.
- Ferrer P. Revisiting the *Cellulosimicrobium cellulans* yeast-lytic  $\beta$ -1,3-glucanases toolbox: A review. *Microbial Cell Factories* 2006; 5(10): 1-8.
- Filya İ. Silaj fermentasyonu. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 2001; 32(1): 87-93.
- Fitzsimons A., Hols P., Jore J., Leer RJ., O'connell M., Delcour J. Development of an amylolytic *Lactobacillus plantarum* silage strain expressing the *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase gene. *Applied and Environmental Microbiology* 1994; 60(10): 3529-3535.
- Holzer M., Mayrhuber E., Dannerr H., Braun R. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends in Biotechnology* 2003; 21: 282-287.
- Kleinschmit DH., Schmidt RJ., Kung Jr L. The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science* 2005; 88: 2130-2139.
- Kulkarni N., Shendye A., Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 1999; 23: 411-456.
- Kung Jr L., Ranjit NK. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *Journal of Dairy Science* 2001; 84: 1149-1155.
- Kung L. Aerobic stability of silages. *Proceedings of the Silage for Dairy Farms*, Harrisburg, PA, 2005, University of Delaware, Department of Animal and Food Sciences.
- McDonald P., Henderson AR., Heron SJE. *The biochemistry of silage*. 2nd ed. Chalcombe Publ., Church Lane, Kingston, Canterbury, Kent, UK 1991.
- McDonald P. *The biochemistry of silage*. John Wiley and Sons. Chalcome Publications, 226, 1981.
- Menke KH., Huss W. *Tierernährung und Futtermittelkunde*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart 1975.
- Muck RE. A lactic acid bacteria strain to improve aerobic stability of silages. In, *Research Summaries*,

- 42-43, U.S. Dairy Forage Research Center, Madison, WI 1996.
- Nguyen HA., Nguyen T-H., Nguyen T-T., Peterbauer CK., Mathiesen G., Haltrich D. Chitinase from *Bacillus licheniformis* DSM13: Expression in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and biochemical characterization. *Protein Expression and Purification* 2012; 81: 166-174.
- Ohmomo S., Tanaka O., Kitamoto HK., Cai Y. Silage and microbial performance, old story but new problems. *Japan Agricultural Research Quarterly* 2002; 36(2): 59–71.
- Okazaki K., Nishimura N., Matsuoka F., Hayakawa S. Cloning and characterization of the gene encoding endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Arthrobacter* sp. NHB-10. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2007; 71(6): 1568-1571.
- Ozkose E., Akyol I., Kar B., Comlekcioglu U., Ekin MS. Expression of fungal cellulase gene in *Lactococcus lactis* to construct novel recombinant silage inoculants. *Folia Microbiologica (Praha)* 2009; 54: 335–342.
- Özcan BD., Ayaşan T. Hayvan beslemede biyoteknoloji uygulamaları. *Journal of Poultry Research* 2009; 8(1): 58-64.
- Özcan BD., Özcan N., Baylan M., Güzel Aİ. Cloning and expression of  $\beta$ -1,3-glucanase gene from *Cellulosimicrobium cellulans* in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2013a; 19(3): 523-528.
- Özcan BD., Özcan N., Baylan M., Güzel Aİ. Cloning and expression of *Cellulosimicrobium cellulans*  $\beta$ -1,3-glucanase gene in *Lactobacillus plantarum* to create new silage inoculant for aerobic stability. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2013b; 19(4): 575-581.
- Özdüven ML., Koç F., Yurtman İY. Mikrobiyal katkı maddelerinin mısır silajında kalite ve aerobik dayanıklılık üzerindeki etkileri. *Tarım Bilimleri Dergisi* 1999; 5(3): 7-12.
- Romero J., Castillo M., Burns J. Forage Conservation Techniques: Silage and Haylage Production Introduction. *North Carolina Cooperative Extension Resources* 2005; 1-8.
- Rossi F., Rudella A., Marzotto M., Dellaglio F. Vector-free cloning of a bacterial endo-1,4- $\beta$ -glucanase in *Lactobacillus plantarum* and its effect on the acidifying activity in silage: Use of recombinant cellulolytic *Lactobacillus plantarum* as silage inoculant. *Antonie Leeuwenhoek* 2001; 80(2): 139-147.
- Scheirlinck T., Mahillon J., Joos H., Dhaese P., Michiels F. Integration and expression of  $\alpha$ -amylase and endoglucanase genes in the *Lactobacillus plantarum* chromosome. *Applied and Environmental Microbiology* 1989; 55(9): 2130-2137.
- Scheirlinck T., Meutter JD., Arnaut G., Joos H., Claeysens M., Michiels F. Cloning and expression of cellulase and xylanase genes in *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1990; 33(5): 534-541.
- Seale DR. Bacteria and enzyme as products to improve silage preservation. In, Wilkinson JM, Stark BA (Eds): *Developments in Silage*. 47-61, Chalcombe Publications, Marlow, United Kingdom 1987.

Woolford MK. The detrimental effects of air on silage. *Journal of Applied Microbiology* 1990; 68: 101-116.

Woolford MK. *The Science and Technology of Silage Making*. Alltech Technical Publications, 1999.

Yurtman İY., Koç F., Özdüven ML., Erman MS. Silaj üretiminde mikrobiyal katkı maddelerinin kullanımı. *Trakya Bölgesi II. Hayvancılık Sempozyumu*, 9-10 Ocak 1997, s. 346-351, Tekirdağ.