



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**POLYSORBATE 80 ve EUGENOLÜN
IN-VITRO RUMEN FERMENTASYONUNA ETKİLERİ**

Oğuz Berk GÜNTÜRKÜN

**HAYVAN BESLEME ve BESLENME HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Adnan ŞEHU**

ANKARA

2017

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLYSORBATE 80 ve EUGENOLÜN
IN-VITRO RUMEN FERMENTASYONUNA ETKİLERİ**

Oğuz Berk GÜNTÜRKÜN

**HAYVAN BESLEME ve BESLENME HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Adnan ŞEHU**

**Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün
15L0239006 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2017**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Polysorbate 80 ve Eugenolün *In-Vitro* Rumen Fermentasyonuna Etkileri” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Oğuz Berk Güntürkün

Tarih: 03/10/2017

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalında
Oğuz Berk GÜNTÜRKÜN tarafından hazırlanan
“Polysorbate 80 ve Eugenolün *In-Vitro* Rumen Fermentasyonuna Etkileri”
adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.
Tez Savunma Tarihi: 03/10/2017

Prof. Dr. Sakine YALÇIN

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Adnan ŞEHU

Ankara Üniversitesi

Raportör

Prof. Dr. Mehmet BAŞALAN

Kırıkkale Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Hakan ÖZTÜRK

Ankara Üniversitesi

Üye

Doc. Dr. İlkay AYDOĞAN

Kırıkkale Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
yönetim kurulu tarafından onaylanmıştır

Prof. Dr. Mehmet AKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xii
Çizelgeler	xiii

1. GİRİŞ	1
1.1. Rumen Ortamı	1
1.2. Rumen Ekosistemi	3
1.2.1. Bakteri	3
1.2.2. Protozoa	8
1.2.3. Mantar	9
1.3. Rumende Yemlerin Sindirimi	11
1.3.1. Rumende Uçucu Yağ Asitlerinin Üretimi	14
1.3.2. Mikrobiyel Gelişim ve Fermentasyon	15
1.3.3. Rumende Metan Üretimi	16
1.4. Rumen Metan Üretiminin Kontrolü	17
1.4.1. Rasyon Kaba Yem : Konsantre Yem Oranı	17
1.4.2. İyonoforlar	18
1.4.3. Organik ve İnorganik Alternatif Hidrojen Bağlayıcıları	20
1.4.4. Mikrobiyel Yem Katkıları	21
1.4.5. Asetogenezisin Rumende Arttırılması	22
1.5. Rumen Azot Metabolizması ve Azot Değerlendirme Etkinliği	23
1.5.1. Proteinlerin Rumende Yıkımlanması	23
1.5.2. Üre Döngüsü	27
1.5.3. Üre-Azot Geri Kazanımı	28
1.5.4. Ruminantlarda Azot Değerlendirilme Etkinliği	28

1.5.5.	Rumen Azot Metabolizmasının Manipülasyonu	29
1.6.	Bitkisel Esansiyel Yağlar	31
1.6.1.	Bitkisel Esansiyel Yağların Sınıflandırılması	32
1.6.2.	Esansiyel Yağların Etki Mekanizmaları ve Biyolojik Özellikleri	33
1.6.3.	Esansiyel Yağların Rumen Fermentasyonu Üzerine Etkileri	36
1.6.3.1.	Esansiyel Yağların Protein Metabolizmasına Olan Etkileri	36
1.6.3.2.	Esansiyel Yağların Uçucu Yağ Asiti Metabolizmasına Olan Etkileri	38
1.6.3.3.	Esansiyel Yağların Metan Üretimine Olan Etkileri	39
1.6.4.	Eugenol ve Ruminant Beslemede Kullanımı	40
1.7.	Sümfaktanlar	41
1.7.1.	Sümfaktanların Sınıflandırılması	43
1.7.1.1.	Sentetik Sümfaktanlar	43
1.7.1.1.1.	Anyonik Sümfaktanlar	43
1.7.1.1.2.	Kasyonik Sümfaktanlar	44
1.7.1.1.3.	Zwitteronik (Amfoterik) Sümfaktanlar	44
1.7.1.1.4.	İyonik Yapıda Olmayan Sümfaktanlar	44
1.7.1.2.	Biyosümfaktanlar	45
1.7.2.	İyonik Olmayan Sümfaktanların Etki Mekanizması	45
1.7.2.1.	İyonik Yapıda Olmayan Sümfaktanlar ve Rumende Enzim Aktivitesi	46
1.7.2.2.	İyonik Yapıda Olmayan Sümfaktanlar ve Enzim-Substrat Etkileşimi	47
1.7.3.	Ruminant Beslemede İyonik Olmayan Sümfaktanlar İle Yapılan <i>in-vitro</i> Çalışmalar	47
1.7.4.	Polysorbate 80	52
1.8.	Sümfaktanların ve Esansiyel Yağların Birlikte Kullanımı	53
2.	GEREÇ VE YÖNTEM	55
2.1.	Rumen İçeriğı	55
2.2.	Yem Materyali	55
2.3.	Gaz Üretim Tekniğinin Uygulanması	56
2.4.	Yem Maddelerinin In-Vitro Rumen Sindirilebilirliğinin Belirlenmesi	57

2.5.	In-Vitro Fermentasyondan Çıkan Yem Maddelerinin Analizleri ve Değerlendirilmesi	59
2.6.	Rumen Sıvısında UYA Analizi	60
2.7.	In-Vitro Rumen Fermentasyonu Sonucu Ortaya Çıkan Gazda Metan Tayini	61
2.8.	Rumen Sıvısında pH Tayini	61
2.9.	Rumen Sıvısında NH ₃ -N Tayini	62
2.10.	İstatistik Analizler	62
3.	BULGULAR	63
3.1.	Kullanılan Yemlerin Besin Madde Analizi	63
3.2.	Yem Maddelerinin In-Vitro Sindirilebilirlikleri	63
3.2.1.	In-Vitro Gerçek Kuru Madde Sindirilebilirliği	63
3.2.2.	In-Vitro Organik Madde Sindirilebilirliği	65
3.2.3.	In-Vitro NDF Sindirilebilirliği	66
3.3.	Toplam Gaz Üretim Miktarı	67
3.4.	Altıncı Saat Gaz Metan Yoğunluğu	68
3.5.	Altıncı ve Yirmi Dördüncü Saat Arası Gaz Metan Yoğunluğu	69
3.6.	Toplam Net Metan Gazı Üretim Miktarı	70
3.7.	Rumen Sıvısı Uçucu Yağ Asiti Yoğunluğu	71
3.7.1.	Asetik Asit Yoğunluğu	71
3.7.2.	Propiyonik Asit Yoğunluğu	72
3.7.3.	Bütirik Asit Yoğunluğu	72
3.7.4.	Toplam Uçucu Yağ Asidi Yoğunluğu	73
3.7.5.	Asetik Asit : Propiyonik Asit Oranı	74
3.8.	Rumen Sıvısı NH ₃ -N Yoğunluğu	75
3.9.	Rumen Sıvısı pH Değeri	76
4.	TARTIŞMA	78
4.1.	Yem Maddelerinin In-Vitro Sindirilebilirlikleri	78
4.2.	Toplam Gaz Üretimi	85
4.3.	Metan Gazı Miktar ve Yoğunluğu	88
4.4.	Uçucu Yağ Asiti Yoğunluğu	91

4.5.	Amonyak Azotu	97
4.6.	Ph	101
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	104
	ÖZET	107
	SUMMARY	110
	KAYNAKLAR	113
	ÖZGEÇMİŞ	131



ÖNSÖZ

İnsan nüfusundaki hızlı artış, tarıma elverişli ve kullanılabilir alanlardaki düşüş, şehirleşme, endüstriyel gelişim ve hayvansal ürünlere olan talepteki artış ile diğer hayvancılık alanlarında olduğu gibi ruminantların üretimi, bakım ve beslenmesi alanında da küresel ölçekte köklü değişiklikler şekillenmiştir. Bahsedilen değişiklikler özellikle bölgesel sığır popülasyon büyüklüğü, yönetim ve besleme sistemlerinde gözlenmiştir. Gelecekte bahsedilen talep artışının karşılanması adına hayvancılıkta kullanılan üretim sistemlerinde yeni değişiklikler şekillenmesi öngörülmektedir. Bu değişikliklerin amacı çevre ve insan sağlığı ile biyoçeşitlilik ve doğal kaynaklar korunurken elde edilen verimde artışın sağlanmasıdır.

Rumende bulunan mikroorganizmalar yemlerin hayvansal ürünlere dönüşümü ve çevre üzerine oldukça büyük önem arz etmektedir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde hayvancılık hem sayısal hem de üretkenlik anlamında gelişirken sürdürülebilir besleme sistemlerinin geliştirilebilmesi ve mevcut yem ve doğal kaynakların ideal seviyede değerlendirilebilmesi için rumen mikrobiyel ekosisteminin daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Yemlerin daha etkin değerlendirilebilmesi amacı ile antibiyotiklerin kullanımına ilişkin çalışmalar uzun yıllar boyunca gerçekleştirilmiştir. Özellikle iyonofor antibiyotiklerin besi sığırı rasyonlarında kullanımının rumende metan üretimine bağlı oluşan enerji kayıplarını düşürebileceği bildirilmiştir. Ancak antibiyotiklere karşı gelişen bakteriyel direnç nedeni ile Avrupa Birliği tarafından antibiyotiklerin büyüme faktörü olarak kullanımı yasaklanmıştır. Ruminantların verilen yemleri insan tüketimine uygun ürünlere daha etkin şekilde dönüştürebilmesi için farklı etki mekanizmalarına sahip çok farklı bileşikler üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu çalışmanın amacı da sürdürülebilir hayvan besleme uygulamalarının sağlanması ve yemlerin hayvansal ürünlere dönüşüm etkinliğini arttırabilmek adına farklı bileşiklerin *in-vitro* rumen fermentasyon ortamına etkilerini ortaya koymaktır.

Doktora çalışmamda tecrübe ve bilgi birikimi ile bana yol gösteren ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Adnan ŞEHU'ya teşekkürü borç bilirim. Anabilim dalımızda kurduğu *in-vitro* rumen laboratuvarının kullanım imkanlarını bana sunan Prof. Dr. Gültekin YILDIZ hocama ve çalışmam boyunca tecrübe ve bilgi birikimleri ile beni destekleyen anabilim dalımız öğretim üyeleri Prof. Dr. Sakine YALÇIN, Prof. Dr. Kemal KÜÇÜKERSAN, Prof. Dr. Seher KÜÇÜKERSAN, Prof. Dr. Pınar SAÇAKLI hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Mesai arkadaşlığı yapma şansını yakaladığım ve çalışmalarımın çeşitli evrelerinde sürekli desteklerini aldığım Dr. Özge SIZMAZ, Dr. Ali ÇALIK, Dr. Özlem AYDIN, Emre Sunay GEBEŞ, Shazaib RAMAY ve anabilim dalımız personeli Ayşe AKSOY ve Serpil KOÇYİĞİT'e teşekkürleri borç bilirim.

Çalışmanın istatistiksel analizlerinin yapımında emeği geçen Dr. Doğan ÖZEN ve çalışmanın çeşitli aşamalarında tecrübe ve birikimleri ile bana yol gösteren tez izleme komitesi üyesi Doç. Dr. Hakan ÖZTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve kişisel gelişimim için bana çok önemli katkılar sağlayan aileme sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

ADF	Acid Detergent Fiber
ANOVA	Analysis of variance (Varyans analizi)
APG	Alkyl Polyglycoside
Asetil CoA	Asetil Koenzim A
ATP	Adenozin trifosfat
B	Kör Grubu
°C	Santigrat derece
C ₅ H ₈	İzopiren
CNCPS	The Cornell Net Carbohydrate and Protein System
CO ₂	Karbon Dioksit
dk	Dakika
dl	Desilitre
E3	300 µg/ml Öjenol Grubu
E6	600 µg/ml Öjenol Grubu
g	Gram
H ₂	Hidrojen
K	Kontrol Grubu
kg	Kilogram
l	Litre
M1	0.5 µl/ml Polysorbate 80 + 300 µg/ml Öjenol Grubu
M2	1 µl/ml Polysorbate 80 + 600 µg/ml Öjenol Grubu
M3	0.5 µl/ml Polysorbate 80 + 600 µg/ml Öjenol Grubu
M4	1 µl/ml Polysorbate 80 + 300 µg/ml Öjenol Grubu
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
mosm	Miliozmol
mV	Milivolt

NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Artı Hidrojen
NDF	Neutral Detergent Fiber
NH ₃ -N	Amonyak Azotu
ppm	Parts Per Million
S1	0.5 µl/ml Polysorbate 80 Grubu
S2	1 µl/ml Polysorbate 80 Grubu
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Span85	Sorbitan Triolat
U	Ünit
UYA	Uçucu Yağ Asitleri
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Rumende gerçekleşen fermentasyon reaksiyonları (France ve Dijkstra, 2005)	13
Şekil 1.2. Farklı karbonhidrat fraksiyonlarının fermentasyonu sonucu oluşan uçucu yağ asitleri miktarının (mMol) modelleme yolu ile hesaplanması (Dong ve Zhao, 2014)	15
Şekil 1.3. Çeşitli uçucu yağ asitlerinin oluşumu esnasında üretilen hidrojen miktarları (Hegarty ve Gerdes, 1998)	15
Şekil 1.4. Rumen azot döngüsü (Bach ve ark., 2005)	26
Şekil 1.5. Rumen protein değerlendirme etkinliğinin arttırılabilmesi için manipüle edilmek istenen reaksiyonlar (Jouany ve Morgavi, 2007)	30
Şekil 1.6. Karvakrolün olası etki mekanizması (Ultee ve ark., 2002)	35
Şekil 1.7. Sürfaktanların genel yapısı (Holmberg ve ark., 2003)	41
Şekil 1.8. Küresel miselin şematize edilmiş görüntüsü (Holmberg ve ark., 2003)	42
Şekil 2.1. In-Vitro Gerçek Kuru Madde, Organik Madde ve NDF sindirilebilirliklerinin hesaplanmasında kullanılan eşitlikler	59
Şekil 2.2. Uçucu yağ asidi kalibrasyon eğrisi	60
Şekil 2.3. Metan kalibrasyon eğrisi	61

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Rumende faaliyet gösteren bazı bakterilerin kullandıkları substrata göre sınıflandırılması (Kamra, 2005)	6
Çizelge 1.2.	Rumende ortamından izole edilmiş ana protozoa ve mantarlar (Castillo-González ve ark., 2014)	10
Çizelge 2.1.	Gaz üretimi uygulamasında gruplarda bulunan katkılar	57
Çizelge 2.2.	In-Vitro Sindirilebilirlik Uygulamasında İnkübasyonlara Göre Kullanılan Katkılar	58
Çizelge 3.1.	Araştırmada kullanılan yem maddelerinin analiz değerleri (%)	63
Çizelge 3.2.	Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının <i>in-vitro</i> gerçek kuru madde sindirilebilirliğine (%) etkisi	64
Çizelge 3.3.	Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının <i>in-vitro</i> organik madde sindirilebilirliğine (%) etkisi	65
Çizelge 3.4.	Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının <i>in-vitro</i> NDF sindirilebilirliğine (%) etkisi	66
Çizelge 3.5.	Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının her bir gram yem kuru maddesinin <i>in-vitro</i> fermentasyonu sonucu 24. saatte açığa çıkardığı toplam net gaz miktarına (ml) etkisi	67
Çizelge 3.6.	Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının <i>in-vitro</i> gaz üretim metodu ile üretilen gazın inkübasyonun 6. saatinde ölçülen metan yoğunluğuna (%) etkisi	68
Çizelge 3.7.	Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının <i>in-vitro</i> gaz üretim metodu ile üretilen gazın inkübasyonun 6-24. saatinde ölçülen metan yoğunluğuna (%) etkisi	69

Çizelge 3.8.	Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının Fermentasyonun 24. saatinde her gram yem fermentasyonu için ortaya çıkan toplam net metan gazı üretimine etkisi	70
Çizelge 3.9.	Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının Fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan asetik asit yoğunluğuna (mmol/l) etkileri	71
Çizelge 3.10.	Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının Fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan propiyonik asit yoğunluğuna (mmol/l) etkileri	72
Çizelge 3.11.	Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının Fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan bütirik asit yoğunluğuna (mmol/l) etkileri	73
Çizelge 3.12.	Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının Fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan toplam uçucu yağ asidi yoğunluğuna (mmol/l) etkileri	74
Çizelge 3.13.	Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının Fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamındaki Asetik asit : Propiyonik asit oranına etkileri	75
Çizelge 3.14.	Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının Fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan amonyak azotu (NH ₃ -N) yoğunluğuna (mmol/l) etkileri	76
Çizelge 3.15.	Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının Fermentasyonun 24. Saatinde fermentasyon ortamı pH'sına etkileri	77

1. GİRİŞ

Rumen fermentasyonu organik besin maddelerinin anaerobik oksidasyonu olarak bilinmektedir (Russel ve Strobel, 2005). Bakteri, protozoa ve mantar gibi birincil sindirimi gerçekleştiren mikroorganizmalar nişasta ve protein gibi hücre duvarı polimerlerini hidrolize ederek ortaya şekerler ve amino asitleri çıkarırlar. Açığa çıkan şekerler ve amino asitler ise ikincil sindirim gerçekleştiren mikroorganizmalarca uçucu yağ asitleri (UYA), hidrojen ve karbondioksit çevrilirler (McAllister ve ark., 1996). Bütün bu işlemlerin son basamağı olarak metanojen mikroorganizmalar hidrojeni kullanarak karbondioksiti metana indirgemektedirler. Metan oluşumu ile ortamdan hidrojen uzaklaştırılır ve adenozin trifosfat (ATP) üretimi daha verimli bir şekilde sağlanabilmektedir (McAllister ve ark., 1996).

Metan üretimine başka bir açıdan bakıldığında ise bu işlem rasyon tipi ve sindirilebilirliğine bağlı olmak üzere yemlerde bulunan brüt enerjinin yaklaşık olarak %8'e kadar kaybına neden olmaktadır (Holter ve Young, 1992). Rumen fermentasyon etkinliğinin metan salınımının inhibe edilmesi yoluyla arttırılabilmesi için çalışmalar yoğunlaşmıştır. Elektron kullanımının metan yerine propiyonat üretimine yönlendirilmesi ile uçucu yağ asitlerinde daha çok enerji ve karbon saklanması söz konusu olabilecektir.

1.1. Rumen Ortamı

Ruminantlar sindirim kanallarında barındırdıkları mikroorganizmalar ile simbiyotik bir ilişki içerisindeyler. Bu ilişki sayesinde ruminantlar tek midelilerin

yararlanamadığı selüloz seviyesi yüksek yem maddelerinden faydalanabilmektedirler. Bahsedilen simbiyotik ilişkinin karşılığı olarak da bakterilere uygun bir yaşam ortamı sağlanmaktadır. Normal fizyolojik koşullar altında rumen ortamı mikroorganizmaların çoğalması için mükemmel bir yerleşkedir. Mikroorganizma gelişimi ve fermentasyonuna uygun olduğu belirtilen rumen ortamının başlıca fiziksel özellikleri olarak sıcaklığın 39-41°C aralığında olması, pH'nın genel olarak 5.5-6.9 seviyesinde, redox potansiyelinin - 350-400 milivolt (mV) seviyelerinde ve ozmolaritenin ise 250-350 miliozmol (mosm)/kg aralığında bulunması sayılabilmektedir (Mackie ve ark., 2013). Ancak mikroorganizmaların gelişimini destekleyecek bu özel ortam farklı değişkenler ile kontrol edilmektedir. Bu değişkenler tüketilen yemin niteliğine ve miktarına, salivasyona, rumendeki bileşiklerin absorpsiyonuna ve rumen içeriğinin alt sindirim kanalına geçişine bağımlılık göstermektedir.

Submaxillar ve sublingual bezlerden yalnızca yem tüketimi esnasında tükürük salgılanmakta bunun haricinde parotis bezden tükürük salgısı sürekli devam etmekte ve ruminasyon gibi uyarımlar ile miktarı artmaktadır (Kay, 1966). Parotis bezlerden salgılanan tükürük toplam tükürük oluşumuna en yüksek katkıyı sağlamaktadır ve bu tükürüğün yapısı diğer bezlerden salgılananlara göre daha yüksek alkali ve tamponlayıcı yapıdadır (McDougall, 1948). Sığır tükürük salgısının tampon işlevi görmesi yapısında bulunan yüksek yoğunluktaki bikarbonat (90-120 mM ve 20-45 mM) ve fosfat ile ilişkilendirilmektedir (Bartley, 1976). Tükürük salgısının miktarı tüketilen rasyonun yapısına göre değişiklik göstermektedir ve tükürük rumen pH'sı üzerinde içerdiği bikarbonat ve fosfat sayesinde tamponlayıcı etki göstermektedir (Owens ve ark., 1998). Rumende farklı bir tampon mekanizması ise uçucu yağ asitleri (UYA) tarafından sağlanmaktadır. Bu tampon mekanizma yüksek seviyede konsantre yem ve ruminasyonu uyarmayacak yapıdaki kaba yemler ile beslenen hayvanlarda, rumen pH seviyesinin daha düşük olduğu 4-6 seviyelerinde gözlenmektedir (Emmanuel ve ark., 1969).

1.2. Rumen Ekosistemi

Rumen çok sayıda reaksiyonun gerçekleştiği oldukça karmaşık bir ekosistemdir. Rumende üç ana mikroorganizma tanımlanmıştır. Bunlar bakteri, protozoa ve mantarlardır. Mikrobiyal varlığın sayı ve türü çok farklı faktörlerin etkisi altındadır ve bu faktörlerden en önemlisi ise tüketilen yemdir (Dehority ve Orpin, 1997).

1.2.1. Bakteri

Mikrobiyoloji alanında 19. yüzyılda gözlenen ilerlemeler ile rumen sıvısı, bakteriler ve selüloz sindirimi üzerine olan ilgi yoğunlaşmıştır. Bu mekanizmalar üzerine olan çalışmalar sığırların protein yapısında olmayan azotu da süt üretimi için kullanabileceğini keşfeden bilim insanlarına nobel ödülünü getirmiştir (Virtanen, 1966). Rumende bulunan bakteri sayısı $10^{10} - 10^{11}$ /ml rumen sıvısı olarak belirtilmektedir (Eadie ve Hobson, 1962). Rumen bakterilerinin taksonomisi günümüzde de devam etmektedir ve daha önceden tespit edilemediği düşünülen bakterilerin var olduğu tahmin edilmektedir (Krause ve Russell, 1996).

Rumen biyokütlesinin büyük bir bölümünü anaerobik mikroorganizmalar oluşturmaktadır. Ruminantlar ilk doğdukları anda steril bir sindirim sistemine sahip olmalarına karşın sindirim sistemi bakteriyel kolonizasyonu hızlı bir şekilde gerçekleşir (Cushnie ve ark., 1981). Kuzu ve buzağların doğum sonrası 8. saatte sindirim kanalınının bütün bölümlerinde *Eschericia coli* ve 24 saat sonrasında da *Lactobacillus* alt türleri ve *Streptococcus* alt türleri tespit edilmiştir (Smith, 1965). Doğumu takip eden 48 saat içerisinde anaerob bakterilerin bakteri varlığını baskılaması ile bakteri kolonizasyon işlemi hızlanmaktadır (Fonty ve ark., 1987).

Buzağı rumen içeriğinde selülitik bakteri varlığı 4-5 gün yaş itibariyle başlanmaktadır (Dehority ve Orpin, 1997).

Mikroskopik görüntüleme teknolojisinin ilerlemesi ile mikroorganizmaların rumende yerleştiği bölümlerin görüntülenmesi mümkün olmuştur. Bütün mikroorganizmaların %70'nin yem partikülleri ile ilişkili olduğu, %30'nun ise rumen epiteline bağlı olarak bulunduğu bildirilmektedir (Cheng ve ark., 1977).

Bitki hücre duvarının önemli bir parçası selüloz olduğundan rumen beslemesinde selülitik mikroorganizmalar önemli bir rol oynamaktadırlar (Russel ve ark., 2009). Selülitik bakterilerin yaşaması ve çoğalabilmeleri için ideal rumen koşullarının sağlanması gerekmektedir. Selülitik mikroorganizmalar için nõtüre yakın bir pH değeri idealdir (Weimer, 1996). Rumen ortamındaki iyonize kalsiyum varlığı bu tür bakterilerin ortama yerleşmesine katkı sağlamaktadır (Morales ve Dehority, 2009). Rumen ortamındaki selüloz sindiren bakterilerin yoğunluğunun değerlendirildiği bir çalışma *Ruminococcus albus* ve *Ruminococcus flavefaciens*'in bu bakterilerin %59.8'ni ve *Fibobacter succinogenes*'in ise %19.2'sini oluşturduğu bildirilmiştir.

Tahıl ağırlıklı beslenen yüksek verimli sığırlarda rasyonların önemli bir bileşeni ise nişastadır. Rumende nişastanın sindirilmesinde önemli görev alan bakteriler amilolitik bakterilerdir.

Rumen florasında önemli görev alan bir diğer grup bakteri ise laktat sindiren bakterilerdir. Bu bakteriler laktik asiti metabolize ederek laktatın birikmesini önler, böylelikle rumen pH'sının çok fazla düşmeden belirli bir seviyede kalmasını sağlamaktadırlar (Mackie ve Heath, 1979). Bu bakterilerin rumendeki varlığı

hayvanların yoğun nişasta içeren yemlerle beslenmesi ile artmıştır (Brown ve ark., 2006).

Pektin, gerek pektin içeriği yüksek bitkiler ile gerekse şeker sanayi yan ürünleri ile ağırlıklı olarak beslenen ruminantların rasyonlarında önemli bir bileşendir. Pektin hem bakteriler hem de protozoonlar tarafından sindirilmektedir. Pektin sindiren bakteriler arasında *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Bacteroides ruminicola* ve *Lachnospira multiparus* yer almaktadır (Dehority, 1969). Bu bakteriler rumen içeriğine pektinolitik enzimler üretilip salgılamaktadırlar, pektin lizaz enzimi yardımı ile pektin oligogalaktozlara dönüştürülmektedir (Duskova ve Marounek, 2001).

Rumende biriken hidrojen iyonunun fermentasyonu olumsuz yönde etkilemeden ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir ve bu görevi metan üretimi ile şekillendiren bakterilere metanojen denilmektedir (Bodas ve ark., 2012). Günümüze kadar yalnızca 8 metanojen tür kültüre edilebilmiştir (Kong ve ark., 2013).

Rumende proteinlerin yıkımlanması rumen mikroorganizmalarının enzim üretimi ile proteinlerin peptid ve amino asitlere hidrolize olması ile sağlanmaktadır (Cotta ve Hespell, 1986). Proteolitik aktiviteye sahip olduğu tespit edilen bazı bakteriler *Bacteriodes amylohilus*, *Bacteriodes ruminicola* ve *B. fibrisolvens*’tir (Cotta ve Hespell, 1986). Proteolitik aktivite ayrıca *Streptococcus bovis* ve *Prevotella albensis* tarafından da sağlanmaktadır (Sales ve ark., 2000).

Ruminantların tükettiği yemlerde lipid olarak en sık rastlanan fraksiyonlar trigliseritler, fosfolipidler ve galaktolipidlerdir (Jenkins ve ark., 2008). Tüketilen lipidler rumende ilk olarak mikrobiyel lipaz ile hidrolize edilmektedirler. Lipaz enzimi ester bağları çözerek yağ asitlerini açığa çıkartmaktadır (Liu ve ark., 2009). Lipoliz

işleminde sonra doymamış yağ asitleri ortama mikroorganizmalardan hidrojen iyonu varlığında biyohidrojenizasyon işlemine tabi tutulmaktadır (Jenkins ve ark., 2008). Lipololizis işleminin hızı rasyonda bulunan yağın türüne ve ortam pH'sına göre değişkenlik göstermektedir (Beam ve ark., 2000). *Anaerovibrio lipolytica* iki hidrolitik enzim üretmektedir bunlardan biri hücre membranına bağlı kalmakta diğeri ise hücre dışına salgılanmaktadır (Henderson ve Hodgkiss, 1973). *B. fibrisolvens*'in çoklu doymamış yağ asitlerini biyohidrojenize ettiği bilinmektedir (Maia ve ark., 2010).

Rumen fermentasyonu esnasında yan ürün olarak açığa laktat çıkmaktadır. *Megasphaera elsdenii* laktik asit metabolizmasından sorumlu olan önemli bakteri türü olarak bilinmektedir ve bu nedenle asidozun önlenmesi amaçlı rasyon adaptasyonlarında önemli bir görev oynamaktadır (Counotte ve ark., 1981).

Çizelge 1.1. Rumende faaliyet gösteren bazı bakterilerin kullandıkları substrata göre sınıflandırılması (Kamra, 2005).

Karbonhidratların Metabolizmasında Aktif Olan Bakteriler	
Substrat	Bakteri
Selüloz	<i>F. succinogenes</i> <i>R. flavefaciens</i> <i>R. albus</i> <i>Clostridium cellobioparum</i> <i>Clostridium longisporum</i> <i>Clostridium lochheadii</i> <i>Eubacterium cellulosolvens</i>
Hemiselüloz	<i>E. cellulosolvens</i> <i>P. ruminicola</i> <i>Eubacterium xylanophilum</i> <i>Bacteroides uniformis</i>

Çizelge 1.1. Devam Rumende faaliyet gösteren bazı bakterilerin kullandıkları substrata göre sınıflandırılması (Kamra, 2005).

Karbonhidratların Metabolizmasında Aktif Olan Bakteriler	
Substrat	Bakteri
Nişasta	<i>S. bovis</i> <i>Ruminobacter amylophilus</i> <i>P. ruminicola</i>
Pektin	<i>Treponema saccharophilum</i> <i>Lachnospira multiparus</i>
Şeker/Dekstrin	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> <i>Succinivibrio amylolytica</i> <i>Selenomonas ruminantium</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Bifidobacterium globosum</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium thermophilum</i> <i>Bifidobacterium ruminale</i> <i>Bifidobacterium ruminantium</i>
Azotlu Bileşiklerin Metabolizmasında Aktif Olan Bakteriler	
Protein	<i>P. ruminicola</i> <i>R. amylophilus</i> <i>Clostridium bifermentans</i>
Üre	<i>M. elsdenii</i>
Diğer Bileşiklerin Metabolizmasında Aktif Olan Bakteriler	
Substrat	Bakteri
Laktat	<i>M. elsdenii</i> <i>Wollinella succinogenes</i> <i>Veillonella gazogenes</i> <i>Oxalobacter formigenes</i> <i>Desulphovibrio desulphuricans</i> <i>Desulphatococcus ruminis</i> <i>Succiniclasticum ruminis</i>
Yağ	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>

Çizelge 1.1. Devam Rumende faaliyet gösteren bazı bakterilerin kullandıkları substrata göre sınıflandırılması (Kamra, 2005).

Diğer Bileşiklerin Metabolizmasında Aktif Olan Bakteriler	
Asetat	<i>Eubacterium limosum</i> <i>Acetitomaculum ruminis</i>
Tanin	<i>Streptococcus caprinus</i> <i>Eubacterium oxidoreducens</i>
Mimozin	<i>Synergistes jonesii</i>
Metan	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> <i>Methanobacterium formicicum</i> <i>Methanosarcina barkeri</i> <i>Methanomicrobium mobile</i>

1.2.2. Protozoa

Protozoalar rumende keşfedilen ilk mikro canlılardır. Protozoa rumen mikroflorasının önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Rumen içeriğinin her bir ml'sinde $10^5 - 10^6$ civarında bulunan protozoonlar mikrobiyal biyokütlenin yaklaşık olarak yarısını oluşturmaktadır ancak defaunasyon çalışmaları bu mikro canlıların konakçı için esansiyel olmadığını ortaya koymaktadır (Bird ve Leng, 1978; Dehority, 1984). Protozoalar kısa süreli sıcaklık dalgalanmaları ve oksijen varlığına dirençlidirler (Bonhomme, 1990). Bakterilerde olduğu gibi protozoa da rumen sıvısında serbest şekilde, rumen duvarına yapışık veya yem parçacıklarına yapışık olmak üzere 3 şekilde bulunmaktadır (Bonhomme, 1990). Protozoonların rumendeki sayıları gün içerisinde farklılık gösterebilmektedir. Bunun nedeni yem tüketimi sonrası özellikle *Isotricha* ve *Dasytricha* familyasındakilerin retikulumdan rumene hareket etmeleridir (Dehority and Tirabasso, 1989).

Rumende en sık rastlanan protozoa en küçük, basit olan *Entodinium* alt türleridir (Williams ve Coleman, 1992). Protozoalar yem parçacıklarına yapışık kaldıklarından dolayı rumenden abomazuma rumen sıvı fazında bulunan bakteri ve besin maddelerine

kıyasla daha yavaş geçmektedirler (Hook ve ark., 2012). *Holotricha* familyasındaki protozoonların bünyelerine aldıkları şekerlerin %82'sini amilopektine çevirerek depoladıkları bildirilmiştir (Williams, 1986). Protozoonların nişastayı bünyesinde depo edebildikleri ve yüksek seviyede nişasta içeren yemlerin tüketiminden sonra asidoz riskini düşürebileceği bildirilmiştir (Van Zwieten ve ark., 2008). *Entodimorphida* ve *Holotricha* familyasındaki bazı protozoonların karbonhidratı asetat, karbondioksit ve hidrojene çevirebilecek enzim yapısına sahip olduğu tespit edilmiştir (Yarlett ve ark., 1983).

Ciliate protozoonların rumendeki mikrobiyel selüloz sindiriminin %30-40'ından sorumlu olduğu düşünülmektedir (De Meyer ve ark., 1981). Protozoonların selülitik aktivitesinin yanında yapılan araştırmalar selülitik aktivitesi bilinen *Diploplastron affine*'nin aynı zamanda amilolitik enzimler de salgıladığı ve nişastayı yıkımladığını ortaya koymuştur (Wereszka ve Michalowski, 2012). Bakterilerin yanında rumende protozoaların da özellikle çözünmemiş olarak bulunan katı proteinlerin yıkımlanması işlemine katkı sağladığı bildirilmiştir (Hino ve Russell, 1987). Ancak rumen bakterilerinin proteolitik aktivitesinin protozoalardan daha yüksek olduğu bilinmektedir ve protozoonların sindirdiği protein substratı genellikle bakterilerin sindirdiklerinden daha farklıdır (Lockwood ve ark., 1988).

1.2.3. Mantar

Rumendeki varlığı en son keşfedilen mikroorganizmalar anaerob mantarlardır (Orpin, 1977). Rumen ekosisteminin büyük bir bölümünü oluşturmamalarına rağmen ruminantlar tarafından tüketilen yemlerin sindiriminde etkin rol oynamaktadırlar (Nam ve Garnsworthy, 2007). *Neocallimastix frontalis*, *Piromyces joyonii* ve *Orpinomyces communis*'in yapısal polisakkaritleri etkin bir şekilde sindirebilecek enzimleri salgıladığı bildirilmiştir (Hebraud ve Fevre, 1988). Mantarların önemi

hayvanlar lignifiye yemler ile beslendiklerinde daha da artmaktadır. *N. frontalis* ve *Piromonas communis*'in lignifiye yapıları çözünebilir hale getirip hücre duvarından uzaklaştırarak bakterilerin selüloza erişebilmesini mümkün kılmaktadır (Bootten ve ark., 2011).

Çizelge 1.2. Rumende ortamından izole edilmiş ana protozoa ve mantarlar (Castillo-González ve ark., 2014).

Protozoa

Selülitik protozoa

Enoploplastron triloricastrum

Eudiplodinium maggii

D. affine

Epidinium ecaudatum

Diplodinium monacanthum

Diplodinium pentacanthum

Proteolytic protozoa

Entodinium caudatum

Eudiplodinium medium

Mantar

Selülitik mantar

Neocallimastix frontalis

P. communis

Orpinomyces joyonii

1.3. Rumende Yemlerin Sindirimi

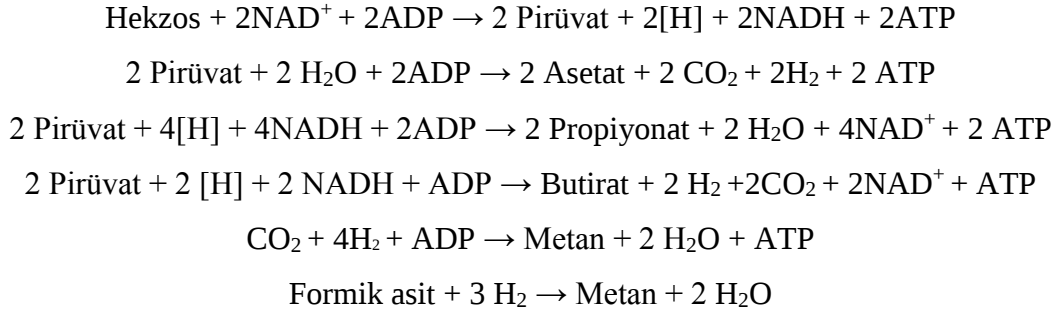
Rumen ortamında oksijen yokluğu ve sürekli olarak ortama indirgeyici ajanların salınması nedeni ile rumen ortamı zorunlu anaerobların gelişimi için idealdir ve buna bağlı olarak zorunlu anaerobların, fakültatif anaerob ve aerob mikroorganizmalara sayısal oranı 1000:1 şeklinde bildirilmiştir (Russell ve Strobel, 2005). Rumen ortamında elektron taşıyıcısı görevini üstlenecek oksijen bulunmaması nedeni ile rumen bakterileri aneorob oksidasyon gerçekleştirmektedir (Russell ve Strobel, 1993). Fermentasyon, ilk elektron vericisinin ve son elektron alıcısının organik bileşikler olduğu, enerji üretiminin sağlandığı indirgenme-yükselgenme reaksiyonlar dizisine verilen genel isimdir (Prins, 1977).

Rumen mikroorganizmaları karbonhidrat, protein ve lipid gibi organik bileşikleri asetat, karbondioksit, amonyağa fermente etmektedirler, bu fermentasyon işlemi sırasında elektron proton reaksiyonları ile ortaya çıkan indirgenmiş ürünler de rumen ortamına salınmaktadır (Van Nevel ve Demeyer, 1996). Fermentasyon işlemi sırasında üretilen enerji ATP formunda saklanmakta ve bu enerji bakteriler tarafından yaşama, mikrobiyel popülasyonun gelişmesi için kullanılmaktadır (France ve Dijkstra, 2005). Fermentasyon işlemi sırasında kayda değer seviyede ısı üretimi de gözlenmektedir (Russell ve Strobel, 1993).

Rasyonda bulunan karbonhidratlar fermentasyon işleminin en önemli substratları arasındadır ve uçucu yağ asitlerine fermente edilmeden önce yapılarını şekillendiren pentoz ya da hekzoslara yıkımlanırlar (Baldwin ve Allison, 1983). Karbonhidratlardan ortaya çıkan pentozlar transketolaz ve transaldolaz reaksiyonları ile hekzos ve triozfosfata çevrilmektedir. Rasyonda bulunan karbonhidratların büyük kısmının metabolizması, hekzosların Embden-Meyerhof yoluyla glikolize uğraması ile şekillenmekte ve son ürün olarak pürivat elde edilmektedir (Baldwin ve ark., 1963).

Asetil koenzim A (Asetil CoA), asetat ve bütirat oluşumu sırasında görev alan bir ara metabolittir (Hackmann ve Firkins, 2015).

Şekerlerin pürivata oksidasyonu esnasında, elektronlar (serbest hidrojen) hücre içi elektron taşıyıcıları olarak bilinen nikotanamid adenin dinükleotid (NAD^+) tarafından alınmaktadır ve bu yapılar indirgenerek hidrojen içeren nikotanamid adenin dinükleotid (NADH)'ye dönüşür (Immig, 1996). Şekerlerin fermentasyonunun devam ettirilebilmesi için NADH 'nin NAD^+ 'a tekrar okside edilmesi gerekmektedir (van Lingen ve ark., 2016). Rumende farklı türdeki bakteri, protozoa ve mantarların NADH 'yi tekrar okside etme stratejileri farklılık gösterebilmektedir, bazı türler NADH 'den elde ettikleri hidrojeni pütüvattan, bütirat üretmek için kullanmakta iken bazı türler pürivat ve NADH 'i propiyonat üretiminde kullanmaktadır (Immig, 1996). Rumendeki bakteri türlerinin büyük çoğunluğu asetatı hidrojen kullanımına gerek duyulmayan bir metabolik yol aracılığıyla asetil CoA yardımı ile ortama H_2 ve CO_2 salınımı gerçekleştirerek yaparlar (Miller, 1991). Rumende düşük kısmi hidrojen basıncının bulunduğu durumlarda NADH , NAD^+ ve H_2 'e tekrar okside edilmektedirler (Immig, 1996). Ortaya çıkan bu metabolik H_2 , şeker ve amino asitlerin okside edilmesi sırasında açığa çıkan diğer indirgeyici elektronlar için farklı bir uzaklaştırma mekanizması oluşturmaktadır (Wolin, 1975). Rumen ortamında bulunan moleküler hidrojen fermentasyon işlemi için geri besleme mekanizmasını uyardığından ortamdan uzaklaştırılması gereklidir. Metanojenler H_2 'i kullanarak CO_2 'i indirgemekte ve ortaya CH_4 çıkmaktadır. Bu yol ile 4 mol H_2 bir mol CH_4 üretimini sağlamaktadır (Immig, 1996). Bahsedilen bütün reaksiyonlar Şekil 1.1.'de verilmiştir (France ve Dijkstra, 2005) .



Şekil 1.1. Rumende gerçekleşen fermentasyon reaksiyonları (France ve Dijkstra, 2005).

Rumende yıkımlanabilir protein oranı yüksek rasyonlar ile beslenen hayvanlarda asetat, propiyonat ve bütiratın haricinde valerat, kaproat, izobütirat, izovalerat, 2-metilbütirat ve farklı uçucu yağ asitleri karbonhidrat metabolizmasının son ürünü olarak üretilmektedir ve bu uçucu yağ asitleri bazı rumen bakterileri için önemli büyüme faktörleridir (Cotta ve Hespell, 1986). Rasyon yapısına bağlı olarak rumende protein ve lipitlerden de uçucu yağ üretilmesi mümkündür. Lipid hidroliz ürünlerinden yalnızca gliserol ve galaktoz fermentasyona katılmaktadır ve bu şekilde uçucu yağ asiti oluşumu oldukça sınırlıdır (France ve Dijkstra, 2005). Rumende yıkımlanabilir protein içeriği yüksek rasyonlar ile beslenen hayvanların rumeninde proteinlerin hidrolizi sonucu açığa çıkan amino asitlerin izobütirik, izovalerik ve 2-metilbütirik gibi amino asitlere çevrilmeden önce deaminasyon işlemine maruz kaldıkları bilinmektedir (Cotta ve Hespell, 1986).

Üretilen uçucu yağ asitlerinin büyük bir bölüm rumenden emilip dolaşım sistemine katılmakta buradan da karaciğere giderek okside edilmektedir (Dijkstra, 1994). Bu işlem ile hayvanın enerji ihtiyacının büyük bir kısmı karşılanmış olur (Armentano, 1992). Fermentasyon işlemi ile uçucu yağ asitlerinin üretiminin yanı sıra mikroorganizmaların çoğalması başka bir ifade ile hayvan için mikrobiyel protein sağlanmaktadır. Fermentasyon sonucu açığa çıkan karbondioksit ve metan gazları hayvan tarafından değerlendirilmeyen ürünlerdir ve hayvanların bulunduğu ortama salınarak uzaklaştırılmaktadırlar, metan gazı oluşumu ruminantlar için enerjinin kaybı anlamına gelmektedir (Bhatta ve ark., 2007).

1.3.1. Rumen Uçucu Yağ Asitlerinin Üretimi

Hekzoslardan çeşitli uçucu yağ asitlerinin fermentasyon yolu ile üretimi rumen ortamının çeşitli mikroorganizmaların çoğalması için ne kadar uygun olduğuna ya da uygun olmadığına bağlılık göstermektedir. Fermentasyonun gelişim yolu mikrobiyel popülasyonun yapısına bağımlılık göstermektedir ve bu değişken de hayvanın tükettiği yemin yapısı ile ilişkilidir (Dijkstra, 1994). Fermentasyon için gerekli olan substratın fazla bulunması veya bu substratın daha kolay yıkımlanabilir yapıda olması fermentasyonu asetik asitten propiyonik asite doğru kaydırmaktadır (Chen ve ark., 2015; Lascano ve Heinrichs, 2009). Belirli koşullar altında konsantre yem oranının rasyondaki oransal artışı protozoa popülasyondaki artış ile birlikte propiyonat yerine bütirat artışı sonucunu ortaya çıkartmıştır (Williams ve Coleman, 1997).

Karbonhidrat fermentasyonunun şekillendiği hız ve fermentasyon yolu oluşan uçucu yağ asit oranları üzerinde önemli etkiye sahiptir. Rasyonda bulunan karbonhidrat alt fraksiyonlarının miktarı ile oluşan uçucu yağ asitleri arasında ilişki üzerine bir model oluşturulmuştur (Dong ve Zhao, 2014). Bu modele göre farklı karbonhidrat fraksiyonlarının fermentasyonu esnasında oluşturacağı uçucu yağ asiti miktarları farklılık göstermektedir ve konu ile ilgili yapılan modelleme çalışması sonucu elde edilen formüller Şekil 1.2.'de gösterilmektedir (Dong ve Zhao, 2014). Rumende gerçekleşen fermentasyon işlemi sırasında H_2 'ni ağırlıklı olarak üreten mikroorganizmalar asetik asit üreticileridir (Hegarty ve Gerdes, 1998). Çeşitli uçucu yağ asitlerinin oluşumu esnasında oluşan hidrojen miktarları Şekil 1.3.'de gösterilmektedir (Hegarty ve Gerdes, 1998).

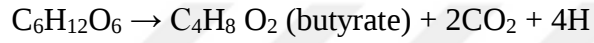
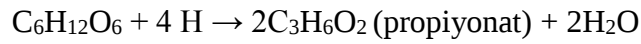
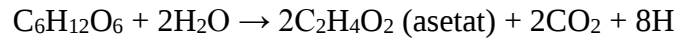
$$\text{Asetat} = (2.767 \pm 0.586)CA + (0.871 \pm CB_1) + (1.374 \pm 0.460)CB_2 + (23.1 \pm 28.2)$$

$$\text{Bütirat} = (0.806 \pm 0.261)CA + (1.931 \pm 0.243)CB_1 - (0.032 \pm 0.205)CB_2 + (29.4 \pm 12.6)$$

$$\text{Propiyonat} = (0.456 \pm 0.552)CA + (2.523 \pm 0.513)CB_1 + (1.260 \pm 0.433)CB_2 + (92.2 \pm 54.4)$$

CA: Şekerler, CB₁: Nişasta ve Pektin, CB₂: Yararlanılabilir Hücre Duvarı Unsurları, CC: Yararlanılamayan Hücre Duvarı Unsurları

Şekil 1.2. Farklı karbonhidrat fraksiyonlarının fermentasyonu sonucu oluşan uçucu yağ asitleri miktarının (mMol) modelleme yolu ile hesaplanması (Dong ve Zhao, 2014).



Şekil 1.3. Çeşitli uçucu yağ asitlerinin oluşumu esnasında üretilen hidrojen miktarları (Hegarty ve Gerdes, 1998).

1.3.2. Mikrobiyel Gelişim ve Fermentasyon

Karbonhidratların yıkımlanması sonucu açığa çıkan heksozlar bakteriler için nükleik asit ve lipid sentezinde kullanmak için oldukça ideal bir substrattır (France ve Dijkstra, 2005). Mikrobiyel proteinin önemli bir kısmı da amonyak kullanılarak sentezlenmektedir (Russell ve ark., 1992). Bahsedilen bütün sentez reaksiyonları için ATP'ye gereksinim duyulmaktadır (Hackmann ve Firkins, 2015).

Metanogenezis sayesinde ortamdan serbest hidrojen iyonları uzaklaştırılmakta ve daha fazla asetat sentezlenmesi sağlanmaktadır, bu durumun fermentasyon sırasındaki ATP verimini arttırdığı düşünülmektedir (McAllister ve ark., 1996). Ancak In-Vitro olarak metan üretiminin inhibe edilmesi yoluyla inhibisyon yöntemine bağlı olarak genel enerji dönüşüm etkinliğinin artırılabilceği ortaya koyulmuştur (Ungerfield, 2015). Ayrıca ortaya çıkan her bir mol metan için 5 g mikrobiyel hücre

üretildiği varsayılırsa, günde 200l metan üreten bir ineğin rumeninde üreyen metanojen mikroorganizmanın toplam popülasyonun yalnızca %1'ni oluşturacağı gösterilmiştir (Van Nevel ve Demeyer, 1996).

1.3.3. Rumende Metan Üretimi

Glikoz rumende ana olarak glikolizis yolu ile pirüvata dönüştürülmektedir (Russel ve Wallace, 1997). Glikolizis ve pirüvatin asetil-CoA'ya oksidatif dekarboksilasyonu bütirat ve asetat üretiminin ilk aşamalarıdır ve bahsedilen her iki metabolik yolda da hidrojen salınımı şekillenmektedir (Ungerfeld, 2015). İndirgenen co-faktörlerin fermentasyonun devamlılığı için tekrar okside edilmesi gerekmektedir. Ruminal fermentasyonda metanogenezis co-faktörlerin tekrar okside edilebilmesi için hidrojenin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (Yang ve ark., 2016).

Metan üretiminde hidrojen, karbondioksit ve format kullanılan ana substratlardır (Hungate ve ark., 1970). Metan üretiminde substratlar hidrojen ve karbondioksit olduğunda metan, karbondioksitin indirgenmesi ile elde edilirken formatın substrat olduğu durumlarda ilk etapta bu bileşik hidrojen ve karbondioksite çevrilip ondan sonra yine benzer şekilde metan üretilmektedir (Hungate, 1970). Metan üretimi esnasında üretilen her bir mol metan için dört mol hidrojen kullanılmaktadır (Yang ve ark., 2016).

1.4. Rumen Metan Üretiminin Kontrolü

1.4.1. Rasyon Kaba Yem ve Konsantre Yem Oranı

Ruminantlar nişastaca zengin yemlerle *ad libitum* beslendiklerinde metan ve Asetat : Propiyonat oranında azalma gözlenmiştir (Orskov ve ark., 1968). Artan rasyon konsantre yem oranında Asetat : Propiyonat oranında gözlenen düşüş süt inekleri ile yapılan farklı çalışmalarda da gözlenmiştir (Na ve ark., 2013; Tafaj ve ark., 2005). Gerçekleştirilen bir çalışma (Van Kessel ve Russell, 1996) konsantre yem ağırlıklı yemler ile beslenen ruminantlarda metan üretiminin azalıp, propiyonat oranının artmasının rumen pH'sına bağlı olarak şekillenebileceğini belirtmiştir. Konsantre yem ağırlıklı beslenen hayvanlardan elde edilen rumen sıvılarının *in-vitro* ortamda pH'larının yükseltilmesi ile kaba yem ağırlıklı beslenen hayvanlar ile benzer oranda metan üretilebileceği belirtilmiştir.

Hücre duvarı karbonhidratlarının fermentasyonu, çözünebilir şekerlerin ve nişastanın fermentasyonuna göre daha fazla metan oluşumuna neden olmaktadır (Johnson ve ark., 1996). Nişasta açısından zengin konsantre yem ağırlıklı ve propiyonik asit oluşumuna destek veren rasyonlar, kaba yem ağırlıklı ve asetik asit açısından zengin rasyonlara oranla daha az metan oluşumuna neden olmaktadır (Johnson ve Johnson., 1995). Yapısal karbonhidratların fermentasyonu, nişasta ve şekerlerin fermentasyonuna göre tüketilen brüt enerjinin daha büyük bir kısmının metan yolu ile kaybına neden olmaktadır (Boadi ve ark., 2004). Bu durumun ana nedeni olarak konsantre yemlerin fermentasyonunun yüksek oranda hidrojen oluşumuna neden olan asetik asit seviyesinin azalması ve propiyonik asite geçiş olarak gösterilmektedir (Hegarty ve Gerdes, 1998). Ayrıca yüksek oranda konsantre yem ile beslenen hayvanlarda rumen pH'sında düşüş gözlenmektedir ve bu durum metanojen bakteri ve protozoa gelişimini inhibe etmektedir (Hegarty, 1999).

1.4.2. İyonoforlar

İyonoforlar sığır ve kanatlı yetiştiriciliğinde farklı segmentlerde çok sık olarak kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin gelişen bakteriyel direnç nedeni ile Avrupa Birliği tarafından hayvanlarda performans iyileştirici olarak iyonoforların da kullanımı yasaklanmıştır (Yönetmelik 1831/2003/CEE, European Commission). İyonoforlar kimyasal yapı açısından farklılık göstermelerine karşı hepsi molekül yapısı boyunca çok sayıda oksijen atomu taşımaktadır ve bu oksijen atomlarının pozisyonu katyonları yakalamak için bir boşluk şekillendirmektedir (Pressman, 1976). İyonoforlar bakteri veya protozoaya yapışmaktadırlar (Chow ve ark., 1994). Bu yapışma sayesinde taşınan katyonların hücre membranında hareketi kolaylaşır, monovalen katyonlar (monensin, laidlomisin propiyonat, salinomisin) bir proton karşılığında ya da divalen katyonlar (lasalosid) iki proton karşılığında hücre içine taşınır (Pressman, 1976). İyonoforlar ile rumen fermentasyonunun manipülasyonu üzerine gerçekleştirilen birçok çalışmada monensin ya da lasalosit kullanılmıştır (Van Nevel ve Demeyer, 1996). Monensin ile gerçekleştirilen çalışmaların bir çoğunda propiyonatın oransal olarak arttığı ortaya konulmuş ve bu etkinin rasyon konsantre yem oranı ile doğru bir orantı izlediği bildirilmiştir (Van Maanen ve ark., 1978; Rogers ve Davis, 1982; Prange ve ark., 1978). Propiyonatın oransal anlamda artışının haricinde monensin kullanımı ile tüketilen her bir gram yem kuru maddesi için toplam uçucu yağ asit yoğunluğunda da artış olduğu ortaya konulmaktadır (Rogers ve Davis, 1982). İyonoforlar ile gerçekleştirilen çalışmalarda yem etkinliğinin %5-6 civarında arttırılabileceği ve fermentasyonun propiyonat üretimini arttırıp, metan üretimini azaltacak şekilde yönlendirildiği bildirilmektedir (Johnson ve ark., 1996). İyonoforların metan üretimini baskılayıcı etkisinin ortamdaki hidrojen ve format yoğunluğunu baskılayarak şekillendirdiği düşünülmektedir. Metan üretimi için kullanılan hidrojen ve formatı üreten bakteriler iyonoforlardan etkilenmektedirler ancak metan üreten mikroorganizmalar için aynı şey söylenememektedir (Chen ve Wolin, 1979). Bu durumun bir kanıtı olarak monensin varlığında fermentasyon ortamına hidrojen ilavesi ile metan üretiminin artması gösterilmektedir (Van Nevel ve Demeyer, 1996).

İyonoforlar Gram-pozitif bakteriler ile etkileşime girerken bu bileşiklerin Gram-negatif bakteriler üzerine olan etkisi oldukça düşüktür (Van Nevel ve Demeyer, 1996).

İyonoforlar ile ruminantlarda besin maddelerinin kullanımı üzerine yapılan 20 farklı çalışma özetlenmiştir, bu çalışmalardan 3 tanesi lasalosit ve 17 tanesi de monensin ile gerçekleştirilmiştir (Spears, 1990). Bu çalışmanın sonunda iyonoforlar ile elde edilen enerji sindirilebilirliğindeki artış ortalama %2 olarak ortaya konulmuştur. Monensin ile gerçekleştirilen *in-vivo* çalışmalarda bu bileşiğin metan üretimini önemli miktarda baskılayabileceği ortaya konulmuştur (Van Nevel ve Demeyer, 1996).

Süt ineklerinin beslenmesinde yem katkısı olarak monensin kullanımının rumen organik madde, ADF ve nişasta sindirimini düşürdüğü ancak toplam sindirim kanalı sindirilebilirliğinde bu etkinin gözlenmediği bildirilmektedir (Ali Haimoud ve ark., 1995). Bu sonuç iyonofor kullanımının besin maddelerinin sindirim kanalında yıkımlandığı bölgeyi değiştirebileceğini düşündürmektedir. Yapısal karbonhidratların sindirimini iyonofor kullanımından etkilenmediği bildirilmektedir (Allen ve Harrison, 1979). Yapısal karbonhidrat fraksiyonunun sindiriminde görevli *Ruminococcus* alt türlerinin iyonoforlardan etkilense de bunların yerini iyonoforlara dirençli bir başka lif sindiren bakteri olan *F. succinogenes*'in doldurulduğu bildirilmektedir.

Monensin kullanımında abomazuma ulaşan toplam esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitlerin daha fazla olduğu ortaya konulmaktadır (Faulkner ve ark., 1985). Ancak ürenin ana azot kaynağı olduğu durumlarda aynı durumdan bahsedilememektedir (Poos ve ark., 1979). Monensin desteği ile beslenen sağmal ineklerde rumen amonyak miktarının ve ruminal protein yıkımlanmasının daha düşük olduğu ortaya konulmaktadır (Ali Haimoud ve ark., 1995).

İyonofor grubu antibiyotiklere rumen mikroorganizmaları tarafından direnç gelişebileceği de araştırmacılar tarafından ortaya atılmıştır. Bu bağlamda bazı uzun süreli alışamalarda iki haftadan sonra iyonoforların etkisinin azalabileceği bildirilirken (Rumpler ve ark., 1986), bazı alışamalar ise bu etkide herhangi bir kayıp olmayacağını ortaya koymaktadır (Rogers ve ark., 1982).

1.4.3. Organik ve İnorganik Alternatif Hidrojen Bağlayıcıları

Çeşitli organik asitlerin (aspartat, fumarat, malat) hidrojen için bir elektron kabul edicisi olduğu ortaya sürülmüştür (Martin, 1998; Lopez ve ark., 1999a). Bu asitler *in-vitro* rumen kültürlerine eklendiğinde CH₄ üretimini azaltıp ortam propiyonat yoğunluğunu arttırdığı ortaya atılmıştır (Callaway ve Martin, 1996; Asanuma ve ark., 1999; Carro ve Ranilla, 2003). Bu asitlerin monensin ile kullanımında da bir sinerjistik etki gözlemlendiği ortaya çıkmıştır (Callaway ve Martin, 1996).

Sülfat ya da nitratın indirgenme işlemi termodinamik olarak CO₂ 'in CH₄'a indirgenme işleminden daha kolay gerçekleşmektedir (Hegarty, 1999; Weimer, 1998). Ancak sülfat ya da nitratın indirgenerek metan üretiminin azaltılması işlemini pratikte uygulamak çok mümkün gözükmemektedir. Çünkü bu bileşiklerin indirgenmesi sonucu ortaya çıkan ürünler hayvanlar için toksiktir (Weimer, 1998).

1.4.4. Mikrobiyel Yem Katkıları

Mikrobiyel yem katkılarının ruminantlarda kullanımı üzerinde oldukça çok çalışılmış alanlardan biridir. Yetişkin ruminantlarda mikrobiyel katkıları içerisinde genel olarak mantar ve maya kültürlerinin etkin olduğu bildirilmektedir (Newbold, 2007).

Aspergillus oryzae'nın yem katkısı olarak kullanılması ile gerçekleştirilen bir çalışmada (Fondevila ve ark., 1990), kaba yemlerin sindirilebilirliğinin arttığı ve rumende üretilen mikrobiyel protein miktarında artış gözlemlendiği bildirilmiştir. Araştırmacı bu sonucun artan bakteri aktivitesi ve sayısı ile ilişkili olduğu sonucuna varmıştır. *A. oryzae* kuru madde tüketiminde hiçbir değişikliğin görülmeyişi bir çalışmada da kuru madde sindirilebilirliğini arttırmıştır (Gomez-Alarcon et al., 1988). Bu bulguların aksine *A. oryzae* desteği ile beslenen inek ve düvelerde sindirilebilirlik açısından bir farklılık gözlenmeyen çalışmalar da mevcuttur (Arambel ve ark., 1990; Oellermann ve ark., 1990; Sievert ve ark., 1993).

Saccharomyces cerevisiae'nin bir yem katkısı olarak kullanılması sonucu rumen NH_3 konsantrasyonunda düşüş ve besin maddeleri sindirilebilirliğinde artış gözlenebileceği bildirilmiştir (Putnam ve ark., 1997). Harrison ve ark. (1988) maya desteği ile beslenen ineklerin rumen amonyak yoğunluğunun kontrol grubuna göre daha az varyasyon gösterdiğini bildirmişlerdir.

In-vitro gerçekleştirilen iki çalışmada maya kültürü kullanımı ile metan üretim miktarında artış gözlenmiştir (Martin ve ark., 1989; Martin ve Nisbet, 1990). Bu bulguya benzer şekilde bu çalışmalardan birinde ortam hidrojen yoğunluğunda artış bildirilmiştir (Martin ve Nisbet, 1990). *In-vitro* fermentasyon ortamına *A. oryzae* eklenmesi ile üreyen gaz içerisindeki metan oranında düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir (Frumholtz ve ark., 1989).

Genel olarak probiyotiklerin ruminal metanogenezis üzerine olan etkilerinin derlendiği bir çalışmada bu katkıların metanogenezis üzerine olan etkilerinin halen ikna edici seviyede olmadığını belirtmiştir (Martin ve Nisbet, 1992). *A. oryzae* kullanımı ile ruminal protozoa miktarında düşüş şekillenmesine bağlı olarak metan salınımında dolaylı bir düşüş gözlenebileceği ancak bu etkinin kısa sürdüğü başka bir araştırmada bildirilmiştir (Mutsvangwa ve ark., 1992).

1.4.5. Asetogenezisin Rumende Arttırılması

Kaba yemlerin sindirimi sırasında rumende mikroorganizmalar tarafından üretilen hidrojenin yönetimi ruminantlar tarafından metan salınımının kontrolünde anahtar role sahiptir (Joblin, 1999).

Metan üretimine benzer bir şekilde bir mol asetik asit üretimi için 4 mol hidrojen tüketilmektedir (Van Nevel ve Demeyer, 1996). Melas ağırlıklı yem içeren koyun rumeninden ilk olarak izole edilen asetojen mikroorganizma *Eubacterium limosum* dur (Genthner ve ark., 1981) ve bundan dokuz yıl sonra farklı bir asetojen olan *Acetitomaculum ruminitis* sığır rumeninden izole edilmiştir (Grening ve Leedle, 1989). Bundan sonra gerçekleştirilen çalışmalarda ise ciddi miktarda asetojen bakteri varlığı sığır, koyun, bizon ve geyik rumenlerinde tespit edilmiştir (Joblin, 1999).

Asetat üretimi için asetojen bakterilerin yüksek ortam H_2 yoğunluğuna ihtiyaç duymaları nedeni ile metanojenlerin direkt olarak asetojen bakteriler ile rekabet etmedikleri ileri sürülmüştür (Nollet ve ark., 1998). Bu nedenle asetojen bakterilerden daha iyi yararlanılabilmesi adına metan üreten mikroorganizmaların ortamdaki

uzaklaştırılması ile rumen hidrojen yoğunluğunun artırılması gerektiği savunulmuştur (Hegarty, 1999; Lopez ve ark., 1999b).

1.5. Rumen Azot Metabolizması ve Azot Değerlendirme Etkinliği

Günümüzde çoğu besi ve süt üreten işletme entansif tipte üretim gerçekleştirmektedir. Bu bağlamda yüksek verim elde edilebilmesi adına protein yoğunluğu oldukça yüksek yemler de hayvanların beslenmesi için kullanılabilir. Yemde bulunan besin maddelerinin eksikliği verim kayıplarına neden olabileceği gibi gereğinden fazla besin maddesinin hayvanlara verilmesi de birim ürünün üretim maliyetini arttırabilmektedir (Hristov ve Jouany, 2005). Bu nedenle hayvanlara yem yolu ile sağlanan besin maddelerinin değerlendirme etkinliğinin artırılması oldukça önemlidir. Üretim etkinliğinin ve verimin artırılması ile birim ürün başına çevreye atılan azot miktarının düşürülebileceği bildirilmiştir (Chandler, 1996).

1.5.1. Proteinlerin Rumende Yıkımlanması

Yem maddelerinin ihtiva ettiği azot gerçek protein yapısında bulunanlar ve protein yapısında olmayanlar olmak üzere iki şekilde sınıflandırılmaktadır. Gerçek protein kendi içerisinde rumende yıkımlanabilen ve rumende yıkımlanamayan olmak üzere iki ayrı kategoriye ayrılmaktadır (NRC, 2001). Rumende yıkımlanmayan protein rumen mikroorganizmaları tarafından salgılanan enzimler ile yıkımlanamazlar ve bu nedenle rumenden oldukları gibi sindirim kanalının ileri kısımlarına geçerler (Chalupa, 1975). Ancak rumende yıkımlanan protein rumen mikroorganizmaları

tarafından peptidlere, amino asitlere ve amonyağa yıkımlanabilmektedir (Eschenlauer ve ark., 2002). Cornell net karbonhidrat ve protein sistemi (CNCPS) yem proteinlerini yem maddesinin rumenden geçiş hızı ve proteinin yıkımlanma hızına göre daha ileri fraksiyonlara ayırmıştır (Sniffen ve ark., 1992). CNCPS oluşturduğu sistem ile yemlerde bulunan proteinlerin rumen mikroorganizmaları tarafından ne oranda kullanılabileceğini hesaplamayı amaçlamaktadır. Gerçek proteinler rumende mikroorganizmalar tarafından peptid, amino asitler ve amonyağa kadar yıkımlanmaktadır (Bach ve ark., 2005).

Proteinlerin rumende yıkımlanma işlemleri çok adımlı bir işlemdir. Bu işlemin ilk adımı yem partiküllerinde mikroorganizmaların kolonize olması ile başlar. İkinci adımda ise mikroorganizmalar yem partiküllerine yapışır ve mikrobiyel enzimlerin salınımı ile açığa çıkan ürünleri yem partiküllerine yapışmış bakteriler yakalar (Mc Allister ve ark., 1994).

Protein sindirimini gerçekleştirebilecek enzimleri salgılayan bakteriler ekstraselüler proteaz, deaminaz, peptidaz gibi enzimleri hücre dışına salgılayarak proteinleri sırası ile peptid, amino asit ve amonyağa çevirmektedirler (Prins ve ark., 1983; Wallace ve ark., 1997). Bu bileşikler daha sonra ATP bağımlı taşıma kanalları ile bakteri hücrelerinin içine alınmaktadır (Leng ve Nolan, 1984). Eğer karbonhidrat sindirimine yetecek seviyede enerji mevcut ise protein sindiriminden elde edilip hücre içerisine alınan bileşikler mikrobiyel amino asit ve proteine dönüştürülmektedirler (Bach ve ark., 2005). Yüksek amonyak yoğunluğunda bakteriler tarafından azotun kullanımı glutamat dehidrojenaz enziminin görev aldığı bir yoldan gerçekleşir (Leng ve Nolan, 1984). Ancak ortamdaki amonyak yoğunluğu düşük ise, amonyak glutamin sentetaz ve glutamat sentetaz enzimlerinin kullanıldığı farklı bir yol ile kullanılmaktadır (Leng ve Nolan, 1984). Bahsedilen bu reaksiyonlar glutamatın, glutamine dönüşebilmesi için bu bileşiğe bir amid grubu eklenmesi ve bunu takiben glutaminde bulunan amid azotun 2-okzoglutarata ATP kullanımı ile transfer olmasını içermektedir (Leng ve Nolan, 1984). Bazı rumen bakterileri amonyak azotunu birincil

azot kaynağı olarak tercih etmektedirler (Salter ve ark.,1979). Ancak bazı mikroorganizmaların gelişiminin amino asit ve peptidlerin varlığında daha iyi şekillendiği bildirilmiştir (Russel ve Sniffen, 1984; Griswold ve ark., 1996).

Bahsedilenlerin tersine eğer ortamda yeterli enerji kaynağı yoksa protein sindiriminden elde edilen bileşikler mikrobiyel proteine dönüştürülemez (Bach ve ark., 2005). Rumen mikroorganizmalarının protein üretme sürecinin verimliliği hep tartışılmıştır. Çeşitli teoriler rumen mikroorganizmalarının ATP'nin hepsinin hücresel protein üretimi yerine, karbonhidrat depolama ve ısı yayan enerji dönüşüm reaksiyonları gibi yaşamsal fonksiyonlar için kullandıklarını ileri sürmektedir (Hackmann ve Firkins, 2015). Karışık rumen mikroorganizmalarının karbonhidrat depolaması ve ısı şeklinde enerji yayması ile ilgili detaylı bilgi son dönemde elde edilebilmiştir ve bu kayıpların protein etkinliğine olan etkilerini değerlendirmek mümkün olmuştur (Hackmann ve ark., 2013; Denton ve ark., 2015). Ayrıca rumen mikroorganizmalarının önemli bir özelliği proteinleri amonyağa yıkımlamalarıdır ve ürettikleri amonyak yoğunluğunun genellikle rumen ortamında bakterilerin ihtiyacının üstünde olduğu bildirilmektedir (Tan ve Murphy, 2004). Rumende bulunan fazla amonyak karaciğere taşınarak daha az toksik bir form olan üreye çevrilmektedir (McDonald, 1958). Proteinlerin rumende yıkımlanması Şekil 1.4.'de özetlenmiştir (Bach ve ark., 2005).

1.5.2. Üre Döngüsü

Amonyak dokularda birikirse toksik olabilmektedir. Farklı türler amonyağın tehlikeli sınıra erişmesini önlemek için farklı mekanizmalar kullanmaktadırlar. Kanatlılar amonyağı ürik asite çevirmektedirler, ürik asit yumurta kabuğunda katı şekilde dışarı atılabildiği gibi idrar ile de atılabilmektedir (Wright, 1995; Stewart ve Smith, 2005). Memeliler ise üre döngüsü olarak isimlendirilen ve karaciğerde gerçekleştirilen bir mekanizmaya sahiptirler (Singer, 2003). Bu mekanizma gereği amonyak karaciğere portal dolaşım yolu ile taşınır ve burada daha düşük toksisiteye sahip olan üreye çevrilir (Stewart ve Smith, 2005).

Üre döngüsünün ilk adımı ornitin ve sitrülün şekillenmesidir. Sitrülün ve aspartat birleşerek arjininosüksinatı oluştururlar ve bu bileşik fumarat ve arjinine ayrışır. Arjinin hidroliz ile ayrıştırılır ve üre ile ornitin ortaya çıkar (Jackson ve ark., 1986).

Üre oluşumu fazla amonyağın detoksifiye edilebilmesi için iyi bir yoldur ancak bu işlem için enerji sarfedilmektedir (McBride ve Kelly., 1990). Amonyagın, üreye çevrilebilmesi için CO₂ ve aspartatın haricinde ATP'ye de ihtiyaç duyulmaktadır (Rodwell, 2003). Ruminantlarda azotun üre formunda geri kazanımı rumende ürenin bakteri üreazı ile amonyak azotuna çevrilebilmesi ve bu azot kaynağının tekrar bakteriyel protein üretiminde kullanılabilmesi nedeni ile istenilen bir durumdur (Marini ve Van Amburgh, 2003).

1.5.3. Üre - Azot Geri Kazanımı

Karaciğerde sentezlenen üre ya böbreklere taşınarak üre olarak atılmaktadır ya da sindirim sistemine geri döndürülmektedir bu işlem ‘üre döngüsü’ olarak isimlendirilmektedir (Kristensen, 2008; Lapierre ve Lobley, 2001; Stewart ve Smith, 2005; Reynolds ve Kristensen, 2008). Toplam karaciğer üre azotu üretimi genellikle tüketilen sindirilebilir azot miktarına göre yüksek seviyede azotu geri çevirmektedir bu nedenle eğer sindirim sistemine geri azot dönüşü yoksa hayvan negatif azot dengesinde olabilir (Lapierre ve Lobley, 2001). Üre azotu geri kazanımı ruminantlarda olduğu gibi tek midelilerde de gözlenebilen bir olgudur. Ancak ruminantlarda vücutta üretilen üre azotunun yaklaşık olarak % 40-80’i geri dönüşüme girebilmekteyken bu oran tek midelilerde % 13-39 seviyelerinde kalmaktadır (Huntington, 1989; Russell ve ark., 2000). Ruminantlarda üre azotunun sindirim sistemine geri dönüşümü kan yolu ile de olabilmektedir (Stewart ve ark., 2005). Ancak geri dönen üre azotunun % 23-69’nun tükürük kanalı yolu ile sindirim kanalına geri döndüğü bildirilmiştir (Huntington, 1989). Üre geri dönüşümü düşük seviyede protein içeren yemler ile beslenen ruminantlarda rumene azot kaynağı sağlanması açısından büyük avantaja sahiptir (Reynolds ve Kristensen, 2008).

1.5.4. Ruminantlarda Azot Değerlendirilme Etkinliği

Yüksek verimli süt ineklerinde rasyon ile alınan azotun yaklaşık olarak % 70’nin idrar veya dışkı ile atıldığı bildirilmiştir (Castillo ve ark., 2000; Ryan ve ark., 2011). Yemler ile vücuda alınan azotun yalnızca %30’dan az bir kısmının vücutta tutulmasının sağmal inek beslemesi yapan çiftçilere ekonomik yükü oldukça yüksektir. Tüketilen azotun büyük kısmının kullanılmadan çevreye atılması da doğa için zararlı etkiye sahiptir (VandeHaar ve St-Pierre, 2006). Azot değerlendirme etkinliğinin düşük olması emilimi gerçekleşen amino asitlerin karaciğer ve böbreklerde glikoneogenezise tabi tutulması, dokulardaki protein anabolizma ve

katabolizması için gerekli olan amino asit dönüşümleri gibi nedenler ile ilişkili olabilmektedir (Bergman ve Heitmann, 1978). Ancak rasyonda bulunan proteinlerin ayrıştırmaya tabi tutulmaksızın rumende amonyağa kadar yıkımlanması, ortaya çıkan bu amonyağın da mikrobiyel protein üretiminde kullanılmaması ruminantlardaki N israfının en büyük nedeni olarak gösterilmektedir (Tamminga, 1992).

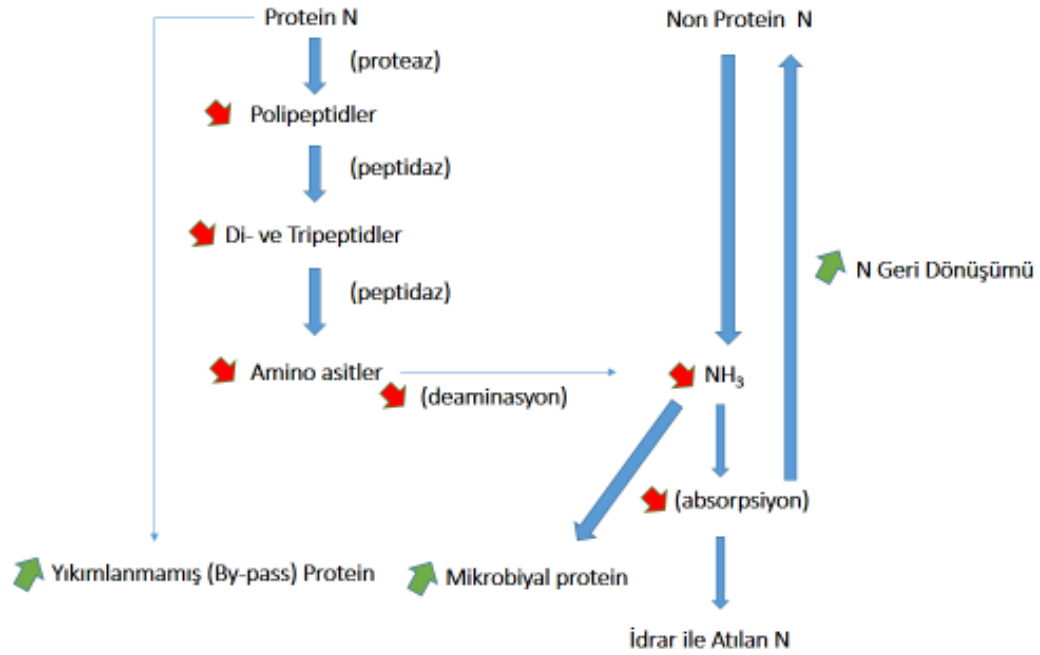
Rasyonda bulunan azotun haricinde protozoonların bakterileri sindirmesine bağlı olarakta rumende üretilmiş mikrobiyel proteinin % 50'ye kadarının amonyak azotuna yıkımlandığı bildirilmiştir (Leng ve Nolan, 1984).

Rumen amonyak azotu yoğunluğu farklı seviyelerde ham protein ve toplam besin maddesi içeren rasyonlar ile beslenen ineklerde 0,8 ile 56 mg/dl aralığında gözlenmiştir (Satter ve Roffler, 1974). Rumen amonyak azotunun bir kısmı rumen içeriği ile birlikte omazuma geçse de rumenden amonyak uzaklaşmasının ana yolları rumen duvarından emilim ve mikrobiyel protein yapısına katılımdır (Tan ve Murphy, 2004). Rumen duvarından amonyak azotunun emilim hızı rumendeki amonyak azotu yoğunluğuna bir başka deyişle ruminal mikroorganizmalar tarafından tüketilen amonyak azotu seviyesine bağlıdır.

1.5.5. Rumen Azot Metabolizmasının Manipülasyonu

Rumendeki azotun kullanım etkinliği rasyon azot yoğunluğu, yıkımlanabilirliği, mikrobiyel varlık ve bunların arasındaki etkileşim bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (Firkins ve Reynolds, 2005). Rumen protein değerlendirme etkinliğinin arttırılabilmesi için manipüle edilmek istenen mekanizmalar Şekil 1.5.'de verilmiştir (Jouany ve Morgavi, 2007).

Rumen azot metabolizmasının manipüle edilmesinde genellikle hedeflenen yemler ile tüketilen proteinlerin yıkılmasının sınırlanarak rumenden by-pass edilen protein miktarının artırılması ve protein yapısındaki olmayan azot kaynaklarından mümkün olduğunca çok mikrobiyel protein üretiminin sağlanmasıdır.



Şekil 1.5. Rumen protein değerlendirme etkinliğinin artırılabilmesi için manipüle edilmek istenen reaksiyonlar (Jouany ve Morgavi, 2007).

Yem maddelerinin farklı işlemlere (sıcaklık, basınç vb.) tabi tutulması da bu yemlerin içerisinde bulunan proteinin sindirim kanalında yıkımlandığı bölgeyi değiştirmekte ve böylelikle bu işlemler belli koşullarda protein değerlendirme etkinliğinin artırılması açısından olumlu sonuçlar ortaya çıkarmaktadır (Yu ve ark., 2002). Yem maddelerine sıcaklık ve basınç gibi fiziksel uygulamalar ile protein yıkımlanabilirlik özelliklerinin değiştirilmesi bilinen en eski metodlardan biridir.

Rumen azot kullanım etkinliğinin arttırılabilmesi adına çok çeşitli yöntemler ve farklı yem katkı maddesi üzerine de çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda iyonofor grubu antibiyotiklerin rumende gerçekleşen protein yıkımlanmasını yavaşlatabileceği bildirilmiştir (Ives ve ark., 2002). İçerisinde tannin bulunan yem maddelerinin taninin bir etkisi olarak rumendeki proteolitik aktiviteyi düşürebileceği gözlenmiştir (Makkar, 2003). *Yucca shidigera* ekstraktının da rumen amonyak ve üre yoğunluğunu düşürebileceği bildirilmektedir (Wallace ve ark., 1994). Rumen protozoon varlığının kaldırılması yolu ile de rumen protein değerlendirme etkinliğinin arttırılabileceği bildirilmiştir (Dintaran ve ark., 2000; Hristov ve ark., 2003). Esansiyel yağların rumen azot etkinliği üzerine etkilerini değerlendiren çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu konu bir diğer başlık altında ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir.

1.6. Bitkisel Esansiyel Yağlar

Ruminantlar ile rumende bulunan bakteriler arasındaki simbiyotik ilişki hayvanların gösterdiği performans açısından oldukça önemlidir. Ancak bu simbiyotik ilişkide enerji ve protein dönüşüm etkinliğindeki düşüşler oldukça önemli seviyelere ulaşabilmektedir (Van Nevel ve Demeyer, 1988). Gerçekleştirilen çalışmalarda iyonofor grubu antibiyotiklerin bahsedilen dönüşüm etkinliklerinin iyileştirilmesinde oldukça etkin olabileceği bildirilmektedir (Van Nevel ve Demeyer, 1988). Ancak antibiyotiklerin gelişen bakteriyel direnç nedeni ile Avrupa Birliği tarafından hayvanlarda performans iyileştirici olarak kullanılmasının yasaklanması ile bu açığı doldurabilecek yeni arayışlara gidilmiştir (Yönetmelik 1831/2003/CEE, European Commission). Bitkilerden elde edilen esansiyel yağlar da hayvanlarda performansı arttırılabileceği düşünülen ve üzerine çalışılan bileşiklerden birisidir (Calsamiglia ve ark., 2006).

Bitkiler ikincil metabolizma yolu ile gelişimleri üzerine etkisi tespit edilememiş çok fazla sayıda organik bileşik üretmektedirler (Balandrin ve Klocke, 1985). Uzun bir süre bu bileşikler bitki metabolizmasının kullanılmayan yan ürünleri olarak değerlendirilmiş olsa da ilerleyen dönemlerde bu bileşiklerin bitkinin çevresi ile iletişim kurmak için kullandığı kimyasallar oldukları bunun yanında antibakteriyel ve antifungal etkileri bildirilmiştir (Gershenzon ve Croteau, 1991). Bitki ikincil metabolitlerini genel olarak saponinler, tanninler ve esansiyel yağlar olmak üzere üç gruba ayrılabilir (Calsamiglia ve ark., 2007).

Esansiyel yağlar bitkiler tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir ve uçucu olmaları nedeniyle bitkilerden buhar distilasyon yöntemi ile elde edilebilmektedirler (Calsamiglia ve ark., 2007). Esansiyel yağlar uçucu ve aromatik yapıdadırlar (Burt, 2004). Yapılan çalışmalarda esansiyel yağların antimikrobiyal ve fungisidal etkileri bildirilmiştir (Kalemba ve Kunicka, 2003; Burt, 2004). Birçok bitkisel esansiyel yağın antimikrobiyel etkisinin iyonofor antibiyotiklere benzediği ve Gram pozitif bakterilere seçici inhibisyon gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Busquet ve ark., 2006; Calsamiglia ve ark., 2007).

1.6.1. Bitkisel Esansiyel Yağların Sınıflandırılması

Esansiyel yağlar yapılarında 20-60 farklı bileşiği farklı miktarlarda içerebilen oldukça kompleks doğal karışımlardır ve bu nedenle yapılarında yoğun konsantrasyonda bulunan bileşiğe göre değerlendirilmektedirler (Bakkali ve ark., 2008). Örneğin *Origanum compactum*'un esansiyel yağının içerisinde %30 karvakrol ve %27 timol bulunmakta iken *Cinnamomum camphora* esansiyel yağı %50 oranında 1,8-cineole içermektedir (Bakkali ve ark., 2008). Esansiyel yağların biyolojik özelliğini belirleyen de genellikle bu fazla miktarda bulunan bileşikleridir. Esansiyel

yağlarda en önemli aktif bileşikler iki kimyasal grubu içermektedirler (Betts, 2001; Bowles, 2003; Croteau ve ark., 2000). Bu gruplar terpenoidler ve fenilpropanoidlerdir (Calsamiglia ve ark., 2007). Terpenoidler sayısal olarak daha fazladır ve daha çok varyete içermektedirler, yaklaşık olarak 15 000 farklı bileşik literatüre bu grup altında tanımlanmıştır (Gershenzon ve Croteau, 1991). Terpenoidler beş karbon içeren ve izopiren (C_5H_8) olarak isimlendirilen temel bir yapıdan şekillenmektedirler ve iskeletlerinde bulunan bu temel yapının sayısına göre sınıflandırılmaktadırlar (Calsamiglia ve ark., 2007). Terpenoidler içerisinde en önemli esansiyel yağ bileşikler monoterpenoid ve seskiterpenoid ailelerine aittir (Gershenzon ve Croteau, 1991).

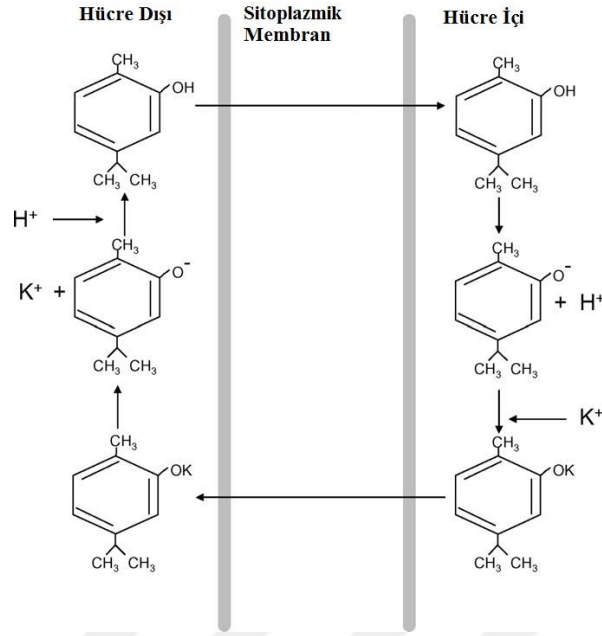
Fenilpropanoidler çok sık rastlanan esansiyel yağ bileşikleridir ancak bazı bitkilerde önemli seviyelerde bulunabilmektedirler. Fenilpropanoidler genel olarak aromatik bir amino asit olan fenilalaninden sentezlenmektedir (Sangwan ve ark., 2011).

1.6.2. Esansiyel Yağların Etki Mekanizmaları ve Biyolojik Özellikleri

Bazı bitkilerin antiseptik özelliği çok eski dönemlerde fark edilmiştir. Çinliler bitkileri tıbbi terapilerde 5 000 yıl önce kullanmaya başlamışlardır. Mısırlılar mumyaların korunması işleminde bazı bitkileri M.Ö. 1550 yılında kullanmışlardır (Davidson ve Naidu, 2000). Ancak bitkilerin antimikrobiyel etkisi bilimsel olarak 20. Yüzyılın başlarında bildirilmiştir (Hoffmann ve Evans, 1911). Bu dönem sonrası birçok esansiyel yağın antimikrobiyel etkisi üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Burt, 2004).

Terpenoidler ve fenilpropanoidler bakteriler üzerine olan etkilerini bakteri hücre membranı ile etkileşime girerek gerçekleştirdikleri bildirilmiştir (Davidson ve Naidu,

2000; Dorman ve Deans, 2000; Griffin ve ark., 1999). Hücre membranı ile olan etkileşimin siklik hidrokarbonların hidrofobik başka bir deyişle lipofilik yapıda olmaları ve bakteri hücre membranının lipid yapıdaki iki katmanlı membranında birikmeleri ile gerçekleşmektedir (Sikkema ve ark., 1994; Ultee ve ark., 1999). Bahsedilen bileşiklerin hücre membranında birikmesi ile hücre membranının akışkanlığının arttığı ve membranda genişlemeler şekillendiği bildirilmiştir (Griffin ve ark., 1999). Bakterilerde membranda meydana gelen hasar iyon kaybı ile membran potansiyelinin düşmesi, proton pompasının çökmesi ve bakteri ATP havuzunun tükenmesi ile ilişkilendirilmektedir (Helander ve ark., 1998; Sikkema ve ark., 1994; Turina ve ark., 2006; Ultee ve ark., 1999). Hücre duvarı ya da hücre zarına verilen hasar hücre içi makromoleküllerin dışarı sızması ve lizise neden olabilmektedir (Cox ve ark., 2000; Lambert ve ark., 2001; Oussalah ve ark., 2006). Çoğu durumda bakteri iyon pompaları yardımı ile esansiyel yağların bahsedilen etkisi ile mücadele ederek canlı kalabilmektedir ancak çok büyük miktardaki enerji kaynağı bu işe harcanmaktadır ve bakteri gelişimi yavaşlamaktadır (Cox ve ark., 2001; Griffin ve ark., 1999; Ultee ve ark., 1999). Rumen için bu durum düşünüldüğünde belirli bakterilerin bu yol ile ortamdaki miktarlarının baskılanması ve fermentasyon yapısında değişiklikler gözlenmesi mümkün olabilmektedir. Ultee ve ark. (2002) farklı bir etki mekanizması daha olduğunu bildirmişlerdir, bu mekanizmaya göre fenolik bileşiklerin hidroksil gruplarının membranlar arası katyon ve proton taşıdığı ve bu özellikleri ile de iyonofor grubu antibiyotiklere benzedikleri bildirilmiştir. Bu teoriye göre çözünmemiş haldeki karvakrol sitoplazmik membrandan sitoplazmaya geçerek çözünür ve sitoplazmada protonlarını açığa çıkarır. Karvakrol stoplazmadan bir potasyum iyonu alarak ekstraselüler ortama çıkar. Bu mekanizma şekil 1.6.'da şematize edilmiştir (Ultee ve ark., 2002).



Şekil 1.6. Karvakrolün olası etki mekanizması (Ultee ve ark., 2002).

Esansiyel yağların hücre membranı üzerine bahsedilen etkilerinin bu bileşiklerin lipofilik yapıda olmaları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu bileşiklerin lipofilik yapıda olan hücre membranı ile direkt olarak temas edebilecekleri gram-pozitif bakteriler üzerinde daha etkili olacağı düşünülmektedir (Chao ve Young, 2000; Cimanga ve ark., 2002; Smith-Palmer ve ark., 1998). Tıpkı monensinde olduğu gibi çoğu esansiyel yağ bileşiği de lipofiliktir ve gram-negatif bakterilerin hücre zarı etrafında bulunan hidrofilik tabakaya penetre olamazlar (Cox ve ark., 2001; Cimanga ve ark., 2002).

Esansiyel yağların antimikrobiyel etki mekanizmasının ana unsurunun hücre membranı üzerinden gerçekleştiği bilinmektedir. Ancak bunun dışındaki etki mekanizmalarının varlığı da bildirilmektedir (Gustafson ve Bowen, 1997). Elektron mikroskobu altında gerçekleştirilen çalışmalarda esansiyel yağların sadece hücre dışı membranına değil aynı zamanda sitoplazma ve çekirdek gibi hücre içerisindeki farklı bölgelere de etki ettikleri gözlenmiştir (Santoro ve ark., 2007; Soylu ve ark., 2006).

1.6.3. Esansiyel Yağların Rumen Fermentasyonu Üzerine Etkileri

Esansiyel yağların antimikrobiyel etkisini gösteren çok fazla sayıdaki çalışma ruminant besleme üzerine çalışan birçok araştırmacının da ilgisini çekmiştir ve ruminal fermentasyon üzerine esansiyel yağların etkisini değerlendiren birçok çalışma ortaya çıkmıştır. Esansiyel yağların ruminal mikrobiyel fermentasyon ve gaz üretimine olan etkilerini ilk defa Oh ve ark. (1967, 1968) ile Nagy ve Tengerdy (1968) *in-vitro* olarak incelemiştir. Nagy ve Tengerdy (1968) *in-vitro* ortamda *Artemesia tridentata* bitkisinden elde edilen ekstraktın ruminal bakteriyi belirgin şekilde inhibe ettiğini bildirmiştir.

1.6.3.1. Esansiyel Yağların Protein Metabolizmasına Olan Etkileri

Esansiyel yağların rumen azot metabolizması üzerine olan etkilerini belirleyebilmek için çok sayıda çalışma gerçekleştirildi. Borchers (1965) kazein içeren rumen sıvısına timol ekleyerek amino asit birikimi olduğunu ve amonyak azotu konsantrasyonunun düştüğünü belirtmiştir. Çalışmacı bu durumun ortama timol eklenmesinin rumen bakterilerinin amino asit deaminasyonunu azaltmasına bağlamıştır. Timolün amino asitlerin, amonyağa deamine olmasını bloke ettiğini başka araştırmacılar da bildirmiştir (Broderick ve Balthrop, 1979). Daha sonraki dönemde gerçekleştirilen bir çalışma (McIntosh ve ark., 2003) ise ticari bir esansiyel yağ karışımının *in-vitro* rumen fermentasyon ortamına eklenmesinin amino asit deaminasyonunu % 9 seviyesinde azalttığı bildirilmiştir.

Hiper deaminasyon bakterilerinin sayısı rumende oldukça az olmasına rağmen oldukça yüksek deaminasyon aktivitesine sahiptirler (Russell ve ark., 1988). McIntosh ve ark. (2003) esansiyel yağ karışımının bazı hiper deaminasyon bakterilerinin (*Clostridium sticklandii* ve *Peptostreptococcus anaerobius*) bakterilerin gelişimini

inhibe ettiği bildirilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmalar esansiyel yağların ortaya çıkardığı etkinin hiper deaminasyon bakterilerinin aktivitelerindeki yavaşlama ile amino asit deaminasyonu üzerinde gözlendiğini ortaya koymaktadır (Benchaa ve ark., 2008). Uzun süreli *in-vitro* kültür çalışmasında esansiyel yağ karışımının farklı dozlarda ruminal azot metabolizmasını etkilemediğini bildirilmiştir (Castillejos ve ark., 2007).

In-situ naylon kese yöntemi ile gerçekleştirilen bir çalışmada esansiyel yağ karışımının soya, yemlik bezelye ve acıbaklanın rumen yıkımlanabilirliğini düşürebileceği ancak bu etkinin pratik hayvan beslemede nemsenemeyecek kadar düşük olduğu bildirilmiştir (Molero ve ark., 2004). Benzer yöntemi kullanan farklı araştırmacılar ise yem maddelerinin rumen azot yıkımlanabilirlikleri üzerine bir etkiyi gzlemleyememiştir (Benchaa ve ark., 2006). Esansiyel yağların rumen protein sindirimi üzerine olan etkilerinin kullanılan esansiyel yağın kimyasal yapısı ile de ilişkili olabileceği ve her esansiyel yağın farklı sonuçlar verebileceği bildirilmiştir (Castillejos ve ark., 2006). Bu bağlamda fenolik bileşiklerin sahip oldukları hidroksil grubu nedeni ile genel anlamda daha yüksek antimikrobiyel aktiviteye sahip oldukları savunulmuştur (Burt, 2004; Dorman ve Deans, 2000; Ultee ve ark., 2002). Fenolik yapı içeren bileşiklerin hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler üzerine daha geniş bir etkilerinin olduğu ortaya çıkmıştır (Dorman ve Deans, 2000; Helander ve ark., 1998; Lambert ve ark., 2001).

Bazı esansiyel yağların rumen azot yıkımlanabilirliği üzerine olan etkilerinin doza bağlı olarak değişiklik gösterebileceği ve yüksek konsantrasyonların (3 000 mg/l) daha düşük konsantrasyonlara göre (300 mg/l) belirgin şekilde ortam amonyak azotu yoğunluğunu düşürebileceği ortaya konulmaktadır (Busquet ve ark., 2006).

1.6.3.2. Esansiyel Yağların Uçucu Yağ Asiti Metabolizmasına Olan Etkileri

Esansiyel yağ veya bu yağların içerisinde bulunan bileşiklerin ruminal fermentasyona ve bu işlemin en önemli çıktılarından olan uçucu yağ asitlerine olan etkileri birçok çalışma ile araştırılmış ve araştırılmaya da devam etmektedir. Bu araştırmalardan biri karışık esansiyel yağların rumen toplam uçucu yağ asiti konsantrasyonunu arttırabileceğini ortaya çıkartmıştır (Castillejos ve ark., 2005). Ancak *in-vivo* olarak gerçekleştirilen farklı iki çalışma ise esansiyel yağ karışımının toplam rumen uçucu yağ asiti yoğunluğuna veya uçucu yağ asitleri arasındaki orana etki etmediği bildirilmiştir (Newbold ve ark., 2004). Esansiyel yağların rumen uçucu yağ asit yoğunluğu üzerine olan etkileri hayvanın tükettiği rasyona bağımlı olarak değişebilmektedir. Laktasyondaki sığırlarda esansiyel yağ uygulamasının yonca silajı ağırlıklı beslenen hayvanlarda toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu arttırdığı ancak mısır silajı ağırlıklı rasyonla beslenen hayvanlarda etkinin tam tersi olduğu gözlenmiştir (Benchaar ve ark., 2007).

Yapılan çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde ise Castillejos ve ark. (2005)'nın bulguları ile çelişen veriler elde edilmekte, esansiyel yağların veya bu yağların içerdiği bileşiklerin genel olarak toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunda bir düşüşe neden olduğu ya da bu parametrede herhangi bir farklılık gözlenmediği bildirilmiştir (Benchaar ve ark., 2008). Farklı bitkisel ekstraktların rumen toplam uçucu yağ asitini düşürüp düşürmemesi uygulanan doza bağımlıdır ve yüksek dozlarda yoğunluğun azaldığı belirginleşmektedir (Busquet ve ark., 2006; Castillejos ve ark., 2006).

Çeşitli esansiyel yağların kullanımı ile asetat oranının azaltılıp bunun yerine propiyonat oranının arttırılabileceği gözlenmiştir (Busquet ve ark., 2005 ; Busquet ve ark., 2006; Mohammed ve ark., 2004). Ancak yapılan bazı çalışmalarda esansiyel yağların rumen uçucu yağ asiti oranları üzerine olan etkileri her zaman arzu edilen

şekilde gerçekleşmeyebileceği gözlenmiştir. Castillejos ve ark. (2006) eugenolün propiyonat oranını düşürürken toplam uçucu yağ asiti miktarını etkilemediğini gözlemlemişlerdir. Esansiyel yağların rumen uçucu yağları üzerine gösterdikleri etkinin pH bağımlı olabileceği bildirilmiştir (Cardozo ve ark., 2005). Buna göre gerçekleştirilen *in-vitro* çalışmada pH'nın 7 civarında olduğu rumen ortamında sinemaldehid yüksek seviyede asetat : propiyonat oranına neden olurken, azalan pH seviyelerinde aynı esansiyel yağın daha düşük asetat : propiyonat oranı şekillendirebileceği bildirilmiştir.

1.6.3.3. Esansiyel Yağların Metan Üretimine Olan Etkileri

Antimikrobiyel aktiviteleri bilinen esansiyel yağların ruminantlarda metan üretimi üzerine etkilerinin olup olmadığı oldukça büyük ilgi uyandırmıştır. Evans ve Martin (2000) *in-vitro* ortamda gerçekleştirdikleri çalışmada esansiyel yağların metan üretimini sınırlandırabileceğini ancak aynı etkinin toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunda da gözlenmediğini bildirmişlerdir. Busquet ve ark. (2005) sarımsak yağının uçucu yağ asiti oranlarını olumlu yönde etkilemesinin yanında rumen metan üretimini de sınırlandırdığını bildirmişlerdir. Bitki ekstraktlarının metan üretiminin baskılanması üzerine olan etkileri Patra ve ark. (2005) tarafından da gözlenmiştir. Ancak araştırmacılar diğer çalışmalardan farklı olarak gerçekleştirdikleri bu çalışmada yem maddelerinin rumen sindirilebilirliklerinin de baskılandığını gözlemlemişlerdir.

In-vivo olarak esansiyel yağların rumen metan üretimine olan etkilerinin değerlendirildiği çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Ticari bir esansiyel yağ karışımının yem katkısı olarak kullanıldığı, kaba yem ağırlıklı beslenen sığırlarda metan üretimi üzerine bir etki gözlenmemesine rağmen rumende yem maddelerinin sindirilebilirliği baskılanmıştır (Beauchemin ve McGinn, 2006). Mohammed ve ark. (2004) sığırlar üzerinde gerçekleştirdikleri çalışma ile esansiyel yağ kullanımının

metan üretimini % 19 seviyesinde baskılayabileceğini bildirmişlerdir. Kullanılan esansiyel yağ türü ve dozunun doğru seçilmesi halinde yem maddelerinin rumende yıkımlanabilirlikleri baskılanmadan metan üretiminin sınırlandırılabilirliği bildirilmiştir (Benchaar ve ark., 2008).

1.6.4. Eugenol ve Ruminant Beslemede Kullanımı

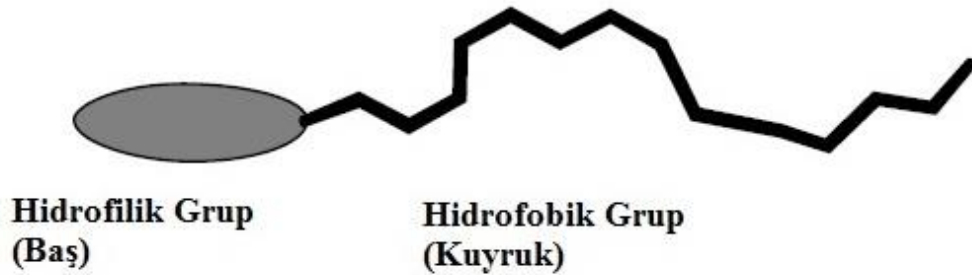
Eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol; $C_{10}H_{12}O_2$) geniş spektrumlu antimikrobiyel aktivitesi olan bir fenolik bileşiktir ve karanfil (*Eugenia caryophyllus* veya *Syzygium aromaticum*) yağında % 85'e kadar, tarçın (*Cinnamomum cassia*) yağında ise %8'e kadar bulunmaktadır (Davidson ve Naidu, 2000). Eugenolün bakteriler üzerine olası etki mekanizmalarının incelendiği bir çalışma eugenolün bakteri hücre membranları üzerinde yıkımlayıcı etkisini ve bu maddenin hücre membranının protein sızdırmasına güçlü bir şekilde neden olduğunu ortaya çıkartmaktadır (Oyedemi ve ark., 2009). Araştırmacılar farklı esansiyel yağların gösterdiği antimikrobiyel etkinin şiddetinin bu esansiyel yağın hidrofilik ya da hidrofobik özelliğine bağlı olabileceğini, bakteri hücre membranı ve mitokondri hücre membranı üzerinde gözlenen yıkım etkisinin şiddetinin bu şekilde değişebileceğini bildirmişlerdir.

Karanfil yağının *in-vitro* rumen ortamında çalışılması sonucu ortamda daha düşük yoğunlukta asetat ve uzun zincirli uçucu yağ asiti yoğunluğu belirlenmiş ancak propiyonatın ortamdaki oranı yükselmiştir (Busquet ve ark., 2005b). Karanfil yağının çalışıldığı bir başka *in-vitro* çalışmada ise (Busquet ve ark., 2006) karanfil yağı rumen yoplam uçucu yağ asiti ile amonyak azotu yoğunluğunu düşürmüş ve propiyonatın ortamdaki yoğunluğunu diğer uçucu yağ asitlerine göre oransal olarak arttırmıştır. Eugenolün rumen fermentasyonu üzerine olan etkisinin *in-vitro* ortamda rasyona ne kadar bağımlı olduğunun tespiti için iki farklı rasyon ile bir çalışma gerçekleştirilmiştir (Castillejos ve ark., 2006). Bu çalışmada kaba yem : konsantre yem oranının 60 : 40 olduğu bir rasyonda eugenolün amonyak azotu ve uçucu yağ asit konsantrasyonunu

düşürdüğü gözlenmiş ve eugenolün deaminasyon işlemini bu fermentasyonda durdurduğu düşünülmüştür. Ancak kaba yem : konsantre yem oranının 10 : 90 şeklinde gerçekleştirildiği fermentasyon ortamında eugenol toplam uçucu yağ asiti konsantrasyonunu düşürürken propiyonik asitin de diğer yağ asitlerine göre olan yoğunluğunu düşürmüştür ve asetik asit:propiyonik asit oranını arttırmıştır. Bu araştırma eugenolün etkisinin rasyona bağımlı olarak da değişiklik gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

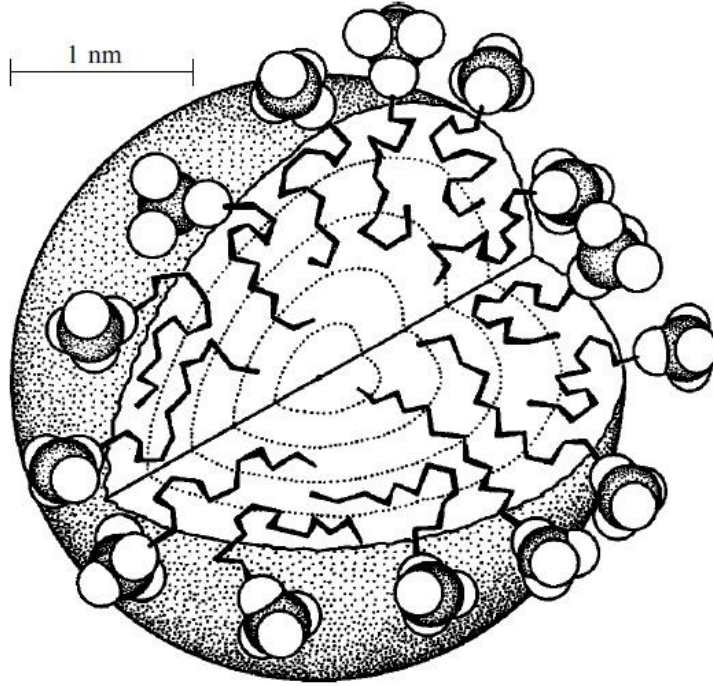
1.7. Sürfaktanlar

Sürfaktanlar yüzey aktif maddelerin karışımı olup, çözeltilerde yağ-su veya katı-su ara yüzeylerinde yüzey gerilimini düşüren bileşiklerdir. Sürfaktanlar emülsifikasyon, köpük oluşumu, temizlik, nemlendirme ve çözünabilirlikte önemli rol oynarlar (Rosen ve Kungjappu, 2012). Sürfaktanların yapısında hem hidrofilik hem de hidrofobik gruplar bulunmaktadır (Sperling ve Parak, 2010). Bu yüzey aktif maddelerin içerdiği hidrofilik ve hidrofobik gruplar polar ve polar olmayan çözeltilerin arayüzlerinde bulunabilmelerini sağlar. Sürfaktanlar farklı maddelerin ara yüzeylerinde (hava-su ve yağ-su) birikerek bu şekilde birbiri içinde çözünmeyen fazların arasındaki itici güçleri azaltır ve iki fazın karışması, birbiri ile daha geçimli olmasını sağlarlar (Holmberg ve ark., 2003).



Şekil 1.7. Sürfaktanların genel yapısı (Holmberg ve ark., 2003).

Misel oluşumunda hidrofobik grup apolar (suda çözünmeyen) kısma yönelirken hidrofilik grup ise polar (suda çözünen) bölüme yönelmektedir (Holmberg ve ark., 2003). Oluşan bir miselde apolar kısma yönelen sürfaktan moleküllerin kuyruğu ve polar kısma yönelen baş kısmı Şekil 1.8.'de şematize edilmiştir (Holmberg ve ark., 2003).



Şekil 1.8. Küresel miselin şematize edilmiş görüntüsü (Holmberg ve ark., 2003).

Süpfaktanların son yıllarda temizlik, ilaç, kozmetik ve gıdalarda kullanımı artmıştır. Süpfaktanların üretim miktarı 2008 yılında 13 milyon ton olarak belirlenmiş ve bu ürünler için oluşan satışların toplam bedeli 2009 yılında 24,33 milyar dolara ulaşmıştır (Reznik ve ark., 2010). Lignoselülozdan indirgeyici şekerlerin üretilmesi işleminde süpfaktanların kullanımının selülozun enzimatik olarak indirgeyici şekerlere dönüşme hızını arttırdığı bildirilmiştir (Helle ve ark., 1993). Petrol çıkarılması işleminde de süpfaktanların kullanılabildiği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2004). Süpfaktanlar oldukça farklı alanlarda kullanılabilen kimyasallardır.

1.7.1. Sürfactanların Sınıflandırılması

Sürfactanlar üretim şekilleri ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaktadır.

1.7.1.1. Sentetik Sürfactanlar

Günümüzde üretilen sürfactanların büyük çoğunluğunu bu başlık altındakiler oluşturmaktadır. Sentetik sürfactanlar polar grubun özelliğine göre iyonik, katyonik, non-iyonik veya zwitteronik olmak üzere 4 ana gruba ayrılmaktadır (Barel ve ark., 2014).

1.7.1.1.1. Anyonik Sürfactanlar

Su çözeltilerinde negatif yüklü iyon veren ve pH'yı nötr ile alkali arasına kaydıran sürfactanlardır. İyonik kısım karboksilat, sülfat, sülfonat veya fosfattan oluşabilir. Bu sınıfta sık olarak kullanılan sürfactanlardan olan alkil sülfatlar ve alkil etoksile sülfatlar cilt bakım ürünlerinde yüksek köpük oluşturma kapasitesi nedeni ile kullanılmaktadır. Bu gruptaki sürfactanlara örnek olarak amonyum lauril sülfat, sodyum lauril sülfat verilebilir.

1.7.1.1.2. Katyonik Sürfaktanlar

Katyonik sürfaktanlar benzalkonium klorid, benzethonium klorid ve setilpiridinyum klorit içeren amonyum bileşikleridir. Oldukça hidrofilik ve suda çözünebilir yapıdadırlar.

1.7.1.1.3. Zwitteronik (Amfoterik) Sürfaktanlar

Amfoterik sürfaktanlar pozitif ve negatif yükü aynı yapıda bulundurabilirler. Yapının yükü ortam pH'sı ile değişmektedir ve belirli bir pH da (izoelektrik pH'da) zwitteronik yapı şekillenmektedir. İzoelektrik pH'da en düşük çözünebilirlik şekillenmektedir.

1.7.1.1.4. İyonik Yapıda Olmayan Sürfaktanlar

Su çözeltilerinde iyonlara ayrıışmayan sürfaktanlara verilen isimdir. Bu tür sürfaktanlar nötr olduklarından oldukça geniş bir pH aralığında stabildirler. Deri ve göz için irrite edici olmamaları önemli özellikleridir. Bu nedenle hassas deri ve bebek ürünlerinde non-iyonik sürfaktanlar kullanılmaktadır.

Ruminant beslemede çalışılan sürfaktanlar genellikle bu sınıftan seçilmiştir ve en sık çalışılanları Polysorbate-60 (polyethylene glycol sorbitan monostearate),

Polysorbate-80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate), APG (alkyl polyglucoside) ve sorbitan trioleatedır.

1.7.1.2. Biyosümfaktanlar

Biyosümfaktanlar bitki, hayvan ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedirler (Liu ve ark., 2013). Biyosümfaktanlar düşük toksisiteye sahiptirler. Biyolojik olarak yıkımlanabilirliği yüksek, geniş pH ve sıcaklık aralıklarında etkinliğini sürdüren moleküllerdir (Soberon-Chavez ve Maier, 2011; Banat ve ark., 2010). Biyosümfaktanlar da kendi içlerinde kimyasal yapılarına göre polisakkaritler, lipopolisakkaritler, proteinler ve lipoproteinler olarak 4 kategoriye ayrılmaktadırlar (Liu ve ark., 2013).

1.7.2. İyonik Olmayan Sümfaktanların Ruminantlarda Etki Mekanizması

İyonik yapıda olmayan sümfaktanlar ile rumen fermentasyonu üzerine yapılan çalışmalarda bu maddelerin iki şekilde etki ettiği belirtilmiştir. Bu etki mekanizmalarından birincisinde non-iyonik sümfaktanların mikroorganizma enzim salınımını ve enzim aktivitesini arttırarak sağladığı öne sürülmüştür (Lee ve ark., 2004; Ha ve ark., 2002). İkinci etki mekanizmasının ise enzim ile substrat etkileşiminin artması ile oluştuğu bildirilmiştir (Viparelli ve ark., 2001; Tu ve ark., 2009).

1.7.2.1. İyonik Yapıda Olmayan Sürfaktanlar ve Rumende Enzim Aktivitesi

İn-vitro ortamda *Geobacillus thermoleovorans*'ın α -amilaz üretimine farklı non-iyonik emülsifiyerlerin etkisi değerlendirilmiştir (Uma Maheswar Rao ve Satyanarayana, 2003). Çalışmada *Geobacillus thermoleovorans* nişasta içeren besi yerlerinde inkübe edilmiştir ve besi ortamına sürfaktanlardan sodium dodecyl sulfate (SDS), Polysorbate 20, Polysorbate 40 ve Polysorbate 80 eklenerek amilaz miktarlarındaki değişiklikler değerlendirilmiştir. SDS ve Polysorbate 80 uygulaması ile enzim titresini kontrol grubuna göre yaklaşık iki kat artmıştır. Yapılan bir başka çalışmada iyonik olmayan emülsifiyerlerin mantar kültürlerinde salgılanan selüloz, amilaz, sükras, ksilanaz gibi enzimlerin miktarını arttırdığı bildirilmiştir (Reese ve Maguire, 1969). *Penicillium simplicissimum*'un Polysorbate 80 varlığındaki ekstraselüler enzim üretimi değerlendirildiğinde amilaz, karboksimetil selüloz ve ksilanazın arttığı ancak proteaz üretiminin azaldığı tespit edilmiştir (Zeng ve ark., 2006). Bir mantar olan *Neurospora crassa*'nın besi ortamındaki endoglukonaz ve ekzoglukonaz yoğunluklarının Polysorbate 80 varlığında arttığı bildirilmiştir (Yazdi ve ark., 1990).

İyonik yapıda olmayan emülsifiyerlerin genel anlamda mikroorganizmaların protein sekresyonunu arttırması hücre membranının lipid yapısı ile etkileşime girmesi ile ilişkilendirilmiştir. Mikroorganizmalar ekzojen enzimlerini hücre içi organellerden ekzositoz yöntemi ile salgılamaktadırlar, sürfaktanların hem hücre içi organellerin membranı hem de hücre membranı ile etkileşime girerek ekzositozisi destekledikleri düşünülmektedir (Singh ve ark., 2007).

1.7.2.2. İyonik Yapıda Olmayan Sürfaktanlar ve Enzim-Substrat Etkileşimi

İşlenmiş şeker kamışı artıkları ile yapılan bir çalışmada enzimatik hidrolize maruz kalan artıkların işlem öncesi polysorbate 20 ile muamele edilmesinin sadece su ile muamele edilen gruba göre lignin kalıntısını % 22-27 oranında azalttığı bildirilmiştir (Kurakake ve ark., 1994). Araştırmacılar, bu etkinin hidrofobik yapıdaki substratın sürfaktanın etkisi ile suda ekstrakte olabilir hale gelmesine ve bu şekilde enzimin çalışabilmesi için gerekli olan substrat yüzey alanının genişlemesine bağlamışlardır.

Selülazın, selülozu hidrolize etmesi esnasında substrat yüzeyine çok güçlü bir şekilde bağlandığı ve bu nedenle aktivitesinde azalma oluştuğu bildirilmiştir (Howell ve Mangat, 1978). İyonik olmayan sürfaktanların enzimin substrat yüzeyinde etkisini gösterdikten sonra daha fazla substratı hidrolize edebilmesi için geri salınımını arttırdığı bildirilmiştir (Park ve ark., 1992). Lignoselülozun hidrolizi sırasında selülaz enziminin lignin yüzeyine bağlanarak etkinliğinin azaldığı ve bu bağlanmanın sürfaktanlar yardımı ile çözülüp enzimin inaktive olmadan tekrar kullanılabilirdiği bildirilmiştir (Börjesson ve ark., 2007).

1.7.3. Ruminant Beslemede İyonik Olmayan Sürfaktanlar İle Yapılan *in-vitro* Çalışmalar

APG, sorbitan triolat (Span85) ve Polysorbate 80 olmak üzere 3 farklı non-iyonik sürfaktan'ın mısır hasılı, pirinç samanı ve buğday samanının *in vitro* olarak yıkımlanabilirliği ve uçucu yağ asiti konsantrasyonu üzerine etkileri değerlendirilmiştir (Cong ve ark., 2009). Yapılan çalışmada mısır hasılının *in-vitro*

kuru madde yıkımlanabilirliği ve *in-vitro* organik madde yıkımlanabilirliği artan APG seviyelerinde yükselmiştir. En iyi yıkımlanabilirlik seviyesi % 0,02 düzeyinde yakalanmıştır. Span85'in *in-vitro* kuru madde yıkımlanabilirliğini ve *in-vitro* organik madde yıkımlanabilirliğini yalnızca %0,02 seviyesinde arttırabildiği tespit edilmiştir. Belirtilen sürfaktanların mısır hasılının yıkımlanabilirliği ile etkileşim gösterdiği tespit edilmiştir. Pirinç samanında APG'nin *in-vitro* kuru madde yıkımlanabilirliği ve *in vitro* organik madde yıkımlanabilirliğini arttırdığı tespit edilmiştir. Ancak Span85'in artan konsantrasyonları pirinç samanında *in vitro* kuru madde ve organik madde yıkımlanabilirliğini düşürmüştür. Bu yem maddesinin yıkımlanabilirliği üzerinde sürfaktanların etkileşimi söz konusudur. Buğday samanında APG'nin % 0,02 ve % 0,05 dozda uygulandığında *in vitro* kuru madde ve organik madde yıkımlanabilirliğini arttırdığı bildirilmiştir. Buna karşın APG'nin % 0,1 seviyesinde uygulanmasının *in vitro* organik madde yıkımlanabilirliğini düşürdüğü tespit edilmiştir. Span85'in buğday samanı *in vitro* yıkımlanabilirliğine istatistiksel anlamda önem arz eden bir etki oluşturmadığı belirtilmiştir. Buğday samanında en iyi *in-vitro* kuru madde ve organik madde yıkımlanabilirliği % 0,1 seviyesinde Polysorbate 80 uygulaması sonunda elde edilmiştir. Yapılan çalışmada iyonik olmayan sürfaktanların *in vitro* kuru madde ve organik madde yıkımlanabilirliği genel olarak arttırdığı ancak istisnaların Span85 için tahıl samanlarında ve polysorbate 80 için mısır haslında gözlemlendiği bildirilmiştir. Gözlenen etkinin uygulama dozuna oldukça bağımlı şekillendiği de çalışmanın bulguları arasındadır. Mısır haslında APG'nin toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu yalnızca % 0,1 seviyesinde arttırdığı bildirilmiştir. APG seviyesi arttıkça asetat seviyesinin arttığı, propiyonat seviyesinin düştüğü bildirilmiştir. Span 85'in toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu arttırdığı ancak asetat seviyesine etki etmediği bildirilmiştir. Polysorbate 80'in ise mısır hasılının *in vitro* fermentasyonunda asetat yoğunluğunu düşürdüğü ancak bütirat ve propiyonat yoğunluğunu arttırdığı bildirilmiştir. Pirinç samanında APG yoğunluğunu arttıkça toplam uçucu yağ asiti ve propiyonat yoğunluğunda düşüş gözlenirken asetat yoğunluğunda artış bildirilmiştir. Span85, % 0,02 ve % 0,05 seviyesinde uygulandığında asetat yoğunluğunu arttırmıştır ancak % 0,1 seviyesinde asetat seviyesinde düşüş gözlenmiştir. Span85'in propiyonat üzerinde etkisi olmadığı, bütirat yoğunluğunu yalnızca % 0,1 dozda arttırdığı ancak % 0,02 ve % 0,05 seviyesinde uygulandığında bütiratın yoğunluğunun düştüğü

gözlenmiştir. Polysorbate 80'in genel olarak toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu düşürdüğü ve asetatı da oransal olarak düşürdüğü bildirilmiştir. Polysorbate 80'in etkisinde propiyonat ve bütiratta artış gözlenmiştir. Buğday samanının in vitro fermentasyonunda APG'nin % 0,02 düzeyinde uygulanması en yüksek toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu (33,7 mmol/L) ve bütirat oranını (% 16,7) vermiştir. APG varlığında asetatın artış gösterdiği ancak propiyonatın düştüğü bildirilmiştir. Span85 seviyesinin arttırılması toplam uçucu yağ asiti, asetat ve propiyonat yoğunluğunu arttırmış ancak bütirat konsantrasyonunu düşürmüştür. Polysorbate 80, % 0,02 seviyesinde en yüksek bütirat ve % 0,05 seviyesinde en yüksek asetat yoğunluğunu vermiştir.

Non-iyonik sürfaktanlardan polysorbate 80'in farklı dozlarda *in-vitro* fermentasyon ortamına uygulanmasının domuz ayrığı (*Dactylis glomerata*) ve arpanın *in-vitro* ortamdaki selüloz yıkımlanabilirliği ve mikroorganizma enzim aktivitesine olan etkisi değerlendirilmiştir (Lee ve Jong, 2003). Polysorbate 80'in arpa bulunan kültüre % 0,05 eklenmesi 30 saatlik inkübasyon sonucunda selülaz, ksilanaz ve amilaz aktivitesinde artışa neden olmuştur. Domuz ayrığı bulunan kültürde bahsedilen enzimlerin artışı ise 72 saatlik inkübasyon sonucunda gözlenmiştir. Enzim aktivitelerinde bahsedilen artış % 0,1 düzeyinde Polysorbate 80 bulunan gruplarda inkübasyon boyunca yapılan bütün ölçümlerde gözlenmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada polysorbate 80'in *in-vitro* ortamda bir yem bitkisi olan domuz ayrığı (*Dactylis glomerata*)'nın su ve enzim tutma kapasitesi ile enzimatik yıkımlanabilirliği üzerine etkisi değerlendirilmiştir (Goto ve ark., 2003a). Yapılan çalışmada domuz ayrığının su ve enzim tutma kapasitesinin polysorbate 80 varlığında arttığı bildirilmiştir. Ancak gözlenen enzim tutma kapasitesinin polysorbate 80'in yalnızca % 0,2 seviyesinde uygulanması ile elde edildiği bildirilmiştir. Polysorbate 80 uygulamasının kuru madde yıkımlanabilirliğini arttırdığı ancak bu artışın enzim tutma kapasitesinden elde edilen veriler ile paralel olmadığı bildirilmiştir.

Polysorbate 80'in domuz ayrığı (*Dactylis glomerata*) ve arpa içeren *in-vitro* fermentasyon ortamında kuru madde yıkımlanabilirliği, uçucu yağ asitleri konsantrasyonu, uçucu yağ asitlerinin dağılımı ile selülitik bakteri ve toplam bakteri sayısına etkisi değerlendirilmiştir (Goto ve ark., 2003b). Çalışmada rumenden izole edilen *S. bovis* (45S1), *S. ruminantium* (L100), *Butyrivibrio fibrisolvens* (L139), *P. ruminicola* (JB29), *Megasphaera elsidenni* (B159), *F. succinogenes* (85), *Ruminococcus albus* (7) ve *Ruminococcus flavefaciens* (Fd1) bakterilerinin saf kültürleri ve rumenden elde edilen karışık kültür kullanılmıştır. *S. bovis*, *S. ruminantium*, *P. ruminicola*, *M. elsidenni* ve *B. fibrisolvens*'in polysorbate 80 varlığında bütün yoğunluklarda kontrol grubuna göre fazla gelişim gösterdiği bildirilmiştir. Selülitik mikroorganizmalar arasında yalnızca *F. succinogenes*'in sayısı inkübasyonun 20. saatinde istatistiki olarak önemli bir artış göstermişken diğer selülitik bakterilerde bir değişim tespit edilememiştir. Arpa ve domuz ayrığının *in vitro* yıkımlanabilirliği polysorbate 80'in % 0,2 yoğunluğunda kullanılması ile artmıştır. Toplam uçucu yağ asiti yoğunluğu her iki yem maddesi için de Polysorbate 80'in % 0,2 konsantrasyonda kullanılması ile en yüksek seviyeye çıkmışken %0,01 düzeyinde de bir miktar artış gözlenmiştir. Propiyonat : asetat oranında deneme gruplarında artış yönünde bir eğilim gözlenmiştir. Bu eğilimin propiyonat üreten *S. ruminantium*, *B. fibrisolvens* ve *M. Elsidenii* gibi bakterilerin sayılarında gözlenen artıştan kaynaklandığı düşünülmektedir.

İyonik olmayan sürfaktanların *in-vitro* ortamda rumen mikroorganizmalarının selüloz içeren yem maddelerine adsorpsiyonu, proteaz aktivitesi ve selüloz yıkımlanabilirliğinin değerlendirilmesi için polysorbate 60 ve polysorbate 80 farklı seviyelerde fermentasyon ortamına uygulanmıştır (Kamande ve ark., 2000). Her iki sürfaktanın da proteaz aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir ancak polysorbate 80 ile gözlenen artış daha fazla olmuştur. Proteaz aktivitesinde gözlenen en fazla artış polysorbate 60 için % 99,2 düzeyinde, polysorbate 80 için ise % 166,8 seviyesinde belirlenmiştir. Mikrobiyal proteinin arpa samanına adsorbe olma oranı reaksiyon karışımına % 0,1 seviyesinde polysorbate 80 ile 0,026 µg/(mg-dk.)'dan 0,034 µg/(mg-dk.)'a yükselmiştir. Sürfaktan seviyesinin % 0,1'in üzerine çıkarılması adsorpsiyonda

herhangi bir artış şekillendirmemiştir. *In-vitro* selüloz yıkımlanması 24 saatlik inkübasyon sonunda değerlendirilmiştir. Buna göre kontrol grubunda selüloz yıkımlanması saatte $0,6 \pm 0,21$ µg/ml, % 0,25 polysorbate 60 içeren grubun selüloz yıkımlanması saatte $0,87 \pm 0,28$ µg/ml ve % 0,25 polysorbate 80 içeren grupta saatte $1,04 \pm 0,32$ µg/ml olarak tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan iyonik olmayan sürfaktanların proteaz aktivitesini, selüloz yıkımlanabilirliğini arttırdığı ve polysorbate 80'in mikrobiyal proteinin arpa samanına adsorbe olma oranını arttırdığı bildirilmiştir.

Polysorbate 80 ve monensin'in besi sığırlarında geliştirme ve bitirme rasyonlarında fermentasyona etkileri *in-vitro* ortamda incelenmiştir (Wang ve ark., 2004). Kullanılacak geliştirme rasyonu arpa ve arpa silajını sırası ile 58 : 42 oranında içermekte iken bitirme rasyonu bu yem maddelerini sırası ile 93 : 7 oranında içermektedir. Geliştirme rasyonunun bulunduğu inkübasyona yalnızca monensinin ilave edilmesi kuru madde yıkımlanabilirliği, gaz üretimi, asetat : propiyonat oranını ve mikrobiyal azot seviyesini arttırmış, indirgeyici şeker seviyesini düşürmüştür. Polysorbate 80'in tek başına kullanılması 24. saatte mikrobiyal azot seviyesini arttırmıştır, 12. saatte asetat : propiyonat oranını düşürmüş ve 4. saatte kuru madde yıkımlanabilirliği ve indirgeyici şeker seviyesini arttırmıştır. Monensin ve polysorbate 80'in birlikte uygulanmasından kaynaklı etki asetat : propiyonat oranında (4. ve 12. - saat), mikrobiyal azot seviyesinde (4. ve 24. saatte) ve indirgeyici şeker seviyesinde (4, 12 ve 24. saatte) gözlenmiştir ancak kuru madde yıkımlanabilirliği, gaz üretimi ve uçucu yağ asiti seviyesinde bir etki gözlenmemiştir. Asetat : propiyonat oranı ve mikrobiyal azot miktarındaki düşüş ile indirgeyici şeker seviyesindeki artış monensin ve polysorbate 80 birlikte uygulandıklarında tek tek uygulamalarda elde edilen etkiden daha güçlüdür. Monensin ve polysorbate 80'in bulunduğu inkübasyon ortamında 24. saat sonundaki bütün polisakkarit yıkımlayıcısı enzimlerin (amilaz, karboksimetil selülaz, B-glukanaz ve ksilanaz) aktiviteleri kontrol grubuna göre daha yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Bitirme rasyonu ile yapılan inkübasyonda ölçülen parametrelerin hiçbirinde monensin ve polysorbate 80 arasındaki etkileşime bağlı bir etki tespit edilememiştir. Monensin'in tek başına uygulanması kuru madde yıkımlanabilirliği, asetat : propiyonat oranı, mikrobiyal azot seviyesi ve indirgeyici

şeker seviyesini belirgin bir şekilde ilk deneyde olduğu gibi etkilemiştir. Ancak polysorbate 80'in bu rasyonda tek başına gösterdiği etki monensine göre daha hafiftir. Araştırmacılar polysorbate 80'in tek başına uygulanmasında gözlenen etkinin monensinin tek başına uygulanmasında gözlenen etkiye göre daha zayıf olduğu ve bu etkinin rasyonun yapısına bağlı olduğunu gözlemişlerdir. Monensin ile polysorbate 80'in birlikte kullanılmasının sinerjistik etki gösterdiği bildirilmiştir.

Polysorbate 80'in *in-vitro* ortamda inkübe edilen rumen sıvısına % 0,05 ve % 0,1 düzeyinde katılmasının hücre bağımsız enzim konsantrasyonunu arttırdığı ancak hücreye bağlı bulunan enzim seviyesinin aynı şekilde etkilenmediği bildirilmiştir (Ha ve ark., 2002). Yapılan çalışmada ortamda bulunan selülitik olmayan bakterilerin sayısının polysorbate 80 ile arttığı ancak aynı etkinin selülitik olmayan bakteriler için gözlenmediği bildirilmiştir. Araştırmacılar polysorbate 80'in etkisinin gram pozitif bakteriden çok gram negatif bakterilerde ve selülitik olmayan bakterilerde gözlendiğini belirtmişlerdir.

1.7.4. Polysorbate 80

İyonik yapıda olmayan bir sürfaktan olan polysorbate 80 (polyoxyethylene sorbitan monostearate- $C_6H_{124}O_{26}$) genellikle suda ve organik çözücülerde kolaylıkla çözünmektedir (Liu ve ark., 2013). Polisorbatlar genel olarak gıda alanında üstün emülsifiye edici özelliği nedeni ile kullanılan sürfaktanlardır ve birçok ülkede bu amaçla kullanımına izin verilemektedir, polysorbate 80 emülsifiye edici gıda katkıları kategorisinde Avrupa Birliğinde E 433 kod numarası ile kayıt altına alınmıştır (Cottrell ve van Peij, 2004). Gıdalarda özellikle dondurma üretiminde kıvam arttırıcı ve erimeye direnci arttırmak amaçlı hacimsel olarak % 0.5'e kadar kullanılmaktadır (Goff, 1997).

Polysorbate 80'nin ve bazı farklı iyonik yapıda olmayan sürfaktanların kullanımı ile bakterilerin enzim sekresyonunun artabileceği belirtilmektedir. Bu etkinin iyonik yapıda olmayan sürfaktanların hücre membranlarının lipid kısımları ile etkileşime girmesi yoluyla sağlayabileceği ileri sürülmektedir (Singh ve ark., 2007). Bu gelişmeleri takip eden araştırmacılar iyonik yapıda olmayan sürfaktanların ruminant besleme alanındaki olası etkilerini tespit edebilmek için son yıllarda çok sayıda çalışma gerçekleştirmişlerdir. Gerçekleştirilen birçok çalışmada polysorbate 80'in de etkisi araştırılmıştır. Polysorbate 80'in rumende uçucu yağ asiti konsantrasyonunun manipüle edilmesinde, rumen enzimlerinin yoğunluğunun artırılmasında ve yem maddelerinin rumende yıkımlanabilirliğinin artırılmasında etkili olabileceğini gösteren araştırmalar mevcuttur (Cong ve ark., 2009; Goto ve ark., 2003a; Goto ve ark., 2003b; Lee ve Jong, 2003).

1.8. Sürfaktanların ve Esansiyel Yağların Birlikte Kullanımı

Antimikrobiyel etkinliği bilinen bileşiklerin etkinliğinin artırılabilmesi adına çok farklı alanlarda günümüze kadar çok çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çeşitli patojenlere karşı klortetrasiklinin antibakteriyel etkisinin bir sürfaktan olan polysorbate 80 ile kombine edilmesi ile güçlendiğini ortaya çıkartmıştır (Suling ve O'Leary, 1975). Araştırmacılar bu etkiyi sürfaktanın, antibiyotik maddenin bakteriye nüfuz etme seviyesini artırması ile ilişkilendirmişlerdir. Çeşitli antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiği bilinen *Staphylococcus aureus*'un bir biyosürfaktan varlığında direnç geliştirdiği antibiyotiklere karşı hassasiyetinin arttığı gözlenmiştir (Irfan ve ark., 2015). Polysorbate 80 ile çeşitli antibiyotiklerin (metronidazole ve clarithromycin) birlikte kullanılmasının *Helicobacter pylori*'ye karşı sinerjistik bir etki yarattığı oraya konulmuştur (Figura ve ark., 2012).

Esansiyel yağların gösterdikleri antifungal etkinin polysorbate 80 ile kombine edilmeleri halinde birkaç kat artabileceği bildirilmektedir (Matsuzaki ve ark., 2013). Gıda alanında gerçekleştirilen bir çalışma (Li, 2011) bir sürfaktan olan lesitin, timol'ün *E. Coli O157:H7* ve *Listeria monocytognes* patojenlerine karşı inhibe edici etkisini güçlendirdiğini ortaya koymaktadır (Xue ve ark., 2017).

Monensin ile polysorbate 80'in kombine edilmesinin *in-vitro* rumen fermentasyonuna etkisinin değerlendirildiği bir çalışma asetik asit : propiyonik asit oranının düşürülmesinde sinerjistik bir etki gözlenebileceğini ortaya koymaktadır (Wang ve ark., 2003). Esansiyel yağlarda bulunan fenol bileşiklerin iyonofor antibiyotiklerin etki mekanizmasına benzer bir etki mekanizması ile antimikrobiyel etki gösterebileceği ortaya atılmıştır (Ultee ve ark., 2002).

Bitkisel esansiyel yağların ve iyonik yapıda olmayan sürfaktanların rumen fermentasyonuna olan etkileri ayrı ayrı olarak birçok defa çalışılmıştır. Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda sürfaktanların antimikrobiyel etkisi olan bileşiklerin bu etkisini güçlendirebileceği bildirilmiştir. Ancak sürfaktanların bitkisel esansiyel yağlar ile kombine edilmesi halinde esansiyel yağların rumen fermentasyonu üzerine olan etkilerini etkileyip etkilemeyeceği daha önce çalışılmamıştır. Gerçekleştirilen çalışmanın amacı bitkisel esansiyel yağlar ile iyonik yapıda olmayan sürfaktanların kombine edilmeleri halinde esansiyel yağların rumen fermentasyonu üzerine oluşabilecek etkilerinin güçlenip güçlenmeyeceğinin anlaşılmasıdır. Bu bileşiklerin birlikte kullanımının farklı alanlarda ortaya konulan etkisinin rumen fermentasyonu üzerinde de gözlenip gözlenmeyeceğinin ortaya konulması mevcut çalışmanın ana hedefidir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Rumen İçeriği

Tezin kapsamında oluşturulan araştırmada kullanılan rumen içeriği Çubuk / Ankara ve Kazan / Ankara mezbahalarından kesilen ve tarihçesinde %80 konsantre ve %20 kaba yem tükettiği tespit edilen besi sığırlarından kesimi hemen takiben rumenin açılması ile önceden vücut ısısına kadar ısıtılmış termoslara alınarak Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları laboratuvarına rumen mikroorganizmalarının canlılığını sağlamak için mümkün olan en kısa sürede getirilmiştir. Her bir inkübasyon için bir besi sığırından rumen sıvısı elde edilmiştir.

2.2. Yem Materyali

In-vitro rumen yıkımlanabilirliği ve gaz üretimi çalışmalarında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim ve Araştırma Çiftliğinde üretilen iki sıralı yemlik arpa ve ortalama partikül büyüklüğündeki arpa samanı kullanılmıştır. Her iki yöntem için de kullanılan yem maddeleri kuru madde bazında 50 : 50 oranında olacak şekilde ayarlanmıştır. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan değirmende 1 mm'lik elek kullanılarak çekilmiştir. Yem maddelerinin kuru madde, organik madde, ham protein değerleri AOAC (2000)'de bildirilen yönteme göre, NDF, ADF ve ham selüloz değerleri ise Ankom Fiber Analyzer (Ankom Technology Corporation, Fairport, NY,

USA) cihazında firma önerileri ile gerçekleştirilmiştir (Van Soest ve ark., 1991).

2.3. Gaz Üretim Tekniğinin Uygulanması

Gaz üretim tekniğinde kullanmak üzere tamponlanmış rumen sıvısı ve fermentasyon işlemleri Menke ve ark. (1979) belirttiği şekilde hazırlanmıştır. İnkübasyon öncesi kullanılacak bütün malzemeler bir gece önceden 39°C’de tutulmuştur. Rumen sıvısı önceden ısıtılmış termosla aktararak laboratuvara taşınmıştır. Rumen sıvısı tülbent ile süzölmüş ve karbondioksit ile muamele edilmiştir. Belirtilen işlemlerden geçirilen rumen sıvısı tamponlu mineral sıvısı ile karıştırılmıştır. Karışım oranı rumen sıvısı : tamponlu mineral sıvısı 1 : 2 (hacimsel) olacak şekilde tasarlanmıştır. Yaklaşık olarak 200 mg yem kuru maddesi 100 ml ölçülü cam şırıngalara yerleştirilmiştir. Hazırlanan tamponlu rumen sıvısı karışımından 30 ml alınarak yem numunelerinin yerleştirildiği cam şırıngalara eklenmiştir. Çalışma tasarımına göre kontrol grubunun (K) bulunduğu cam fermenterlere (şırınga) herhangi bir katkı eklenmemiştir ancak yem eklenmiştir, düzeltme faktörü için kullanılacak kör gruba (B) ise yalnızca tamponlu rumen sıvısı eklenmiş, yem ya da hiçbir katkı maddesi eklenmemiştir. Deneme gruplarında ise fermenterlere yalnızca polysorbate 80’nin 0.5 µl/ml (S1) ve 1 µl/ml (S2) dozunda eklendiği iki grup, yalnızca eugenol’ün 300 µg/ml (E3) ve 600 µg/ml (E6) dozlarında eklendiği iki grup ile polysorbate 80 ve eugenol’ü sırası ile 0.5 µl/ml+300 µg/ml (M1), 1 µl/ml+600 µg/ml (M2), 0.5 µl/ml+600 µg/ml (M3), 1 µl/ml+300 µg/ml (M4) dozlarında karışım olarak eklendiği dört grup bulunmaktadır. Gaz üretiminde farklı gruplarda kullanılan katkı miktarları Çizelge 2.1’de belirtilmiştir. Çalışmada bütün gruplarda dört tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. Cam şırıngalara içerisine yem numuneleri, tamponlu mineral solüsyonu ile karıştırılmış rumen sıvısı ve grubuna göre katkıları eklenen 100 ml ölçülü cam şırıngalar 39°C de bulunan ve 40 adet cam fermentör kapasiteli dakikada bir tur tamamlayan döner inkübatöre yerleştirilmiş ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda pH ölçümü yapılmış ve amonyak azotu, uçucu yağ asitinin belirlenmesi için fermentasyon sıvısından örnek alınarak dondurulmuştur. Toplam gaz miktarı ve metan miktarının belirlenmesi için şırıngalarda toplam gaz

miktarı ölçülmüş ve 6. ve 24. saatlerde vakumlu vacutainer tüplere gaz numunesi alınmıştır.

Çizelge 2.1. Gaz üretimi uygulamasında gruplarda bulunan katkıları.

UYGULAMA	Yem Numunesi (Arpa ve Arpa Samanı)	Polysorbate 80 (µl/ml)	Eugenol (µg/ml)
Boş (B)	-	-	-
Kontrol (K)	+	-	-
S1	+	0.5	-
S2	+	1	-
E3	+	-	300
E6	+	-	600
M1	+	0.5	300
M2	+	1	600
M3	+	0.5	600
M4	+	1	300

2.4. Yem Maddelerinin *in-vitro* Rumen Sindirilebilirliğinin Belirlenmesi

Yem maddelerinde bulunan kuru madde, organik madde ve NDF'nin *in-vitro* olarak rumen yıkımlanabilirliklerinin belirlenebilmesi amacı ile 'ANKOM F57' filtre keseleri ve 'DAISY II' inkübatörü (ANKOM Technology, Fairport, New York, USA) kullanılmıştır. DAISY II inkübatörü 48 cm*55 cm*30 cm ebatlarında ve ısıtıcısı bulunan bir inkübatördür. İnkübatöre dört adet dört litre hacmindeki kavonozlardan yerleştirilebilmekte ve rumen simülasyonu oluşturulmaktadır. Bu kavonozlar inkübatörde 80⁰ açı ile bulunur ve dakikada 0.95 tur tamamlamaktadır. Kullanılan keseler poliester/polietilen yapıda olup 25 µm'den büyük partikülleri içerisinde tutacak şekilde dizayn edilmiştir. Metot ANKOM Technology firması tarafından önerildiği şekilde her bir kese için 0.5 g yem numunesi kullanılmıştır ve her bir

inkübasyon kavanozu için 20 kese kullanılmıştır. İnkübasyonda kullanılacak olan tampon solüsyonları ve rumen sıvısı ile inkübasyon işlemi Robinson ve ark. (1999) belirttiği şekilde hazırlanmıştır. Farklı haftalarda dört kere inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen bütün inkübasyonlarda kontrol grubunun (K) bulunduğu kavanoza herhangi bir katkı maddesi eklenmemiştir. Birinci inkübasyonda deneme grubu olarak ikinci kavanozda yalnızca Polysorbate 80, 0.5 µl/ml dozda (S1), üçüncü kavanozda yalnızca 300 µg/ml eugenol (E3) ve dördüncü kavanozda ise polysorbate 80 ve eugenol karışım halinde sırası ile 0.5 µl/ml+300 µg/ml (M1) dozda eklenmiştir. İkinci inkübasyonda ise kontrol grubuna ek olarak deneme gruplarında ikinci kavanozda yalnızca polysorbate 80, 1 µl/ml (S2), üçüncü kavanozda yalnızca eugenol 600 µg/ml (E6) ve dördüncü kavanozda polysorbate 80 ve eugenol karışım halinde sırası ile 1 µl/ml+600 µg/ml dozda (M2) kullanılmıştır. Üçüncü inkübasyonda ise kontrol grubuna ek olarak ikinci kavanozda polysorbate 80 ve eugenol karışım halinde sırası ile 0.5 µl/ml+600 µg/ml (M3), üçüncü kavanozda polysorbate 80 ve eugenol karışım halinde sırası ile 1 µl/ml+300 µg/ml (M4), dördüncü kavanozda ise polysorbate 80 ve eugenol karışım halinde sırası ile 0.5 µl/ml+150 µg/ml (M5) dozda kullanılmıştır. Her bir inkübasyonda gruplara göre kullanılan katkı maddeleri ve dozları Çizelge 2.2’de görülmektedir. İnkübasyon 48 saat sonunda sonlandırılmıştır. Toplanan keseler hemen buzlu suda beklemeye alınmıştır ve ardından yıkanan keselerin içeriği belirtilen metodlar ile analiz edilmiştir.

Çizelge 2.2. In-Vitro Sindirilebilirlik Uygulamasında İnkübasyonlara Göre Kullanılan Katkılar ve Düzeyleri

	1.Kavanoz	2. Kavanoz	3. Kavanoz	4. Kavanoz
İnkübasyon No.	Kontrol	Polysorbate 80 (µl/ml)	Eugenol (µg/ml)	Polysorbate 80 (µl/ml) + Eugenol (µg/ml)
1	-	0.5 (S1)	300 (E3)	0.5+300 (M1)
2	-	1 (S2)	600 (E6)	1+600 (M2)
3	-	0.5 (S1)	600 (E6)	0.5+600 (M3)
4	-	1 (S2)	300 (E3)	1+300 (M4)

2.5. *İn-Vitro* Fermentasyondan Çıkan Yem Maddelerinin Analizleri ve Değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılacak yem maddelerinin ve *in-vitro* fermentasyon sonrası geriye kalan besin madde bileşenleri A.Ü. Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları A.B.D. laboratuvarında analiz edilmiştir. Kuru madde ve organik madde AOAC (2000)'de bildirilen metotlara göre analiz edilmiştir. Daisy II cihazından inkübasyon sonrası elde edilen keselerdeki yem maddelerinde *in-vitro* gerçek kuru madde ve NDF sindirilebilirliğinin tespiti amacı ile analizler Ankom[®] Fiber Analyzer'da (Ankom Technology Corporation, Fairport, NY, USA) firma tarafından önerilen yöntemle gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen analizler sonrası ortaya çıkan sonuçlara göre fermentasyon sonucu kayba uğrayan besin maddeleri yüzdesel olarak ortaya konulmuştur.

$$\text{In-Vitro Gerçek Kuru Madde Sindirilebilirliği \%} = 100 - \frac{(T3 - (T1 \times C1))}{(T2 \times D)} \times 100$$

$$\text{In-Vitro Organik Madde Sindirilebilirliği \%} = 100 \times \frac{(T2 \times Q) - ((T3 - T1) \times Z)}{T2 \times Q}$$

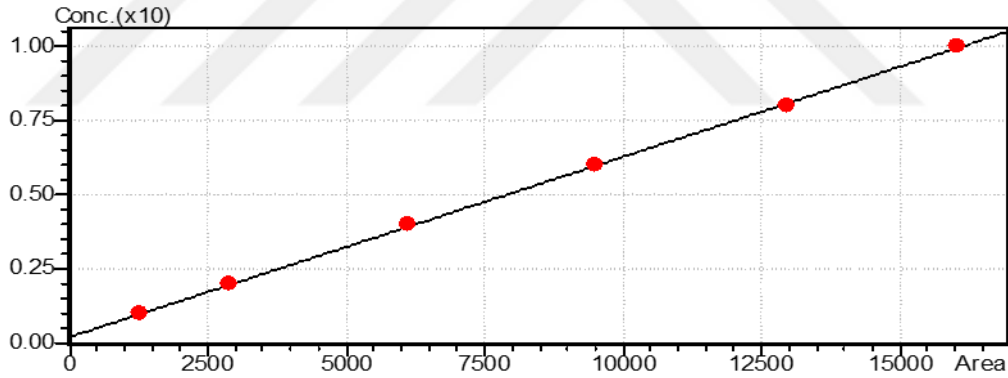
$$\text{In-Vitro NDF Sindirilebilirliği \%} = 100 \times \frac{(T2 \times \frac{A}{100}) - (T3 - T1)}{T2 \times \frac{A}{100}}$$

T1: Kullanılan kese ağırlığı, T2: Kullanılan Yem Numunesi Ağırlığı, T3: *In-Vitro* İnkübasyon Sonrası Kese ve Yem Ağırlığı, D: İnkübasyon Öncesi Yem Kuru Maddesi, C1: İnkübasyona Bağlı Kese Ağırlığı Değişim Düzeltme Katsayısı, A: Yem İnkübasyon Öncesi NDF Değeri %, Q: Yem İnkübasyon Öncesi Organik Madde %, Z: İnkübasyon Sonrası Yem Organik Maddesi %

Şekil 2.1. *İn-Vitro* Gerçek Kuru Madde, Organik Madde ve NDF sindirilebilirliklerinin hesaplanmasında kullanılan eşitlikler.

2.6. Rumen Sıvısında UYA Analizi

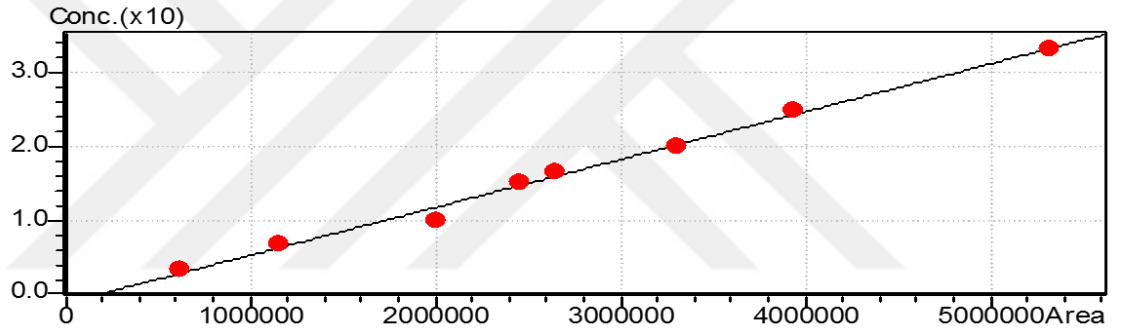
Uçucu yağ asiti analizi için gaz üretim metodunda oluşan fermentasyon ortamından 24. saat sonunda alınan rumen sıvısı örnekleri -20 °C dondurulmuştur. Analiz edileceği gün 5°C de çözdürülen rumen sıvısı örnekleri Erwin ve ark. (1961) belirttiği şekilde gaz kromatografi analizine hazırlanmıştır. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalında bulunan gaz kromatografi (GC) cihazında (Shimadzu® GC, Shimadzu Co., Kyoto, Japan), Nukol (30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 µm-24107) kolon ile rumen sıvısındaki asetik asit, propiyonik asit, izobütirik asit, bütirik asit, izovalerik asit ve valerik asit miktarları analiz edilmiştir. Analiz öncesi cihaz kalibrasyonu Supelco Volatile Free Acid Mix, 46975-U standardı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Uçucu yağ asidi kalibrasyon eğrisi

2.7. In-Vitro Rumen Fermentasyonu Sonucu Ortaya Çıkan Gazda Metan Tayini

Cam şırınga tipi inkübatörlerde oluşan gazdan inkübasyonun 6. ve 24. saatinde 10 ml gaz örneği alınarak gaz geçirmeyen özel şırınga yardımı ile Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalında bulunan gaz kromatografi (GC) cihazında (Shimadzu GC, Shimadzu Co., Kyoto, Japan), Carboxen-1006 PLOT, 30 m x 0.53 mm kolon ile analiz edilmiştir. Analiz öncesi kalibrasyon için Fluka metan standardı kullanılmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Metan kalibrasyon eğrisi.

2.8. Rumen Sıvısında pH Tayini

Gaz üretimi tekniği sonucu inkübasyonun 24. saatinde açığa çıkan rumen sıvısı numunelerinde pH değeri, pH metre (Ecomet pH/mV/TEMP Meter p25) ile belirlenmiştir.

2.9. Rumen Sıvısında Amonyak Azotu Tayini

Amonyak azotu (NH₃-N) için alınan rumen sıvıları 20 ml'lik kaplara alınmıştır. Rumen sıvısı örnekleri – 20 °C'de muhafaza edilmiştir. Analiz öncesinde +4°C 'de çözdürülen numunelerde NH₃-N yoğunluğu, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalında bulunan spektrofotometre (UV-1208, Shimadzu) kullanılarak indefenol mavisi yöntemi ile kolorimetrik olarak 546 nm'de dalga boyunda ölçülmüştür (McCullough, 1967).

2.10. İstatistik Analizler

Önemlilik testlerine geçilmeden önce veriler parametrik test varsayımları olan normallik varsayımı için Shapiro Wilk, varyansların homojenliği varsayımı yönünden ise Levene testi ile kontrol edildi. Her bir değişken için deneme grupları arası farkın istatistiksel açıdan anlamlılığına tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanarak kontrol edildi. Anlamlı bulunan gruplar arası farklılıklar için ileri aşama testi (post-hoc) olarak Tukey testinden yararlanıldı. Tüm sonuçlar için $p < 0.05$ istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirildi. İstatistiksel analizler için SPSS 14.01 paket programı kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1. Kullanılan Yemlerin Besin Madde Analizi

Araştırmada kullanılan yemlerin kuru madde, ham protein, ham yağ ve ham kül analizleri (AOAC, 2000) ile NDF, ADF ve ham selüloz analiz değerleri (Ankom Technology Corporation, Fairport, NY, USA) Çizelge 3.1’de verilmiştir (Van Soest ve ark. 1991).

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan yem maddelerinin analiz değerleri (%).

Sindirilebilirlik, %	Arpa	Saman
Kuru Madde	91.25	93.43
Ham Protein	13.25	3.96
Ham Selüloz	4.73	37.3
Ham Yağ	2.35	2.08
Ham Kül	2.66	7.59
NDF	26.34	71.65
ADF	8.39	47.33

3.2. Yem Maddelerinin *in-vitro* Sindirilebilirlikleri

3.2.1. *İn-Vitro* Gerçek Kuru Madde Sindirilebilirliği

Yem maddelerinin *in-vitro* ortamda polysorbate 80 ve eugenol gibi farklı katkı maddelerinin varlığında inkübasyona tabi tutulması ile şekillenen *in-vitro* gerçek kuru

madde sindirilebilirliği verileri çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan gruplar arasındaki fark *in-vitro* gerçek kuru madde sindirilebilirliği açısından istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.001$). Bu bağlamda K grubu % 68.36 ile en yüksek sindirilebilirlik değerine sahipken bu grubu S1 ve S2 grupları sırası ile % 64,53 ve % 65,55 sindirilebilirlik değerleri ile izlemektedir. Farklı dozlarda yalnızca sürfaktan içeren S1 ve S2 grupları arasında *in vitro* gerçek kuru madde sindirilebilirliği açısından bir fark tespit edilememiştir. Farklı dozlarda yalnızca eugenol içeren E3 ve E6 gruplarında gözlenen sindirilebilirlik değerleri S1 ve S2 gruplarından düşük olmakla birlikte eugenol dozuna bağlı sindirilebilirlikte şekillenen bir farklılık tespit edilememiştir. En düşük gerçek kuru madde sindirilebilirliği %57.90 ile M3 grubunda tespit edilmiştir ve bu grubun değeri E3, E6 ve M1 grupları ile benzerlik gösterirken M2 ve M4 gruplarından daha düşük bir değere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.2. Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının *in-vitro* gerçek kuru madde sindirilebilirliğine (%) etkisi.¹

Deneme Grupları	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$
K	40	68,36 ^a	0,83
S1 (0,5 µl/ml P)	40	64,53 ^{bc}	0,84
S2 (1 µl/ml P)	40	65,55 ^b	0,59
E3 (300 µg/ml E)	40	59,99 ^{def}	0,52
E6 (600 µg/ml E)	40	58,71 ^{ef}	0,39
M1 (0,5 µl/ml P + 300 µg/ml E)	20	58,69 ^{def}	0,54
M2 (1 µl/ml P + 600 µg/ml E)	20	61,67 ^{cde}	0,20
M3 (0,5 µl/ml P + 600 µg/ml E)	20	57,90 ^f	0,15
M4 (1 µl/ml P + 300 µg/ml E)	20	62,21 ^{cd}	0,22

a, b, c, d, e, f; Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0,001$)

¹ Değerler her bir gruptaki *in-vitro* gerçek kuru madde sindirilebilirlikleri ortalaması ($\bar{x}$) ve standart hatasını ($S\bar{x}$) göstermektedir.

P: Polysorbate 80, E: Eugenol

3.2.2. *In-vitro* Organik Madde Sindirilebilirliği

Yem maddelerinin *in-vitro* ortamda polysorbate 80 ve eugenol gibi farklı katkı maddelerinin varlığında inkübasyona tabi tutulması ile şekillenen *in-vitro* organik madde sindirilebilirliği verileri çizelge 3.3.'de gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan gruplar arasındaki fark *in-vitro* organik madde sindirilebilirliği açısından istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.001$). En yüksek organik madde sindirilebilirliği % 69.57 ile K grubunda gözlenmiştir. S1 ve S2 gruplarında organik madde sindirilebilirliği sırası ile % 65.74 ve % 66.65 olarak tespit edilmiştir, bu iki grup arasında organik madde sindirilebilirliği açısından istatistiki önem arz eden bir fark tespit edilememiştir. Yalnızca farklı dozlarda eugenol içeren gruplara (E3 ve E6) göre S1 ve S2 gruplarında daha yüksek *in vitro* organik madde sindirilebilirliği şekillenmiştir. En düşük *in-vitro* organik madde sindirilebilirliği % 59.27 ile M3 grubunda şekillenmiştir. M3 grubunda gözlenen organik madde sindirilebilirlik değeri ile E3, E6 ve M1 gruplarından elde edilen değerler birbirine benzer olarak şekillenmiştir.

Çizelge 3.3. Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının *in-vitro* organik madde sindirilebilirliğine (%) etkisi.¹

Deneme Grupları	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$
K	40	69,57 ^a	0,82
S1 (0,5 µl/ml P)	40	65,74 ^{bc}	0,80
S2 (1 µl/ml P)	40	66,65 ^b	0,56
E3 (300 µg/ml E)	40	61,29 ^{def}	0,51
E6 (600 µg/ml E)	40	60,10 ^{ef}	0,37
M1 (0,5 µl/ml P + 300 µg/ml E)	20	60,00 ^{ef}	0,52
M2 (1 µl/ml P + 600 µg/ml E)	20	62,84 ^{cde}	0,20
M3 (0,5 µl/ml P + 600 µg/ml E)	20	59,27 ^f	0,14
M4 (1 µl/ml P + 300 µg/ml E)	20	63,48 ^{cd}	0,22

a, b, c, d, e, f; Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0,001$);

¹ Değerler her bir grupta In-Vitro organik madde sindirilebilirlikleri ortalaması ($\bar{x}$) ve standart hatasını ($S\bar{x}$) göstermektedir.
P: Polysorbate 80, E: Eugenol

3.2.3. *In-vitro* NDF Sindirilebilirliği

Yem maddelerinin *in-vitro* ortamda polysorbate 80 ve eugenol gibi farklı katkı maddelerinin varlığında inkübasyona tabi tutulması ile şekillenen *in-vitro* NDF sindirilebilirliği verileri çizelge 3.4.'de gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan gruplar arasındaki fark *in-vitro* NDF sindirilebilirliği açısından istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.001$). En yüksek NDF sindirilebilirliği % 40,71 ile K grubunda gözlenmiştir. S1 ve S2 gruplarında NDF sindirilebilirliği sırası ile % 33,12 ve % 35,04 olarak tespit edilmiştir, bu iki grup arasında organik madde sindirilebilirliği açısından istatistiki önem arz eden bir fark tespit edilememiştir. M3 grubunda % 20,61 sindirilebilirlik değeri ile en düşük NDF sindirilebilirliği tespit edilmiştir. E6 ve M1 gruplarında da sırası ile % 22,14 ve % 20,73 düzeyinde NDF sindirilebilirliği tespit edilmiştir ve bu değerler M3 grubunda gözlenen değere benzerdir.

Çizelge 3.4. Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının *in-vitro* NDF sindirilebilirliğine (%) etkisi.¹

Deneme Grupları	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$
K	40	40,71 ^a	1,60
S1 (0,5 µl/ml P)	40	33,12 ^{bc}	1,57
S2 (1 µl/ml P)	40	35,04 ^b	1,10
E3 (300 µg/ml E)	40	28,28 ^d	0,94
E6 (600 µg/ml E)	40	22,14 ^{ef}	0,73
M1 (0,5 µl/ml P + 300 µg/ml E)	20	20,73 ^f	0,51
M2 (1 µl/ml P + 600 µg/ml E)	20	27,71 ^{cde}	0,38
M3 (0,5 µl/ml P + 600 µg/ml E)	20	20,61 ^f	0,27
M4 (1 µl/ml P + 300 µg/ml E)	20	28,75 ^{cd}	0,41

a, b, c, d, e, f: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0,001$)

¹ Değerler her bir grupta In-Vitro NDF sindirilebilirlikleri ortalaması ($\bar{x}$) ve standart hatasını ($S\bar{x}$) göstermektedir.

P: Polysorbate 80, E: Eugenol

3.3. Toplam Gaz Üretim Miktarı

Yem maddelerinin *in-vitro* olarak gaz üretim tekniğinde değerlendirilmesinde Polysorbate 80 ve Eugenol katkılarının her bir gram yem kuru maddesi sindirimi sonucu açığa çıkardığı toplam net gaz miktarına etkileri çizelge 3.5.'de gösterilmektedir. Çalışmada kullanılan gruplar arasında toplam gaz üretimi miktarında gözlenen fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$). En yüksek gaz miktarları K ve S2 gruplarında sırası ile 282,50 ve 236,67 ml olarak şekillenmiştir. En düşük değer 17,5 ml ile M2 grubunda gözlenmiştir. M2 grubunda gözlenen değer ile E6, M3 ve M4 gruplarında gözlenen değerler arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır. E6, M3 ve M4 gruplarında gözlenen toplam gaz üretimi sırası ile 72,5 ml, 37,5 ml ve 42,5 ml olarak şekillenmiştir.

Çizelge 3.5. Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının her bir gram yem kuru maddesinin *in-vitro* fermentasyonu sonucu 24. saatte açığa çıkardığı toplam net gaz miktarına (ml) etkisi.¹

Deneme Grupları	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$
K	4	282,50 ^a	11,09
S1 (0,5 µl/ml P)	4	225,00 ^b	15,00
S2 (1 µl/ml P)	4	236,67 ^{ab}	16,67
E3 (300 µg/ml E)	4	160,00 ^c	14,72
E6 (600 µg/ml E)	4	72,50 ^d	17,50
M1 (0,5 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	132,50 ^c	7,50
M2 (1 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	17,50 ^d	6,29
M3 (0,5 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	37,50 ^d	2,50
M4 (1 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	42,50 ^d	8,54

a, b, c, d ; Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0,001$)

¹ Değerler her bir grupta bir gram yem kuru maddesinin In-Vitro fermentasyonu sonucu 24. saatte açığa çıkan toplam net gaz miktarı (ml) ortalaması ($\bar{x}$) ve standart hatasını ($S\bar{x}$) göstermektedir.

P: Polysorbate 80, E: Eugenol

3.4. Altıncı Saat Gaz Metan Yoğunluğu

In-vitro gaz üretim metodu ile üretilen gazın inkübasyonun 6. saatinde ölçülen metan yoğunluğuna ait değerler çizelge 3.6.'de gösterilmektedir. Gruplar arasında farklılık gözlenmektedir ($p=0.004$). S1 grubunda 6. saatte gazda gözlenen metan yoğunluğu % 21,90 ile en yüksek değeri oluşturmaktadır. M2 grubunda ve E3 grubunda gözlenen 6. saat metan yoğunluğu sırası ile % 16,68 ve % 18,02 olarak gözlenmiş ve bu değerler S1 grubunda elde edilen değerden daha az bulunmuştur. Diğer gruplar arasında gözlenen 6. saat metan gazı yoğunlukları birbirine benzer seviyelerde şekillenmiştir.

Çizelge 3.6. Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının *in-vitro* gaz üretim metodu ile üretilen gazın inkübasyonun 6. saatinde ölçülen metan yoğunluğuna (%) etkisi ¹

Deneme Grupları	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$
K	4	19,29 ^{ab}	0,19
S1 (0,5 µl/ml P)	4	21,90 ^a	0,32
S2 (1 µl/ml P)	4	19,65 ^{ab}	0,82
E3 (300 µg/ml E)	4	18,02 ^b	0,50
E6 (600 µg/ml E)	4	18,16 ^{ab}	0,54
M1 (0,5 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	20,42 ^{ab}	1,52
M2 (1 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	16,68 ^b	0,74
M3 (0,5 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	19,94 ^{ab}	1,00
M4 (1 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	20,46 ^{ab}	0,71

a, b ; Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($P = 0,004$)

¹ Değerler her bir grupta *In-Vitro* gaz üretim metodu ile üretilen gazın inkübasyonun 6. saatinde ölçülen metan yoğunluğu ortalaması ($\bar{x}$) ve standart hatasını ($S\bar{x}$) göstermektedir.

P: Polysorbate 80, E: Eugenol

3.5. Altıncı ve Yirmi Dördüncü Saat Arası Gaz Metan Yoğunluğu

In-vitro gaz üretim metodu ile üretilen gazın inkübasyonun 6-24. saatinde ölçülen metan yoğunluğuna ait değerler çizelge 3.7’de gösterilmektedir. Gruplar arasında farklılık gözlenmiştir ($p<0.001$). İnkübasyonun 6-24. Saat arasında ölçülen en düşük metan yoğunluğu % 17,24 ile E6 grubunda gözlenmiştir. En yüksek metan yoğunluğu % 26,66 ile M4 grubunda gözlenmiştir ve bu grupta tespit edilen değer S2, E3, M1, M2 ve M3 grubunda gözlenen değerlere benzerlik göstermektedir. K grubunda gözlenen metan yoğunluğu % 22,30 seviyesindedir ve S1, S2, M2 ve M3 gruplarında belirlenen değerler de bu seviyeye yakındır.

Çizelge 3.7. Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının *in-vitro* gaz üretim metodu ile üretilen gazın inkübasyonun 6-24. saatinde ölçülen metan yoğunluğuna (%) etkisi¹

Deneme Grupları	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$
K	4	22,30 ^{bc}	0,83
S1 (0,5 µl/ml P)	4	21,52 ^c	0,76
S2 (1 µl/ml P)	4	23,13 ^{abc}	1,12
E3 (300 µg/ml E)	4	25,40 ^{ab}	0,06
E6 (600 µg/ml E)	4	17,24 ^d	0,35
M1 (0,5 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	25,74 ^{ab}	0,63
M2 (1 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	23,70 ^{abc}	1,08
M3 (0,5 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	23,65 ^{abc}	1,14
M4 (1 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	26,66 ^a	0,36

a, b, c ; Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0,001$)

¹ Değerler her bir grupta In-Vitro gaz üretim metodu ile üretilen gazın inkübasyonun 6-24. saatinde ölçülen metan yoğunluğu ortalaması ($\bar{x}$) ve standart hatasını ($S\bar{x}$) göstermektedir.

P: Polysorbate 80, E: Eugenol

3.6. Toplam Net Metan Gazı Üretim Miktarı

İn-vitro gaz üretim metodu ile inkübasyonun 24. saatinde hesaplanan, her bir gram yem kuru maddesinin fermentasyonu için üretilen toplam net metan gazı miktarı çizelge 3.8.'de gösterilmektedir. Gruplar arasında farklılık gözlenmektedir ($p < 0.001$). Her bir gram yem kuru maddesinin sindirimi için üretilen metan gazı miktarı en yüksek K grubunda 65,01 ml olarak tespit edilmiştir ve belirlenen bu miktar S1 ve S2 gruplarında elde edilen seviyeye benzerlik göstermektedir. S1 ve S2 gruplarında her bir gram yem kuru maddesinin sindirimi için ortaya çıkan metan gazı miktarı sırası ile 58,59 ml ve 58,95 ml olarak belirlenmiş ve bu gruplar arasında bir fark tespit edilememiştir. Her bir gram yemin fermentasyonu için üretilen metan seviyesi en düşük olarak 4,11 ml ile M2 grubunda tespit edilmiştir ve bu grupta ölçülen değer ile E6, M3 ve M4 gruplarında ölçülen değerler arasında istatistiki bir fark bulunamamıştır.

Çizelge 3.8. Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının Fermentasyonun 24. saatinde her gram yem fermentasyonu için ortaya çıkan toplam net metan gazı üretimine (ml) etkisi

Deneme Grupları	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$
K	4	65,01 ^a	3,44
S1 (0,5 µl/ml P)	4	58,59 ^a	3,51
S2 (1 µl/ml P)	4	58,95 ^a	5,47
E3 (300 µg/ml E)	4	40,77 ^b	3,84
E6 (600 µg/ml E)	4	12,85 ^c	3,25
M1 (0,5 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	41,85 ^b	4,10
M2 (1 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	4,11 ^c	2,06
M3 (0,5 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	15,39 ^c	1,74
M4 (1 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	20,18 ^c	2,61

a, b, c ; Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0,001$)

¹ Değerler her bir grupta *In-Vitro* gaz üretim metodu ile 24. saatinde her gram yem fermentasyonu için ortaya çıkan toplam net metan gazı ortalaması ($\bar{x}$) ve standart hatasını ($S\bar{x}$) göstermektedir.

P: Polysorbate 80, E: Eugenol

3.7. Rumen Sıvısı Uçucu Yağ Asiti Yoğunluğu

3.7.1. Asetik Asit Yoğunluğu

Fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan asetik asit yoğunluğu çizelge 3.9.'da gösterilmektedir. Gruplar arasında farklılık gözlenmektedir ($p < 0.001$). En düşük asetik asit yoğunluğu 37,15 mmol/l ile E6 grubunda gözlenmiştir ve bu değer E3 grubunda gözlenen 47,66 mmol/l değerine benzerdir. Asetik asitin en yüksek gözleendiği grup 62,55 mmol/l ile S1 grubudur ve bu değer S2 ve K gruplarında sırası ile gözlenen 60,20 mmol/l ve 59,46 mmol/l değerlerine benzerlik göstermektedir. M1, M2, M3 ve M4 gruplarında gözlenen asetik asit yoğunluğu değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark tespit edilememiştir.

Çizelge 3.9. Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının Fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan asetik asit yoğunluğuna (mmol/l) etkileri ¹

Deneme Grupları	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$
K	4	59,46 ^a	1,31
S1 (0,5 µl/ml P)	4	62,55 ^a	1,71
S2 (1 µl/ml P)	4	60,20 ^a	2,04
E3 (300 µg/ml E)	4	47,66 ^{bc}	4,05
E6 (600 µg/ml E)	4	37,15 ^c	1,87
M1 (0,5 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	53,99 ^{ab}	3,41
M2 (1 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	54,29 ^{ab}	1,61
M3 (0,5 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	52,33 ^{ab}	1,35
M4 (1 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	52,91 ^{ab}	2,82

a, b, c ; Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0,001$)

¹ Değerler her bir grupta fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan asetik asit yoğunluğu ortalaması ($\bar{x}$) ve standart hatasını ($S\bar{x}$) göstermektedir.

P: Polysorbate 80, E: Eugenol

3.7.2. Propiyonik Asit Yoğunluğu

Fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan propiyonik asit yoğunluğu çizelge 3.10'da gösterilmektedir. Gruplar arasında farklılık gözlenmektedir ($p < 0.001$). En düşük propiyonik asit yoğunluğu 12,55 mmol/l ile E6 grubunda gözlenmektedir. En yüksek propiyonik asit yoğunluğu 22,78 mmol/l ile S1 grubunda gözlenirken bu grup ile K, S2, E3, M1, M2, M3 ve M4 grupları arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır.

Çizelge 3.10. Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının Fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan propiyonik asit yoğunluğuna (mmol/l) etkileri ¹

Deneme Grupları	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$
K	4	22,34 ^a	0,25
S1 (0,5 µl/ml P)	4	22,78 ^a	0,74
S2 (1 µl/ml P)	4	22,36 ^a	0,30
E3 (300 µg/ml E)	4	18,34 ^a	1,36
E6 (600 µg/ml E)	4	12,55 ^b	1,54
M1 (0,5 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	21,14 ^a	0,99
M2 (1 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	17,67 ^{ab}	2,56
M3 (0,5 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	18,57 ^a	0,64
M4 (1 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	22,01 ^a	0,54

a, b, c ; Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0,001$)

¹ Değerler her bir grupta fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan propiyonik asit yoğunluğu ortalaması ($\bar{x}$) ve standart hatasını ($S\bar{x}$) göstermektedir.

P: Polysorbate 80, E: Eugenol

3.7.3. Bütirik Asit Yoğunluğu

Fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan bütirik asit yoğunluğu değerleri çizelge 3.11.'de gösterilmektedir. Gruplar arasında farklılık

gözlenmektedir ($p=0.01$). En düşük bütirik asit yoğunluğu 12,05 mmol/l ile E3 grubunda gözlenmiştir, bu gruptan elde edilen değer K, S1, S2, E6, M1, M2 ve M3 değerlerine benzerlik göstermektedir. M4 grubunda gözlenen 17,99 mmol/l bütirik asit yoğunluğu istatistiksel olarak E3 grubunda gözlenen değerden daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Diğer gruplar arasında istatistiksel anlamda bir farklılık tespit edilememiştir.

Çizelge 3.11. Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının Fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan bütirik asit yoğunluğuna (mmol/l) etkileri ¹

Deneme Grupları	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$
K	4	16,98 ^{ab}	0,08
S1 (0,5 µl/ml P)	4	16,50 ^{ab}	0,63
S2 (1 µl/ml P)	4	16,38 ^{ab}	0,71
E3 (300 µg/ml E)	4	12,05 ^b	2,79
E6 (600 µg/ml E)	4	12,88 ^{ab}	0,82
M1 (0,5 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	17,06 ^{ab}	0,96
M2 (1 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	17,48 ^{ab}	1,42
M3 (0,5 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	17,59 ^{ab}	0,51
M4 (1 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	17,99 ^a	0,16

a, b, c ; Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($P = 0,01$)

¹ Değerler her bir grupta fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan bütirik asit yoğunluğu ortalaması ($\bar{x}$) ve standart hatasını ($S\bar{x}$) göstermektedir.

P: Polysorbate 80, E: Eugenol

3.7.4. Toplam Uçucu Yağ Asidi Yoğunluğu

Fermentasyonun 24. Saatinde fermentasyon ortamında bulunan toplam uçucu yağ asidi yoğunluğu çizelge 3.12’de gösterilmektedir. Gruplar arasında istatistiki açıdan fark tespit edilmiştir ($p<0.001$). En düşük toplam uçucu yağ asidi yoğunluğu 68,75 mmol/l ile E6 grubunda gözlenmiştir. E3 grubunda toplam uçucu yağ asiti yoğunluğu 88,78 mmol/l olarak tespit edilmiştir ve bu değer ile E6 grubunda tespit edilen değer ile arasında istatistiksel anlamda bir fark tespit edilememiştir. En yüksek

toplam uçucu yağ asidi yoğunluğu 110,13 mmol/l ile S1 grubunda tespit edilmiştir. S1 grubunda tespit edilen değer ile K, S2, M1, M2, M3 ve M4 grupları arasında tespit edilen değerler arasında istatistiksel anlamda bir farklılık bulunamamıştır.

Çizelge 3.12. Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının Fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan toplam uçucu yağ asidi yoğunluğuna (mmol/l) etkileri ¹

Deneme Grupları	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$
K	4	107,23 ^{ab}	1,05
S1 (0,5 µl/ml P)	4	110,13 ^a	3,23
S2 (1 µl/ml P)	4	107,34 ^{ab}	3,01
E3 (300 µg/ml E)	4	88,78 ^{bc}	7,56
E6 (600 µg/ml E)	4	68,75 ^c	2,24
M1 (0,5 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	100,41 ^{ab}	5,53
M2 (1 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	98,30 ^{ab}	6,11
M3 (0,5 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	98,23 ^{ab}	2,86
M4 (1 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	102,29 ^{ab}	3,41

a, b, c ; Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (P < 0,001)

¹ Değerler her bir grupta fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan toplam uçucu yağ asidi yoğunluğu ortalaması ($\bar{x}$) ve standart hatasını ($S\bar{x}$) göstermektedir.

P: Polysorbate 80, E: Eugenol

3.7.5. Asetik Asit : Propiyonik Asit Oranı

Fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan asetik asidin, propiyonik aside olan oranı çizelge 3.13.'de gösterilmektedir. Gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark tespit edilememiştir (p=0.437). Ancak M2 değerinde 3,34 ile sayısal anlamda en yüksek değer tespit edilirken M4 grubunda 2,40 ile sayısal olarak en düşük değer tespit edilmiştir.

Çizelge 3.13. Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının Fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamındaki Asetik asit : Propiyonik asit oranına etkileri ¹

Deneme Grupları	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$
K	4	2,66	0,08
S1 (0,5 µl/ml P)	4	2,75	0,05
S2 (1 µl/ml P)	4	2,69	0,07
E3 (300 µg/ml E)	4	2,60	0,10
E6 (600 µg/ml E)	4	3,16	0,59
M1 (0,5 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	2,55	0,08
M2 (1 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	3,34	0,62
M3 (0,5 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	2,82	0,04
M4 (1 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	2,40	0,08

a, b, c ; Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (P = 0.437)

¹ Değerler her bir grupta fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamındaki Asetik asit : Propiyonik asit oranı ortalaması ($\bar{x}$) ve standart hatasını ($S\bar{x}$) göstermektedir.

P: Polysorbate 80, E: Eugenol

3.8. Rumen Sıvısı Amonyak Azotu Yoğunluğu

Fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan amonyak azotu yoğunluğu değerleri çizelge 3.14.'de gösterilmektedir. Gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmiştir ($p < 0.001$). En düşük amonyak azotu yoğunluğu 18,92 mmol/l ile E6 grubunda gözlenmiştir. Gruplar arasında en yüksek amonyak azotu yoğunluğu S2 grubunda 29,64 mmol/l seviyelerinde gözlenmesine karşın elde edilen bu değer K, S1, E3, M1, M2, M3 ve M4 gruplarında elde edilen değerlerden farklı değildir.

Çizelge 3.14. Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının Fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamında bulunan amonyak azotu (NH₃-N) yoğunluğuna (mmol/l) etkileri ¹

Deneme Grupları	n	$\bar{x}$	S $\bar{x}$
K	4	29,14 ^a	0,64
S1 (0,5 µl/ml P)	4	29,54 ^a	0,31
S2 (1 µl/ml P)	4	29,64 ^a	0,87
E3 (300 µg/ml E)	4	26,78 ^a	1,12
E6 (600 µg/ml E)	4	18,92 ^b	0,33
M1 (0,5 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	29,21 ^a	0,80
M2 (1 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	27,92 ^a	0,50
M3 (0,5 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	27,57 ^a	0,45
M4 (1 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	28,73 ^a	1,60

a, b, c ; Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (P < 0,001)

¹ Değerler her bir grupta fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamındaki ortamında bulunan amonyak azotu (NH₃-N) yoğunluğu ortalaması ($\bar{x}$) ve standart hatasını (S $\bar{x}$) göstermektedir.

P: Polysorbate 80, E: Eugenol

3.9. Rumen Sıvısı pH Değeri

Fermentasyonun 24. Saatinde fermentasyon ortamında ölçülen pH değerleri çizelge 3.15.'de gösterilmektedir. Gruplar arasında istatistiksel olarak fark tespit edilmiştir (p<0.001). En düşük pH değeri 6,15 ile S1 grubunda gözlenmiştir. S2 ve E3 gruplarında pH değeri sırası ile 6,18 ve 6,16 seviyesinde şekillenmiştir, gözlenen bu değerler ile S1 grubunda gözlenen değer arasında istatistiksel farklılık bulunmamaktadır. K, S2, E6, M1, M2, M3 ve M4 grupları arasında pH değerleri açısından bir fark tespit edilememiştir.

Çizelge 3.15. Farklı dozlardaki Polysorbate 80 ve Eugenol ile karışımlarının Fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamı pH'sına etkileri¹

Deneme Grupları	n	$\bar{x}$	$S\bar{x}$
K	4	6,22 ^{ab}	0,02
S1 (0,5 µl/ml P)	4	6,15 ^c	0,00
S2 (1 µl/ml P)	4	6,18 ^{abc}	0,01
E3 (300 µg/ml E)	4	6,16 ^{bc}	0,02
E6 (600 µg/ml E)	4	6,23 ^a	0,00
M1 (0,5 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	6,19 ^{abc}	0,01
M2 (1 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	6,23 ^a	0,02
M3 (0,5 µl/ml P + 600 µg/ml E)	4	6,23 ^a	0,00
M4 (1 µl/ml P + 300 µg/ml E)	4	6,22 ^{ab}	0,00

a, b, c ; Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0,001$)

¹ Değerler her bir grupta fermentasyonun 24. saatinde fermentasyon ortamını pH ortalaması ($\bar{x}$) ve standart hatasını ($S\bar{x}$) göstermektedir.

P: Polysorbate 80, E: Eugenol

4. TARTIŞMA

4.1. Yem Maddelerinin *in-vitro* Sindirilebilirlikleri

Gerçekleştirilen çalışmada esansiyel yağ olan eugenol ve bir sürfaktan olan Polysorbate 80'in farklı dozlarda tek başlarına ve kombinasyonları halinde *in-vitro* gerçek kuru madde sindirilebilirliğine olan etkileri değerlendirilmiştir. Eugenolün tek başına uygulandığı E3 ve E6 gruplarında *in-vitro* gerçek kuru madde sindirilebilirliğinde kontrol grubuna göre düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$).

Benchaar ve ark. (2007) eugenol içeriği açısından yüksek olduğu bilinen tarçın yaprağı yağı, karanfil yaprağı yağı ve limonen açısından zengin olduğu bilenen portakal yağı ile eugenol, karvakrol, sinemaldehit ve timol gibi esansiyel yağların *in-vitro* olarak gerçek kuru madde sindirilebilirliğine olan etkilerini değerlendirmiştir. Çalışmada kullanılan bitkisel ekstrakt ve esansiyel yağların birçoğu *in-vitro* gerçek kuru madde sindirilebilirliğini sayısal olarak baskılayıcı yönde bir etki göstermiştir ancak yalnızca 800 mg/l dozunda uygulanan eugenol ve 400 mg/l dozunda uygulanan karvakrolün baskılayıcı etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

In-vitro rumen simülasyon sisteminin deneme metodu olarak kullanıldığı bir başka çalışmada ise eugenol açısından zenginliği ile bilinen tarçın yaprağı yağının 500 mg/l dozda kullanımının gerçek kuru madde sindirilebilirliğini arpa silajı ve konsantre yem üzerinde önemli ölçüde baskıladığı gözlenmiştir (Fraser ve ark., 2007). Castillejos ve ark. (2006) farklı dozlardaki timol ve eugenolün *in-vitro* ruminal simülasyon tekniği ile yemlerin kuru madde sindirilebilirliği üzerine olan etkilerini değerlendirmiştir. Çalışmamızda elde edilen bulgulara ve diğer araştırmacıların (Benchaar ve ark., 2007;

Jahani-Azizabadi ve ark., 2011) bulgularının tersine eugenolün *in-vitro* kuru madde sindirilebilirliğini etkilemediğini ancak timolün 500 mg/l dozda *in-vitro* kuru madde sindirilebilirliğini baskıladığını ortaya konulmuştur (Castillejos ve ark., 2006).

Jahani-Azizabadi ve ark. (2011) esansiyel yağlarca zengin çeşitli bitkilerin yağlarının *in-vitro* rumen sindirilebilirliği üzerine etkilerini değerlendirmiştir. Eugenol açısından zengin olduğu bilinen karanfil yağının 1 µl/ml dozda fermentasyon ortamına eklenmesinin kuru madde yıkımlanabilirliğini %70 seviyesinden %34 seviyelerine düşürüştüğü tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Nanon ve ark. (2014) limonotu yağı ve sarımsak yağı kombinasyonu ile zencefil yağı karışımının farklı yem maddeleri üzerinde *in-vitro* kuru madde sindirilebilirliğine olan etkilerini değerlendirmiştir. Her iki esansiyel yağ kaynağının da farklı yem substratları üzerinde fermentasyon sonu kuru madde sindirilebilirliğini arttırdığı gözlenmiştir. Çalışmamızda eugenolden elde edilen etkinin tersine farklı esansiyel yağların *in-vitro* kuru madde sindirilebilirliğini destekleyebileceği de anlaşılmaktadır.

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada Polysorbate 80'in eşit miktarlarda kaba ve konsantre yem içeren yem substratının *in-vitro* fermentasyonu üzerine etkilerinin değerlendirilmesi ile Polysorbate 80'in gerçek kuru madde sindirilebilirliğini düşürdüğü gözlenmektedir. Cong ve ark. (2009) farklı iyonik yapıda olmayan sürfaktanların *in-vitro* olarak çeşitli kaba yem kaynakları üzerine etkilerini değerlendirmiştir. Polysorbate 80'in genel olarak farklı saman tiplerine % 0,02, % 0,05 ve % 0,1 dozlarında eklenmesinin kuru madde sindirilebilirliğini mısır sapı hariç arttırdığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar gözlenen bu etkinin substrata bağlı olarak değişebileceğini ortaya çıkartmıştır (Cong ve ark., 2009).

Baah ve ark. (2005) gerçekleştirdikleri çalışmada % 0,2 dozundaki polysorbate 80'in çayır otu ve arpanın *in-situ* rumen sindirilebilirliğine olan etkilerini değerlendirmiştir. Yapılan araştırmada % 0,2 seviyesinde polysorbate 80 ile muamele edilen çayır kuru otunun kuru madde etkin yıkımlanma hızında kontrol grubuna göre yavaşlama şekillenmiştir. Arpa tanesinin kuru madde etkin yıkımlanma hızında sayısal yavaşlama şekillense de etki istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$).

Lee ve ark. (2007) gerçekleştirdikleri *in-situ* çalışmada polysorbate 80'in pirinç samanına % 0,1, % 0,5 ve % 1 dozlarında uygulanmasının pirinç samanının *in-situ* kuru madde sindirilebilirliğine olan etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar % 0,1 dozunda uygulanan polysorbate 80'in *in-situ* kuru madde sindirilebilirliğini arttırdığını ancak bu etkinin oldukça sınırlı olduğunu ortaya koymuştur. Yine uygulama dozunun da polysorbate 80'in sindirilebilirliğe olan etkisinde önemli bir faktör olduğu bu çalışmada bildirilmektedir.

Goto ve ark. (2003a) gerçekleştirdikleri çalışmada vejetasyonun farklı dönemindeki domuz ayrığı (*Dactylis glomerata L.*) otunun farklı kısımlarının *in-vitro* sindirilebilirliği üzerine polysorbate 80'in etkisi değerlendirilmiştir. Bitkinin erken vejetasyon döneminde elden edilen yaprakların % 0,005 seviyesinde polysorbate 80 varlığında *in-vitro* kuru madde sindirilebilirliğini arttırmıştır. Bitkinin geç vejetasyon dönemindeki yapraklarında ise *in-vitro* kuru madde sindirilebilirliğindeki artış % 0,01 seviyesindeki polysorbate 80 ile mümkün olmuştur. Araştırmacılar bu çalışmada kullanılan yem substratının yapısının ve sürfaktan dozunun *in-vitro* kuru madde sindirilebilirliği üzerine etkili olduğunu bildirmişlerdir.

McAllister ve ark. (2000) gerçekleştirdikleri *in-situ* çalışmada polysorbate 80'in hem kaba yemlerde hem de konsantre yemlerde % 0,05 seviyesinde uygulanmasının etkilerini değerlendirmiştir. Bu çalışmaya göre polysorbate 80'in konsantre yemlerde

kuru madde sindirilebilirliğini etkilemediği, kaba yem ile beslenen hayvanlarda ADF sindirilebilirliğini düşürdüğünü bildirilmiştir.

Chen ve ark. (2011) gerçekleştirdikleri *in-situ* çalışmada hayvan başına günde 10 g sağlanan farklı sürfaktanların rumen yem sindirilebilirlikleri üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan seviyede Polysorbate 80'in ruminal kuru madde sindirilebilirliğine etki etmediği bildirilmiştir. Araştırmacılar belirtilen sürfaktanın organik madde sindirilebilirliği üzerinde de bir etkisini tespit edememişlerdir.

Kim ve ark. (2005) inekler için oluşturulmuş bir rasyona % 1 ve % 2 seviyesinde Polysorbate 80 eklenmesinin *in-vitro* rumen kuru madde sindirilebilirliğine etkisini değerlendirmiştir. Araştırmacılar yemin kuru maddesine % 1 seviyesinde polysorbate 80 uygulamasında sayısal anlamda *in-vitro* kuru madde sindirilebilirliğinde bir baskılanma oluşturduğunu gözlemiş ancak bu değişimin istatistiksel olarak önemli bulunmadığı bildirilmiştir.

Hwang ve ark. (2008) gerçekleştirdikleri *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmada polysorbate 80 ve selülitik enzim kombinasyonlarının yem maddelerinin kuru madde sindirilebilirliğine olan etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışmanın *in-vitro* kısmında % 2,5 polysorbate 80 ile 5 U ksilanaz ve 5 U selülaaz enzim karışımının en yüksek kuru madde sindirilebilirlik değerini verdiği bildirilmiştir. Çalışmanın *in-vivo* kısmında da kullanılan polysorbate 80 ve enzim kombinasyonu kuru madde ve NDF sindirilebilirliğini arttırmıştır.

Yapılan çalışmalarda genellikle polysorbate 80'in *in-vitro* gerçek kuru madde sindirilebilirliğine olan etkisi kaba yemler üzerinde değerlendirilmiş ve bu substratların *in-vitro* sindirilebilirliğinde bir artış gözlenmiştir (Cong ve ark. 2009; Lee

ve ark., 2007). Polysorbate 80'in konsantre yem ve kaba yem karışımlarının *in-vitro* kuru madde sindirilebilirliğine etkisi değerlendirildiğinde farklı sonuçlar görülmektedir (Kim ve ark., 2005). Konsantre yemleri içeren substratlar ile gerçekleştirilen *in-situ* çalışmalar da kuru madde sindirilebilirliğinde bir değişme olmadığı ya da baskılandığı yönünde sonuçlar ortaya çıkarmıştır (Baah ve ark., 2005; Chen ve ark., 2011). Yapılan farklı çalışmaların sonuçları polysorbate 80'in kuru madde sindirilebilirliği üzerine olan etkisinin uygulanan substrata göre değişebileceğini göstermektedir.

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada eugenolün *in-vitro* NDF sindirilebilirliğine olan etkileri değerlendirilmiştir. Eugenol *in-vitro* NDF sindirilebilirliğini baskılamıştır. Benchaar ve ark. (2007) eugenol içeriği açısından yüksek olduğu bilenen tarçın yaprağı yağı, karanfil yaprağı yağı ve limonen açısından zengin olduğu bilenen portakal yağı ile eugenol, karvakrol, sinemaldehit ve timol gibi esansiyel yağların *in-vitro* olarak NDF sindirilebilirliğine olan etkileri değerlendirmiştir. Çalışmada kullanılan bitki ekstraktı ve esansiyel yağların hepsi *in-vitro* NDF sindirilebilirliğini düşürmüştür ve en yüksek baskılayıcı etki 800 mg/l dozunda uygulanan eugenol ile gözlenmiştir. *In-vitro* NDF sindirilebilirliğinde ortaya çıkan baskılanma genel olarak yarı saf fenolik bileşikler (Fraser ve ark., 2007) veya saf fenolik bileşikler (Castillejos ve ark., 2006) ile gerçekleştirilen çalışmalarda gözlenmiştir.

Rofiq ve Görgülü (2014) limonen açısından zengin portakal kabuğu yağı ve eugenol açısından zengin karanfil yağının *in-vitro* yem sindirilebilirliği üzerine etkilerini değerlendirdiği çalışmada *in-vitro* NDF sindirilebilirliğinin her iki esansiyel yağ uygulaması ile de baskılandığını bildirmiştir. Genel olarak NDF sindirilebilirliğinde gözlenen bu düşüş, fibrolitik bakterilerin esansiyel yağlara duyarlı olması ile açıklanmaktadır. Kamalak ve ark. (2011) portakal (*Citrus Sinensis* L.) yağının *in-vitro* NDF sindirilebilirliğini 100 mg/l ile 1 200 mg/l doz aralığında baskıladığını bildirmiştir. Nanon ve ark. (2014) limonotu yağı ve sarımsak ile zencefil

yağı karışımının farklı yem maddeleri üzerinde *in-vitro* NDF sindirilebilirliğini arttırıcı etkisinin bulunduğunu ortaya koymuştur.

Besi sığırlarında *in-vivo* olarak gerçekleştirilen çalışmada hayvan başına günlük 400 mg, 800 mg ve 1600 mg dozunda yem ile top dress olarak verilen eugenolün NDF sindirilebilirliğini lineer etki ile baskıladığı bildirilmiştir (Yang ve ark., 2010).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada polysorbate 80'in de *in-vitro* NDF sindirilebilirliğini baskılayıcı etkisi gözlenmiştir. Kim ve ark. (2004) gerçekleştirdikleri çalışmada polysorbate 80'in NDF ve ADF sindirilebilirliklerinin etkilenmediğini ortaya koymuştur. Kamandee ve ark. (1999) gerçekleştirdikleri *in-vitro* çalışmada polysorbate 80'in selüloz yıkımlanabilirliğini arttırdığını bildirmişlerdir. Baah ve ark. (2005) çalışmalarında arpa'nın polysorbate 80 uygulaması ile yıkımlanma hızında ve arpa NDF sindirilebilirliğinde düşüş şekillendiğini bildirmişlerdir. Benzer substratın kullanıldığı çalışmamızda da elde edilen sonuçlar uyum göstermektedir. Bahsedilen çalışmada araştırmacılar arpada gözlenen bu etkinin asidozun önlenmesi yönünde değerlendirilebileceği fikrini ortaya sunmuşlardır.

Polysorbate 80 *in-vitro* organik madde sindirilebilirliğini baskılayıcı yönde etki gösterdiği tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen bir *in-vivo* çalışmada polysorbate 80'in de aralarında bulunduğu farklı iyonik olmayan sürfaktanların organik madde sindirilebilirliğini etkilemediğini ortaya koymuştur (Chen ve ark., 2011). Benzer bulgular bir başka *in-vivo* çalışmada da elde edilmiştir (McAllister ve ark., 2000).

Kamalak ve ark. (2011) gerçekleştirdikleri çalışmada farklı dozlardaki portakal (*Citrus Sinensis* L.) yağının *in-vitro* organik madde sindirilebilirliğine olan etkisini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar 100 mg/l dozda başlayarak 1200 mg/l doza kadar

arttırdıkları portakal yağının *in-vitro* organik madde sindirilebilirliğini baskıladığını bildirmişlerdir.

Besi sığırlarında *in-vivo* olarak gerçekleştirilen çalışmada hayvan başına günlük 400 mg, 800 mg ve 1600 mg dozunda yem ile top dress olarak verilen eugenolün organik madde sindirilebilirliğini etkilemediği bildirilmiştir (Yang ve ark., 2010).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada eugenol ile polysorbate 80 kombinasyonlarının gerçek kuru madde sindirilebilirliğini önemli oranlarda baskıladığı gözlenmektedir. Gruplar içerisinde en düşük gerçek kuru madde sindirilebilirliği 0,5 µl/ml polysorbate 80 ve 600 µg/ml eugenol kombinasyonunu içeren M3 grubunda gözlenmiştir.

Eugenol gibi fenolik özellikteki bitkisel esansiyel yağlar içerdikleri hidroksil grubu nedeni ile yüksek antimikrobiyel aktiviteye sahiptirler (Burt, 2004; Dorman ve Dean, 2000). Çalışmada eugenolün genel olarak yem maddelerinin *in-vitro* rumen yıkımlanabilirliklerini baskılayıcı etkisi bu maddenin antimikrobiyel aktivitesi ile ilişkilendirilmektedir.

Yem sindirilebilirliğinde oluşacak bir baskılanma hayvan verimliliği açısından negatif sonuçlar doğurabilecektir. Elde edilen bulgular çalışmada kullanılan eugenol seviyelerinin geniş etkili bir anti-mikrobiyel etkiye neden olduğunu ve genel fermentasyon işlemlerinin baskılandığını ortaya koymaktadır.

4.2. Toplam Gaz Üretimi

In-vitro ortamda polysorbate 80 ve eugenolün ayrı ayrı ve karışımları halinde her bir gram yem kuru maddesi için fermentasyon sonucu açığa çıkan net gaz miktarına etkisi değerlendirilmiştir.

Çeşitli esansiyel yağların *in-vitro* rumen gazı üretimi etkisi üzerine çeşitli araştırmalar mevcuttur. Araujo ve ark. (2011) çalışmamızdaki E6 grubunda kullanılan eugenol miktarından biraz daha yüksek eugenol yoğunluğu ile (666 µg/ml) gerçekleştirdikleri çalışmada toplam gaz üretiminde kontrol grubuna göre düşüş şekillendiğini bildirmiştir. Aynı etkiyi antimikrobiyel etkisi bilinen karvakrol ve monensin için de aynı çalışmada gözlemişlerdir. Benchaar ve ark. (2007) eugenol içeriği açısından yüksek olduğu bilenen tarçın yaprağı yağı, karanfil yaprağı yağı ve limonen açısından zengin olduğu bilenen portakal yağı ile eugenol, karvakrol, sinemaldehit ve timol gibi esansiyel yağların *in-vitro* gaz üretimine etkisini değerlendirmiştir. Her bir gram yem substratının fermentasyonu sonucunda açığa çıkan gaz miktarı 800 mg/l dozundaki eugenol varlığında düşüş göstermiştir. Benzer etki antimikrobiyel etkileri bilinen ve fermentasyon ortamına 400 mg/l dozunda eklenen timol ve karvakrol varlığında da gözlenmiştir.

Yıldız ve ark. (2014) esansiyel yağ açısından önemi bilinen farklı bitkilerden elde edilen ekstraktların *in-vitro* gaz üretimine olan etkilerini incelemiştir. Yapılan çalışmada karvakrol esansiyel yağınca zengin olduğu tespit edilen kekik (*Thymus vulgaris*) ve pinenlerce zengin olduğu tespit edilen keklik otunun (*Origanum vulgare*) 50 ppm dozunda toplam gaz üretimini baskılamıştır. Çalışmada kullanılan kekik (*Syzygium aromaticum*) ekstraktının % 93,43 seviyesinde eugenol içerdiği tespit edilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda gözlenen etkiden farklı olarak gaz üretimi eugenol açısından zengin bu bitki ekstraktı ilavesinden etkilenmemiştir. Bu durum

bahsedilen çalışmada kullanılan eugenol seviyesinin bizim çalışmamızdaki seviyeden daha düşük olması ile ilişkilendirilmektedir.

Farklı çalışmalar da antimikrobiyel etkisi kanıtlanmış çeşitli esansiyel yağların *in-vitro* gaz üretimini baskıladığını ortaya koymuştur (Calsamiglia ve ark., 2007). Lin ve ark. (2013) eugenol, sitral, karvakrol ve sinemaldehit esansiyel yağlarının farklı oranlardaki kombinasyonlarının *in-vitro* rumen fermentasyon parametrelerine olan etkilerini incelemiştir. Farklı düzeylerde eugenol içeren karışımlar 200 mg/l ve 500 mg/l dozlarında toplam gaz üretimini baskılamıştır. Bu çalışmada uygulanan esansiyel yağ kombinasyonlarının fermentasyonda üretilen gaz miktarını önemli ölçüde baskıladığı gözlenmiştir. Martínez-Fernández ve ark. (2013) gerçekleştirdikleri çalışmada çeşitli esansiyel yağların *in-vitro* ruminal fermentasyona maruz kalan her bir gram yem kuru maddesi için 24 saatte oluşan toplam gaz miktarına etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda genel olarak çeşitli esansiyel yağların gaz üretimini baskıladığı gözlenmiştir ancak bu etki 320 µl/l'ye kadar artan eugenol seviyelerinde yalnızca sayısal olarak şekillenmiş ve gaz üretiminde olan baskılanma istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Jahani-Azizabadi ve ark. (2011) esansiyel yağlarca zengin çeşitli bitkilerin yağlarının *in-vitro* gaz üretim miktarı üzerine etkilerini değerlendirmiştir. Eugenol açısından zengin olduğu bilinen karanfil yağının 1 µl/ml dozda fermentasyon ortamına eklenmesinin toplam gaz üretimi üzerine önemli bir etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir.

Douglas Göknarı (*Pseudostuga menziesii*) ağacından elde edilen esansiyel yağlar ile gerçekleştirilen bir çalışmada ekstraktın düşük dozlarda (4-8 mg/l) kullanımında rumen gaz üretiminde bir değişiklik gözlenmezken daha yüksek dozlarda (12 mg/l) 24 saatlik fermentasyon sonucunda üretilen gaz miktarı baskılanmıştır (Oh ve ark., 1967). Kamalak ve ark. (2011) gerçekleştirdikleri çalışmada farklı dozlardaki portakal (*Citrus Sinensis L.*) yağının *in-vitro* gaz üretimine olan etkisini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar 100 mg/l dozda başlayarak 1 200 mg/l doza kadar arttırdıkları portakal yağının *in-vitro* gaz üretimini baskıladığını bildirmişlerdir.

Lee ve Jong (2003) gerçekleştirdikleri *in-vitro* çalışmada farklı dozlardaki polysorbate 80'in farklı yem substratları ile gaz üretimine olan etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada % 0,05 polysorbate 80'in arpa tanesinin substrat olduğu fermentasyon ortamına eklenmesi ile fermentasyonun 24. saatinde her bir gram yem kuru maddesinin fermentasyonu sonucu açığa çıkan gaz miktarının arttığı, ancak bu etkinin % 0,1 polysorbate 80 dozunda tersine döndüğü ve gaz üretiminin baskılandığı tespit edilmiştir. Aynı çalışma kapsamında polysorbate 80'in çayır otunun yem substratı olduğu *in-vitro* fermentasyon ortamına % 0,05 ve % 0,1 dozlarında eklenmesinin ise fermentasyonun 24. Saatinde oluşan gaz miktarını kontrol grubuna göre baskıladığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada Polysorbate 80'in *in-vitro* gaz üretimi üzerine göstereceği etkinin doza ve kullanılan substrata bağlı olarak değişebileceği ortaya konmuştur.

Farklı silajların substrat olarak incelendiği bir çalışmada ise % 0,02 dozunda kullanılan Polysorbate 80'in 24 saat toplam gaz üretimini değiştirmediği belirtilmiştir (Wang ve ark., 2003). Aynı çalışma fermentasyon ortamına polysorbate 80 eklenmesinin fermentasyon hızını yavaşlattığını belirlemiştir.

Bitkisel ekstraktlar ve esansiyel yağlar ile gerçekleştirilen çalışmalarda *in-vitro* gaz üretimi ile ilgili olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir. Farklı bulguların elde edilmesinin nedeni olarak bu bileşiklerin çok farklı yapılarda olması düşünülmektedir. Eugenol gibi fenolik özellikteki bitkisel esansiyel yağlar içerdikleri hidroksil grubu nedeni ile yüksek antimikrobiyel aktiviteye sahiptirler (Burt, 2004; Dorman ve Dean, 2000). Çalışmada eugenolün genel olarak *in-vitro* gaz üretimini baskılayıcı etkisi bu maddenin antimikrobiyel aktivitesi ile ilişkilendirilmektedir.

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada genel olarak eugenol ve polysorbate 80 karışımlarının bulunduğu M2, M3 ve M4 gruplarında gözlenen toplam gaz üretimindeki baskılanma dikkat çekici seviyede gelişmiştir. Bu iki bileşiğin karışımının gaz üretiminin baskılanmasında güçlü bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

4.3. Metan Gazı Miktar ve Yoğunluğu

Gerçekleştirilen çalışmada metan gazı yoğunlukları incelendiğinde ilk 6. saat *in-vitro* fermentasyonda üretilen metan gazı yoğunluğu genel olarak kontrol grubuna göre farklılık göstermemiştir. Gruplar arasında yalnızca S1 grubu ile M2 grubu arasında farklılık gözlenmiştir. İnkübasyonun 24. saate kadar olan metan yoğunluklarında da genel olarak kontrol grubuna benzerlik gözükmemektedir. Ancak E6 grubunda diğer gruplara göre düşük bir yoğunluk şekillenmiştir. Her bir gram yem maddesinin fermentasyonu için açığa çıkan metan gazı miktarı incelendiğinde ise yalnızca eugenol ve eugenol ile polysorbate 80 karışımlarının bulunduğu gruplarda düşüş şekillenmiştir.

Polysorbate 80'in *in-vitro* rumen fermentasyonu metan yoğunluğuna olan etkisi hakkında oldukça sınırlı bilgi mevcuttur. Kim ve ark. (2005) gerçekleştirdikleri çalışmada *in-vitro* fermentasyon ortamına % 1 ve % 2 dozlarında eklenen polysorbate 80'in *in-vitro* rumen fermentasyonu sonucu oluşan metan gazı yoğunluğunu etkilemediğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada polysorbate 80 uygulanan gruplarda 24. saat ve ortalama *in-vitro* metan gazı yoğunluğunda istatistiksel bir farklılık bulunamamıştır. Jalç (2002) polysorbate 80'in çeşitli *in-vitro* fermentasyon parametrelerinin takibi için rumen simülasyon tekniği ile bir araştırma gerçekleştirmiştir. Araştırma sonunda fermentasyon ortamına % 0.5 seviyesinde polysorbate 80 eklenmesinin metan gazı üretimi miktarını etkilemediği bildirilmiştir.

Yapısal olarak polysorbate 80'den farklı olan saponin bazlı bir sürfaktanın da *in-vitro* rumen fermentasyonunda şekillenen metan yoğunluğunu önemli seviyede etkilemediği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2011).

Esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitelerinin metanojen bakteriler üzerine de kullanılabileceği fikri üzerine yapılan çalışmalarda bazı bitki ekstraktlarının metanojenik aktiviteyi *in-vitro* olarak baskılayabileceği belirlenmiştir (Kamra ve ark., 2005). Joch ve ark. (2016) *in-vitro* gaz üretim yöntemi ile çeşitli esansiyel yağların 1 000 µl/l dozunda metan yoğunluğuna olan etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda eugenolün ve karvakrol, sitral, limonen, linalol, α -Pinene gibi birçok esansiyel yağın *in-vitro* ruminal fermentasyon sonucu oluşan gazdaki metan yoğunluğunu baskıladığı bildirilmiştir. Gerçekleştirilen bir başka *in-vitro* çalışmada bir esansiyel yağ karışımının 1 000 ppm ve üzeri yoğunlukları ile metanojen bir bakteri olan *Methanobrevibacter smithii*'nin inhibe edildiği bildirilmiştir (McIntosh ve ark., 2003). Chaves ve ark. (2008) çeşitli bitkilerden elde edilen esansiyel yağların *in-vitro* metan seviyesine olan etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmada kullanılan ve % 76 seviyesinde eugenol içerdiği tespit edilen tarçın yaprağı yağının 250 mg/l dozda *in-vitro* fermentasyon ortamına eklenmesinin fermentasyon sonucu oluşan gazda metan yoğunluğunu baskıladığı tespit etmiştir. Lin ve ark. (2013) eugenol, sitral, karvakrol ve sinemaldehit esansiyel yağlarının farklı oranlardaki kombinasyonlarının *in-vitro* rumen fermentasyon parametrelerine olan etkilerini incelemiştir. Farklı düzeylerde eugenol içeren karışımlar 50 mg/l ve 500 mg/l dozlarında oluşan gazdaki metan yoğunluğunu baskılamıştır. Metan yoğunluğunun baskılanmasında en güçlü etki en yüksek eugenol oranına (% 25) sahip karışımın 500 mg/l dozunda şekillenmiştir.

İn-vitro rumen simülasyon sisteminin deneme metodu olarak kullanıldığı bir başka çalışmada ise eugenol açısından zenginliği ile bilinen tarçın yaprağı yağının 500 mg/l dozda kullanımının fermentasyon sonucu açığa çıkan gazdaki metan yoğunluğunu önemli ölçüde etkilemediği bildirilmiştir (Fraser ve ark., 2007).

Ahmed ve ark. (2014) gerçekleştirdikleri çalışmada okaliptus (*Eucalyptus globules*), tarçın (*Cinnamomum cassia*), nane (*Mentha piperita*) ve kekikten (*Thymus vulgaris*) elde edilen esansiyel yağ karışımı ile gerçekleştirdikleri *in-vitro* çalışmada fermentasyon sonucu oluşan gazın metan yoğunluğunda bir değişiklik gözlememişlerdir. Araujo ve ark. (2011) çalışmamızdaki E6 grubunda kullanılan eugenol miktarından biraz daha yüksek eugenol yoğunluğu ile (666 µg/ml) gerçekleştirdikleri çalışmada toplam metan gazı üretiminde kontrol grubuna göre düşüş şekillendiğini bildirmiştir. Busquet ve ark. (2006) yüksek dozlarda sarımsak yağının kullanılması halinde metan üretiminin baskılanabileceğini bildirmiştir. Patra ve Yu (2012) farklı bitkilerden elde edilen esansiyel yağlar ile gerçekleştirdiği çalışmada eugenolü yüksek seviyede içeren karanfil (*Eugenia spp.*) yağının toplam metan gazı üretimini ve her bir gram kuru maddenin fermentasyonu sonucu üretilen metan gazı miktarını azalttığını bildirmiştir. Gerçekleştirilen bir çok *in-vitro* çalışma da çeşitli esansiyel yağların metan üretimini baskılayabileceğini ortaya koymaktadır (Agarwal ve ark., 2009; Macheboeuf ve ark., 2008). Ancak gerçekleştirilen bir *in-vivo* çalışma esansiyel yağların metanogenezis üzerine bir etkisi tespit edilememiştir (Beauchemin ve McGinn, 2006).

Rumende metanojen ve yüksek oranda amonyak üretenler gibi mikroorganizmaların seçici olarak inhibe edilmesi esansiyel yağların etki mekanizmaları olarak değerlendirilmektedir (Calsamiglia ve ark., 2007). Gerçekleştirilen araştırmada yüksek dozda (600 µg/ml) eugenol kullanımının fermentasyonun 6-24. saatinde oluşan metan yoğunluğunu baskılamasının nedeni olarak metanojen mikroorganizmaların esansiyel yağ ile inhibe edilmesi düşünülmektedir. Çalışmada denenen bileşiklerin net metan gazı üzerinde gösterdikleri genel baskılayıcı etki ise bu bileşiklerin hem genel fermentasyona hem de spesifik olarak metanojenlere olan etkileri ile ilişkilendirilmektedir.

4.4. Uçucu Yağ Asiti Yoğunluğu

Gerçekleştirilen çalışmada farklı dozlardaki polysorbate 80 ve eugenolün ayrı ayrı ve karışımlar halinde asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit ve toplam uçucu yağ asiti yoğunlukları ile asetik asit: propiyonik asit oranı üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Asetik asit yoğunluğu yalnızca eugenol içeren gruplarda (E3 ve E6) baskılanmıştır. Propiyonik asit yoğunluğu yalnızca 600 µg/ml eugenol içeren E6 grubunda baskılanmıştır. Bütirik asit yoğunluğunda ise istatistiksel anlamda önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Asetik asit : propiyonik asit yoğunluğu oranında uygulamalara bağlı bir farklılık şekillenmemiştir. Toplam uçucu yağ asiti yoğunluğu 600 µg/ml eugenol içeren E6 grubunda baskılanmıştır.

Wang ve ark. (2003) gerçekleştirdikleri çalışmanın *in-vitro* bölümünde yonca silajının fermentasyon ortamına % 0,02 seviyesinde polysorbate 80 eklenmesinin asetik asit ve toplam yağ asiti yoğunluğu ile asetat:propiyonat oranını düşürdüğünü bildirmiştir. Mısır silajının *in-vitro* fermentasyonunda ise polysorbate 80 propiyonat yoğunluğu ve toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu arttırırken asetat : propiyonat oranını etkilememiştir. Bu çalışmada polysorbate 80'in uçucu yağ asitleri üzerine olan etkisinin substrata bağlı olarak değişebileceği üzerinde durulmuştur. Cong ve ark. (2009) farklı tahıl samanlarının *in-vitro* fermentasyonunda şekillenen uçucu yağ asiti profili üzerine çeşitli iyonik yapıda olmayan sürfaktanların etkilerini değerlendirmiştir. Buna göre mısır sapının *in-vitro* fermentasyon ortamına polysorbate 80 eklenmesinin toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu etkilemediği, asetat yoğunluğunu düşürdüğü gözlenmiştir. Pirinç samanında benzer şekilde toplam uçucu yağ asiti ve asetat yoğunluğu düşerken propiyonat ve bütirat yoğunluğunda ise genel bir artış etkisi gözlenmiştir. Buğday samanında ise polysorbate 80 asetat, bütirat, propiyonat ve toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu arttırmaktadır. Goto ve ark. (2003c) arpa tanesi ve domuz ayrık kuru otu (*Dactylis Glomerata*) ile gerçekleştirdikleri *in-vitro* çalışmada polysorbate 80'in % 0,2 dozunda uygulanmasının toplam uçucu yağ

asiti yoğunluğunu arttırmış, arpa için asetat ve propiyonat oranını etkilemezken, domuz ayrığı kuru otunun fermentasyonunda asetat ve propiyonat oranı artmıştır. Polysorbate 80'in % 0,1 dozunda kullanımı ise toplam uçucu yağ asiti ve diğer yağ asitlerinin yoğunluğunda bir değişikliğe neden olmamıştır. Wang ve ark. (2004) arpa tanesi ve arpa silajı ile polysorbate 80'in toplam uçucu yağ asiti yoğunluğuna etkisini değerlendirmek üzere *in-vitro* inkübasyon gerçekleştirmişlerdir. Bu deneme sonunda polysorbate 80'in toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu ya da asetat : propiyonat oranını etkilemediği tespit edilmiştir. Ahn ve ark. (2009) polysorbate 80'in mısır ve arpa gibi konsantre yem maddeleri ile pirinç samanı ve çayır kuru otunun rumen fermentasyonunu değerlendirmek için *in-vitro* çalışma gerçekleştirmiştir. Bu deneme sonucunda toplam uçucu yağ asiti yoğunluğu pirinç samanının substrat olduğu grupta % 0,1 ve % 0,2 seviyesinde polysorbate 80 uygulaması ile artarken çayır kuru otunun substrat olduğu deneme grubunda yalnızca polysorbate 80'in % 0,1 olduğu grupta artış göstermiştir. Toplam uçucu yağ asiti yoğunluğu mısır ve arpanın substrat olduğu gruplarda farklılık göstermemiştir. Toplam uçucu yağ asitinde artış gözlenen gruplarda artışın asıl nedeni asetik asitte gözlenen artış ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda da farklı dozlardaki polysorbate 80 asetik asit seviyesini sayısal olarak artış eğilimi göstermiş olsa da bu etki istatistiksel olarak önem teşkil etmemektedir. Ahn ve ark (2009) yine bütün substratların fermentasyonunda özellikle % 0,2 polysorbate 80 dozu ile propiyonik asit yoğunluğunda bir artış rapor etmişlerdir. Çalışmamızda benzer bir eğilim yalnızca sayısal anlamda tespit edilebilmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler polysorbate 80'in *in-vitro* uçucu yağ asiti parametrelerine olan etkisinin substrata ve doza bağlı olarak değişim gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular gerçekleştirilen bir başka çalışmada % 0,2 seviyesinde kullanılan polysorbate 80'in toplam uçucu yağ yoğunluğunu kaba yemlerde konsantre yemlere göre daha fazla arttırması ile desteklenmektedir (Goto ve ark., 2003b). Kim ve ark. (2005) inekler için oluşturulmuş bir rasyona % 1 ve % 2 seviyesinde polysorbate 80 eklenmesinin *in-vitro* rumen fermentasyon parametreleri üzerine etkilerini değerlendirmiştir. Araştırmacılar % 2 Polysorbate 80 varlığında *in-vitro* fermentasyon sonucu oluşan toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunda artış gözlemişlerdir. Asetat : Propiyonat oranında % 2 Polysorbate 80 uygulamasında azalma şekillenmiştir.

Hwang ve ark. (2008) gerçekleştirdikleri *in-vivo* çalışmada yeme % 2,5 uygulanan Polysorbate 80 ve selüloolitik enzim kombinasyonlarının rumen uçucu yağ asiti yoğunluklarına olan etkilerini değerlendirmiştir. Çalışmada uygulama ile kontrol grubuna göre toplam uçucu yağ asiti ile propiyonat yoğunluklarının arttığı bildirilmiştir. Chen ve ark. (2011) gerçekleştirdikleri *in-vivo* çalışmada hayvan başına günde 10 g sağlanan farklı sürfaktanların rumen fermentasyon parametreleri üzerine etkilerini değerlendirilmiştir. Araştırmacılar günde hayvan başına yem yolu ile 10 g verilen polysorbate 80'in asetat, propiyonat ve toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu arttırdığını belirtmişlerdir. Asetat : propiyonat oranı üzerine ise bir etki tespit edilememiştir.

Polysorbate 80'in *in-vivo* olarak rumen uçucu yağ asiti profiline ve toplam yoğunluğuna etkileri farklı çalışmalar ile değerlendirilmiştir. Yoğun konsantre yem ile beslenen besi sığırlarında polysorbate 80 kullanımı toplam uçucu yağ asiti, asetat, propiyonat oranlarını sayısal anlamda baskılamış ancak bu etki istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır (Hristov ve ark., 2000). Ahn ve ark. (2009) gerçekleştirdikleri çalışmanın *in-vivo* kısmında ise yoğun kaba yem ile beslenen besi sığırlarında yem kuru maddesine % 0,04 oranında katılan polysorbate 80'in toplam uçucu yağ asiti yoğunluğu üzerine bir etkisi olmazken yem kuru maddesine % 0,08 oranında uygulanan polysorbate 80'in toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu arttırdığı rapor edilmiştir. Bu artış *in-vitro* çalışmada gözlenene benzer şekilde asetat yoğunluğundaki artıştan temel almaktadır ve diğer uçucu yağ asiti yoğunluklarında bir değişim gözlenmemiştir. Baah ve ark. (2005) her bir kilogram yeme 2 ml polysorbate 80 ilave ederek gerçekleştirdikleri *in-vivo* çalışmada ineklerden alınan rumen sıvısı örneklerinde toplam uçucu yağ asiti ve asetat yoğunluğunun değişmediği ancak propiyonat yoğunluğunun arttığını bildirmişlerdir. Propiyonat yoğunluğundaki artışa bağlı olarak asetat : propiyonat oranında düşüş gözlenmiştir. Kim ve ark. (2004) sığırlar üzerinde polysorbate 80'in etkilerini değerlendirdikleri *in-vivo* çalışmada inek başına günde 10 g dozunda polysorbate 80 verilmesinin toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu arttırdığını ancak bu artışın yalnızca asetat yoğunluğundaki artıştan

temel aldığını bildirmiştir. Asetik asit ve bütirik asit yoğunluklarında hafif bir artış gözlenmiş ancak bu artış istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır.

Castillojos ve ark. (2006) çeşitli esansiyel yağ aktif bileşenlerinin rumen fermentasyon parametreleri üzerine etkilerini değerlendirmek için kapalı sistem ve rumen simülasyon sistemi ile *in-vitro* araştırma gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada eugenol toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu sayısal olarak baskılayıcı etki göstermiş ancak 5 000 mg/l dozunda istatistiksel olarak önemli etki bulunmuştur. Asetat yoğunluğu 5 mg/l dozunda baskılandığı tespit edilmiştir ve bu etkiye uyumlu olarak asetat : propiyonat oranında da benzer bir düşüş şekillenmiştir. Propiyonat yoğunluğu ise 500 mg/l dozunda baskılanmış ve diğer dozlarda bir farklılık şekillenmemiştir. Martínez-Fernández ve ark. (2013) eugenolün *in-vitro* rumen fermentasyon ortamında toplam uçucu yağ asiti yoğunluğu üzerine bir etkisinin bulunmadığını bildirmişlerdir. Cardozo ve ark. (2005) esansiyel yağların *in-vitro* rumen fermentasyonu üzerine etkilerini değerlendirdikleri çalışmada eugenolün farklı rumen pH seviyelerinde uçucu yağ asiti yoğunlukları üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada pH 7 seviyesinde iken eugenol toplam uçucu yağ yoğunluğunu etkilemediği, pH'nın 5,5 seviyesine geldiğinde ise baskılayıcı etki ortaya çıktığı bildirilmiştir. Benzer şekilde pH 7 seviyesinde eugenol propiyonat yoğunluğu üzerine bir etki göstermezken, pH 5,5 seviyesinde propiyonat yoğunluğunu baskılamıştır.

In-vitro rumen simülasyon sisteminin deneme metodu olarak kullanıldığı bir başka çalışmada ise eugenol açısından zenginliği ile bilinen tarçın yaprağı yağının 500 mg/l dozda kullanımının toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu sayısal olarak, propiyonat yoğunluğunu ise istatistiksel olarak önemli şekilde baskıladığı ortaya çıkmıştır (Fraser ve ark., 2007). Araştırmada gözlenen propiyonat yoğunluğundaki düşüşe bağlı olarak asetat : propiyonat oranında da istatistiksel olarak önemli bir artış şekillenmiştir.

Busquet ve ark. (2006) gerçekleştirdikleri çalışmada çeşitli esansiyel yağların ve bitki ekstraktlarının *in-vitro* rumen fermentasyonu üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada bizim çalışmamıza benzer olarak yem substratı olarak konsantre yem : kaba yem oranı 50 : 50 olarak kullanılmıştır. Çalışma sonucunda eugenol ve içerisinde yüksek miktarda eugenol bulunan karanfil yağının genel olarak toplam uçucu yağ asiti yoğunluğu sayısal olarak baskıladığı, eugenolün 3 000 mg/l ve karanfil yağının 300 mg/l ile 3000 mg/l dozlarında baskılayıcı etkilerinin istatistiksel olarak önem teşkil ettiği bildirilmiştir. Bu çalışma etkisi değerlendirilen saf esansiyel yağ ve bitki ekstraktlarının genel anlamda toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu baskıladığı gözlenirken çemen otu ekstraktının sayısal anlamda uçucu yağ asiti yoğunluğunu arttırıcı etkisi izlenmiştir. Eugenolün asetat yoğunluğu üzerine bir etkisi bu çalışmada belirlenmemiştir ancak eugenolce zengin karanfil yağı 300 mg/l dozda asetat yoğunluğunu baskılamıştır. Eugenol 3000 mg/l dozda propiyonat yoğunluğunu arttırmıştır. Bu çalışmada elde edilen bulguların tersine farklı bir *in-vitro* çalışmada fermentasyonda kullanılan yemin 1 kg kuru maddesi için 75 mg dozunda kullanılan eugenolün toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu ve diğer uçucu yağ asiti yoğunluklarını etkilemediği bildirilmiştir (Busquet ve ark., 2005b). Chaves ve ark. (2008) çeşitli bitkilerden elde edilen esansiyel yağların *in-vitro* amonyak azotu seviyesine olan etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmada kullanılan ve % 76 eugenol içerdiği tespit edilen tarçın yaprağı yağının 250 mg/l dozda *in-vitro* fermentasyon ortamına eklenmesinin toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu etkilemediği, propiyonat yoğunluğunu düşürdüğü tespit edilmiştir. Benchaar ve ark. (2007) eugenol içeriği açısından yüksek olduğu bilenen tarçın yaprağı yağı, karanfil yaprağı yağı ve limonen açısından zengin olduğu bilenen portakal yağı ile eugenol, karvakrol, sinemaldehit ve timol gibi esansiyel yağların *in-vitro* uçucu yağ asiti yoğunluğuna olan etkisini değerlendirmiştir. Bu çalışmada toplam uçucu yağ asiti yoğunluğu ile asetat ve propiyonat yoğunlukları sayısal olarak baskılanmıştır ancak bu etki istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Joch ve ark. (2016) gerçekleştirdikleri *in-vitro* çalışmada 1 mg/l dozdaki eugenolün toplam uçucu yağ asiti ve propiyonat yoğunluğunu düşürdüğünü bildirmiştir. Propiyonat yoğunluğunda gözlenen baskılanmaya bağlı olarak asetat : propiyonat oranında artış gözlenmiştir.

Tekeli ve ark. (2015) gerçekleştirdikleri çalışmada farklı esansiyel yağların *in-vitro* rumen uçucu yağ asiti yoğunluğuna etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada ise genel olarak esansiyel yağların asetat ve propiyonat yoğunluğunu arttırıcı yönde etkisi belirlenmiştir. Ancak 24 saat inkübasyon sonunda 25 ppm yoğunluğunda timolün yem karışımı ve saman substratlarının fermentasyonunda oluşan propiyonat yoğunluğunu baskıladığı tespit edilmiştir. Bu etki konsantre yem kullanılan fermentasyon ortamında oluşmamıştır.

Biberiye ve adaçayı gibi farklı bitki ekstraktlarının *in-vitro* rumen simülasyon tekniği sistemi ile fermentasyon parametreleri üzerine etkilerinin değerlendirildiğinde toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunda bir değişim gözlenmezken asetat yoğunluğunda baskılanma ve buna bağlı olarak asetat : propiyonat oranında düşüş gözlenmiştir (Demirtaş ve ark., 2011).

Yang ve ark. (2010) gerçekleştirdikleri *in-vivo* çalışmada besi sığırı rasyonlarına hayvan başı günlük 400 mg, 800 mg, 1600 mg eklenen eugenolün toplam uçucu yağ asiti ve diğer yağ asitlerinin yoğunluğunda bir değişime neden olmadığını bildirmiştir. Lin ve ark. (2013) eugenol, sitral, karvakrol ve sinemaldehit esansiyel yağlarının farklı oranlardaki kombinasyonlarının *in-vitro* rumen fermentasyon parametrelerine olan etkilerini incelemiştir. Farklı düzeylerde eugenol içeren karışımlar 50 mg/l, 200 mg/l ve 500 mg/l dozlarında toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu baskılamıştır. Bütün karışımlar 500 mg/l dozunda asetat : propiyonat oranını arttırmıştır. Tekippe ve ark. (2013) gerçekleştirdikleri *in-vivo* çalışmada eugenol ve sinemaldehit esansiyel yağlarının karışımının sağmal ineklerde rumen fermentasyonu üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada hayvan başına günlük 525 g verilen eugenol ve sinemaldehit karışımının rumen uçucu yağ asiti yoğunluğu üzerine herhangi bir etkisi olmadığı bildirilmiştir. Scharen ve ark. (2017) içerisinde eugenolün de bulunduğu bir esansiyel yağ karışımı ile ineklerde gerçekleştirdikleri çalışmada toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunda bir değişim gözlenmezken asetat yoğunluğunda artış bildirmiştir.

asetat : propiyonat oranında da artış şekillendiği bildirilmektedir. Newbold ve ark. (2004) içerisinde ağırlıklı olarak timol ve limonen bulunan bir ticari esansiyel yağ karışımını koyunlarda *in-vivo* olarak çalışmışlar, bu esansiyel yağ karışımının rumen uçucu yağ yoğunluğu üzerine bir etkisini tespit edememişlerdir. Aynı ticari esansiyel yağ karışımı *in-vivo* olarak sığırlarda değerlendirilmiştir ve yine uçucu yağ asiti yoğunluğuna bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir (Beauchemin ve McGinn, 2006). Lee ve ark. (2003) polysorbate 80'in rumen fermentasyon parametreleri üzerine olan etkilerini değerlendirmek için ineklere günlük iki kere 30 ml seviyesinde polysorbate 80'i rumen kanülü yoluyla vermişlerdir. Polysorbate 80 uygulamasının yem tüketimini takip eden 3. ve 9. saatlerde toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunu arttırdığı bildirilmiştir.

Genel olarak uçucu yağlar üzerinde eugenol ile oluşturulan gruplarda baskılayıcı bir etki gözlenmesinin sebebi olarak bu bileşiğin antimikrobiyel etkisi düşünülmektedir (Davidson ve Naidu, 2000). Sürfaktanın sayısal olarak asetik asit ve toplam uçucu yağ asiti yoğunluğunda yarattığı artış etkisinin bu bileşiklerin selüloz içeriği yüksek substratların fermentasyonunu arttırması ile ilişkilendirilmektedir (Cong ve ark., 2009).

4.5. Amonyak Azotu

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada yalnızca E6 grubunda kontrol ve diğer uygulamalara göre amonyak azotu yoğunluğunda bir düşüş şekillenmiştir. Daha düşük yoğunlukta eugenol uygulanan E3 grubunda sayısal anlamda düşüş eğilimi şekillenmiş olsa da bu etki istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Borchers (1965) timolün *in-vitro* rumen fermentasyon ortamına eklenmesi ile esansiyel yağların ortamdaki amino asit kökenli azot yoğunluğunu arttırıp, amonyak kökenli azot yoğunluğunu düşürebileceğini tespit etmiştir. Bu çalışma esansiyel yağların rumende protein metabolizmasına etki edebileceği yönünde ilk bulgulardan birini ortaya koymuştur.

Busquet ve ark. (2006) çeşitli esansiyel yağların *in-vitro* rumen fermentasyonu üzerine etkilerini değerlendirdikleri çalışmada 300 mg/l ve 3000 mg/l seviyesindeki eugenolün amonyak azotu seviyesini düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Eugenolün haricinde sinemaldehit, çemen otu yağı, kapsikum yağı ve yüksek seviyede eugenol içeren karanfil yağının amonyak azotu yoğunluğunu baskıladığı bildirilmiştir. *İn-vitro* rumen simülasyon sisteminin deneme metodu olarak kullanıldığı bir başka çalışmada ise eugenol açısından zenginliği ile bilinen tarçın yaprağı yağının 500 mg/l dozda kullanımının amonyak azotu yoğunluğunu önemli oranda etkilemediği gözlenmiştir (Fraser ve ark., 2007). Cardozo ve ark. (2005) esansiyel yağların *in-vitro* rumen fermentasyonu üzerine etkilerini değerlendirdikleri çalışmada eugenolün değişen fermentasyon pH değerlerinde 300 mg/l dozda kullanılmasının amonyak azotu yoğunluğunu baskılayıcı yönde etkisi olduğu gözlenmiştir. Castillejos ve ark. (2006) gerçekleştirdikleri *in-vitro* çalışmada eugenolün 50 mg/l, 500 mg/l ve 5000 mg/l dozunda amonyak azotu yoğunluğunu düşürdüğünü tespit etmiştir. Benchaar ve ark. (2007) içlerinde eugenolün de bulunduğu çeşitli esansiyel yağların *in-vitro* olarak amonyak azotu seviyesine olan etkilerini değerlendirdikleri çalışmada eugenolün amonyak azotu seviyesini sayısal olarak baskılamış ancak bu etki istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır. Lin ve ark. (2013) eugenol, sitral, karvakrol ve sinemaldehit esansiyel yağlarının farklı oranlardaki kombinasyonlarının *in-vitro* rumen fermentasyon parametrelerine olan etkilerini incelemiştir. Farklı düzeylerde eugenol içeren karışımlar 50 mg/l, 200 mg/l ve 500 mg/l dozlarında amonyak azotu yoğunluğunu baskılamıştır. Jahani-Azizabadi ve ark. (2011) esansiyel yağlarca zengin çeşitli bitkilerin yağlarını elde ederek *in-vitro* rumen fermentasyonu üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Eugenol açısından zengin olduğu bilinen karanfil yağının *in-vitro* rumen fermentasyon ortamında amonyak azotu seviyesini baskıladığı tespit

edilmiştir. Chaves ve ark. (2008) çeşitli bitkilerden elde edilen esansiyel yağların *in-vitro* amonyak azotu seviyesine olan etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmada kullanılan ve % 76 eugenol içerdiği tespit edilen tarçın yaprağı yağının 250 mg/l dozda *in-vitro* fermentasyon ortamına eklenmesinin ortam amonyak azotu yoğunluğunu önemli şekilde etkilemediği bildirilmiştir. Biberiye ve adaçayı gibi farklı bitki ekstraktlarının *in-vitro* rumen simülasyon tekniği ile fermentasyon parametreleri üzerine etkilerinin değerlendirildiğinde adaçayı ekstraktı varlığında sayısal anlamda amonyak azotu seviyesinde düşüş gözlenmiştir ancak her iki ekstrakt için de istatistiksel olarak önemli bir etki tespit edilememiştir (Demirtaş ve ark., 2011).

Yang ve ark. (2010) gerçekleştirdikleri *in-vivo* çalışmada besi sığırları rasyonlarına hayvan başı günlük 400 mg, 800 mg, 1 600 mg eklenen eugenolün rumen sıvısı amonyak azotu yoğunluğunu değiştirmediğini bildirmiştir. Schären ve ark. (2017) geçiş dönemindeki süt inekleri ile gerçekleştirdikleri çalışmada içerisinde eugenol de bulunan bitkisel ekstrakt karışımını hayvanlara günde 1 g dozda yem ile vermişlerdir. Bu çalışmada kullanılan bitkisel ekstrakt karışımının amonyak azotu seviyesine bir etkisi bulunmadığı bildirilmiştir. Newbold ve ark. (2004) içerisinde farklı esansiyel yağlar bulunan ticari bir karışımı koyunlar üzerinde denemişlerdir. Koyunların tükettiği konsantre yemin doğal haldeki bir kilogramına 234 mg dozda katılan esansiyel yağ karışımının çeşitli amino asitlerin deaminasyonunu yavaşlattığı ancak rumen sıvısındaki amonyak seviyesini etkilemediğini ortaya koymuşlardır.

Ahn ve ark. (2009) polysorbate 80'in mısır ve arpa gibi konsantre yem maddeleri ile pirinç samanı ve çayır kuru otunun rumen fermentasyonunu değerlendirmek için *in-vitro* ve *in-vivo* çalışma gerçekleştirmiştir. Polysorbate 80 bütün pirinç samanı ve çayır otunda amonyak azotunu arttırmıştır ancak mısır ve arpa substratlarının bulunduğu *in-vitro* rumen fermentasyon ortamlarında amonyak azotu yoğunluğunda bir değişim gözlenmemiştir. Cong ve ark. (2009) farklı tahıl samanlarının *in-vitro* rumen fermentasyon parametreleri üzerine çeşitli iyonik yapıda olmayan sürfaktanların etkilerini değerlendirmiştir.

Kim ve ark. (2004) sığırlar üzerinde polysorbate 80'in etkilerini değerlendirdikleri *in-vivo* çalışmada inek başına günde 5 g ve 10 g dozunda polysorbate 80 verilmesinin rumen fermentasyon parametreleri üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışmada farklı dozlardaki polysorbate 80'in rumen amonyak azotu üzerinde herhangi bir etkisi tespit edilememiştir. Ahn ve ark. (2009) çalışmalarının *in-vivo* kısmında polysorbate 80 içeren yemleri tüketen sığırların rumen sıvısında amonyak azotu yoğunluğunda artış gözlemişlerdir. Baah ve ark. (2005) ineklerin rasyonuna 2 ml/kg dozunda ekledikleri polysorbate 80'in amonyak yoğunluğu üzerine bir etkisi bulunmadığını bildirmiştir. Hristov ve ark. (2000) gerçekleştirdikleri *in-vivo* çalışmada yoğun konsantre yem ile beslenen besi sığırlarının yemlerinin kuru maddesine 2 g/kg dozunda polysorbate 80 eklemişlerdir. Bu çalışmada uygulanan polysorbate 80'in amonyak seviyesine etkisi tespit edilememiştir. Lee ve ark. (2003) polysorbate 80'in rumen fermentasyon parametreleri üzerine olan etkilerini değerlendirmek için ineklere günlük iki defa 30 ml seviyesinde polysorbate 80'i rumen kanülü yoluyla vermişlerdir. Polysorbate 80 uygulamasının rumen amonyak azotu seviyesini sayısal anlamda arttırdığı ancak bu etkinin istatistiksel anlamda önemli bulunmadığı bildirilmiştir. Chen ve ark. (2011) gerçekleştirdikleri *in-vivo* çalışmada hayvan başına günde 10 g sağlanan farklı sürfaktanların rumen fermentasyon parametreleri üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar günde hayvan başına yem yolu ile 10 g verilen polysorbate 80'in amonyak azotu yoğunluğunu düşürdüğünü tespit etmişlerdir.

Rumende metanojen ve yüksek oranda amonyak üretenler gibi mikroorganizmaların seçici olarak inhibe edilmesi esansiyel yağların etki mekanizmaları olarak değerlendirilmektedir (Calsamiglia ve ark., 2007). Gerçekleştirilen araştırmada yüksek dozda (600 µg/ml) eugenol kullanımının amonyak azotu seviyesini baskılaması bu bileşiğin amonyak üreten mikroorganizmaları baskılaması ile ilişkilendirilmektedir.

4.6. Ph

Çalışmamızda kullanılan sürfaktan olan Polysorbate 80 0,5 µl/ml seviyesinde kullanıldığında *in-vitro* rumen fermentasyon ortam pH'sını düşürmüştür. Diğer uygulamaların *in-vitro* rumen pH seviyesine herhangi bir etkisi tespit edilememiştir.

Castillejos ve ark. (2006) gerçekleştirdikleri *in-vitro* çalışmada eugenolün 5 000 mg/l dozda rumen pH'sını arttırdığını bunun haricinde denenen daha düşük dozlarda ise bir etki tespit edilemediğini belirtmişlerdir. Busquet ve ark. (2006) çeşitli esansiyel yağların *in-vitro* rumen fermentasyonu üzerine etkilerini değerlendirdikleri çalışmada eugenolün 3 000 mg/l dozda uygulanması ile pH'da artış gözlemişlerdir. Bu etki eugenolün 3 mg/l, 30 mg/l ve 300 mg/l dozlarında gözlenmemiştir. Benchaar ve ark. (2007) içlerinde eugenolün de bulunduğu çeşitli esansiyel yağların *in-vitro* olarak rumen fermentasyon ortam pH'sı üzerine etkileri değerlendirmişlerdir. Çalışmada kullanılan 800 mg/l seviyesindeki eugenol *in-vitro* rumen pH'sında artışa neden olmuştur. Jahani-Azizabadi ve ark. (2011) esansiyel yağlarca zengin çeşitli bitkilerin yağlarını elde ederek *in-vitro* rumen fermentasyonu üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Eugenol açısından zengin olduğu bilinen karanfil yağının *in-vitro* rumen fermentasyonunda pH'yı yükselttiği tespit edilmiştir. Chaves ve ark. (2008) çeşitli bitkilerden elde edilen esansiyel yağların *in-vitro* amonyak azotu seviyesine olan etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmada kullanılan ve % 76 eugenol içerdiği tespit edilen tarçın yaprağı yağının 250 mg/l dozda *in-vitro* fermentasyon ortamına eklenmesinin fermentasyon ortamının pH seviyesini önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir. *In-vitro* rumen simülasyon sisteminin deneme metodu olarak kullanıldığı bir başka çalışmada ise eugenol açısından zenginliği ile bilinen tarçın yaprağı yağının 500 mg/l dozda kullanımının pH değerini önemli seviyede etkilemediği gözlenmiştir (Fraser ve ark., 2007). Joch ve ark. (2016) gerçekleştirdikleri *in-vitro* çalışmada esansiyel yağların rumen fermentasyon pH'sına olan etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada 1 000 µl/l dozundaki eugenolün fermentasyon sonucu şekillenen pH'yı sayısal anlamda arttırdığı ancak bu etkinin

istatistiksel olarak önemli olmadığı bildirilmiştir. Biberiye ve adaçayı gibi farklı bitki ekstraktlarının *in-vitro* rumen simülasyon sistemi ile fermentasyon parametreleri üzerine etkilerinin değerlendirildiği çalışmada adı geçen bitki ekstraktlarının *in-vitro* rumen pH değeri üzerinde herhangi bir etkisi bulunmadığı bildirilmiştir.

Yang ve ark. (2010) gerçekleştirdikleri *in-vivo* çalışmada besi sığırı rasyonlarına hayvan başı gönlün 400 mg, 800 mg, 1 600 mg eklenen eugenolün rumen sıvısı pH'sında bir değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir. Lin ve ark. (2013) eugenol, sitral, karvakrol ve sinemaldehit esansiyel yağlarının farklı oranlardaki kombinasyonlarının *in-vitro* rumen fermentasyon parametrelerine olan etkilerini incelemiştir. Yalnızca en yüksek seviyede (% 25) eugenol içeren esansiyel yap karışımı 500 mg/l dozunda fermentasyon sonu pH'yı arttırmıştır. Diğer karışım ve dozlarda ise fermentasyon sonu pH'da düşüş gözlenmiştir. Sch ren ve ark. (2017) geçiş dönemindeki süt inekleri ile gerçekleştirdikleri çalışmada içerisinde eugenol de bulunan bitkisel ekstrakt karışımını hayvanlara günde 1 g dozda yem ile verilmiştir. Araştırmacılar kullanılan bitkisel ekstrakt karışımının rumen pH'sı üzerine bir etkisinin bulunmadığını bildirmişlerdir. Newbold ve ark. (2004) içerisinde farklı esansiyel yağlar bulunan ticari bir karışımının koyunlar üzerinde çalışmışlardır. Koyunların tükettiği konsantre yemin doğal haldeki bir kilogramına 234 mg dozda katılan esansiyel yağ karışımının rumen pH'sını etkilemediği bildirilmiştir.

Ahn ve ark. (2009) polysorbate 80'in mısır ve arpa gibi konsantre yem maddeleri ile pirinç samanı ve  ayır kuru otunun rumen fermentasyonunu değerlendirmek için *in-vitro*  alışma gerçekleştirmiştir. Bu  alışma içerisinde kullanılan hiçbir substrat için *in-vitro* rumen pH'sında bir değişim gözlenmemiştir.

Kim ve ark. (2004) sığırlar üzerinde polysorbate 80'in etkilerini değerlendirdikleri *in-vivo*  alışmada inek başına günde 5 g ve 10 g dozunda polysorbate 80 verilmesinin rumen fermentasyon parametreleri üzerine etkilerini

değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar pH seviyesinde sayısal anlamda bir düşüş gözlemiştir ancak bu etkiyi istatistiksel olarak önemli bulmamışlardır. Ahn ve ark. (2009) çalışmalarının *in-vivo* kısmında polysorbate 80 içeren yemleri tüketen sığırların rumen sıvısı pH düzeylerinde düşüş gözlemiştir. Baah ve ark. (2005) ineklerin rasyonuna 2 ml/kg dozunda ekledikleri polysorbate 80'in rumen pH değeri üzerine bir etkisi bulunmadığını bildirmiştir. Hristov ve ark. (2000) gerçekleştirdikleri *in-vivo* çalışmada yoğun konsantre yem ile beslenen besi sığırlarının yemlerinin kuru maddesine 2 g/kg dozunda polysorbate 80 eklemişlerdir. Araştırmacılar uygulamanın rumen pH'sı üzerine herhangi bir etkisini tespit edememişlerdir. Lee ve ark. (2003) polysorbate 80'in rumen fermentasyon parametreleri üzerine olan etkilerini değerlendirmek için ineklere günlük sefer 30 ml seviyesinde polysorbate 80'i rumen kanülü yoluyla vermişlerdir. Polysorbate 80 uygulamasının rumen pH'sını önemli ölçüde düşürdüğü tespit edilmiştir. Kim ve ark. (2005) inekler için oluşturulmuş bir rasyona % 1 ve % 2 seviyesinde polysorbate 80 eklenmesinin *in-vitro* rumen fermentasyon parametreleri üzerine etkilerini değerlendirmiştir. Araştırmacılar % 2 seviyesinde uygulanan polysorbate 80'in *in-vitro* rumen pH seviyesini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Chen ve ark. (2011) gerçekleştirdikleri *in-vivo* çalışmada hayvan başına günde 10 g sağlanan farklı sürfaktanların rumen fermentasyon parametreleri üzerine etkilerini değerlendirilmiştir. Araştırmacılar günde hayvan başına yem yolu ile 10 g verilen polysorbate 80'in rumen pH'sını sayısal anlamda düşürdüğü ancak bu etkinin istatistiksel olarak önemli bulunmadığını bildirmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gerçekleştirilen çalışmada bir esansiyel yağ olan eugenol ile sürfaktan olan polysorbate 80'in farklı *in-vitro* rumen fermentasyon parametreleri ile yemlerin *in-vitro* rumen sindirilebilirlikleri üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Sözü geçen bileşiklerin kontrol grubuna göre genel olarak *in-vitro* gerçek kuru madde sindirilebilirliği, organik madde sindirilebilirliği ve NDF sindirilebilirliğini baskıladığı ortaya konulmuştur. Bu durum bahsedilen bileşiklerin kullanılan dozlarında şekillenebileceği gibi çalışmada kullanılan yem substratına da bağımlılık gösterebileceği düşünülmektedir. Farklı yapıdaki esansiyel yağlar ve sürfaktanlar ile *in-vitro* rumen sindirilebilirliği çalışmalarının çeşitlendirilmesi bu bileşiklerin rumende yemlerin sindirilebilirliğine olan etkilerinin anlaşılması açısından fayda sağlayacaktır.

Çalışmada kullanılan bileşiklerin yem maddelerinin fermentasyonu sonucu açığa çıkardığı metan gazı miktarına etkisi değerlendirilmiştir. Eugenol çalışmada kullanılan her iki dozunda da oluşan metan gazı miktarını baskılayıcı etki göstermiştir. Diğer yandan eugenol ve polysorbate 80'in kombine edildiği gruplarda da oldukça güçlü bir etki şekillenmiştir. Bir sera gazı olan ve çevre açısından sakıncalarının sık dile getirildiği metan gazı üretiminin ruminant yetiştirme sistemlerinde sınırlandırılması büyük önem arz etmektedir. Çalışmada kullanılan bileşiklerin metan gazına üretimine olan etkilerinin uzun süreli *in-vivo* çalışmalar ile desteklenmesi bu yöndeki araştırmalar açısından faydalı olabilecektir. Ayrıca bu etkinin rumen mikroorganizmalarının direnç geliştirme ihtimaline karşı daha uzun süre çalışabilen *in-vitro* rumen simülasyon sistemleri ile değerlendirilmesi de gerçekleştirilecek *in-vivo* çalışmalara ışık tutacaktır.

Farklı dozlardaki polysorbate 80 ve eugenolün ayrı ayrı ve karışımlar halinde asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit ve toplam uçucu yağ asiti yoğunlukları ile asetik Asit: propiyonik Asit oranı üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Asetik asit yoğunluğu yalnızca eugenol içeren gruplarda (E3 ve E6) baskılanmıştır. Propiyonik asit yoğunluğu yalnızca 600 µg/ml eugenol içeren E6 grubunda baskılanmıştır. Bütirik asit yoğunluğunda ise istatistiksel anlamda önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Asetik asit : propiyonik asit yoğunluğu oranında uygulamalara bağlı bir farklılık şekillenmemiştir. Toplam uçucu yağ asiti yoğunluğu 600 µg/ml eugenol içeren E6 grubunda baskılanmıştır. Farklı yapıdaki esansiyel yağlar ile gerçekleştirilen çalışmalarda bu bileşiklerin uçucu yağ asiti üretimi destekleyebileceği, asetat : propiyonat oranını düşürebileceği ortaya konulmuştur. Farklı yapıdaki esansiyel yağlar ile sürfaktan kombinasyonlarının uçucu yağ asiti üzerine olan etkilerinin incelenmesi ile farklı sonuçların ortaya çıkabileceği düşünülmektedir.

Gerçekleştirilen çalışmada yalnızca E6 grubunda kontrol ve diğer uygulamalara göre amonyak azotu yoğunluğunda bir düşüş şekillenmiştir. Daha düşük yoğunlukta eugenol uygulanan E3 grubunda sayısal anlamda düşüş eğilimi şekillenmiş olsa da bu etki istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Çeşitli ruminant besleme koşullarında rumen amonyak azotunun yükselmesine bağlı farklı olumsuzlukların şekillenebileceği bilinmektedir. Ayrıca gerçek proteinlerin rumen seviyesinde deamine edilmesinin önlenmesi yolu ile protein yararlanımını arttırmayı amaçlayan yaklaşımlar mevcuttur. Çalışmada kullanılan ve bir esansiyel yağ olan eugenolün *in-vitro* rumen amonyak azotunu baskılayıcı etkisi tespit edilmiştir. Çeşitli esansiyel yağlar ve sürfaktan kombinasyonu ile *in-vitro* olarak bu yönde etki aranması fayda sağlayacaktır. Daha uzun süreli *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalar ile rumen mikroorganizmalarının bu etkiye direnç geliştirip geliştirmediğinin incelenmesi de bu bileşiklerin etkinliğini kanıtlamak adına faydalı olabilecektir.

Çalışmada kullanılan esansiyel yağ ve sürfaktan uygulamalarından yalnızca polysorbate 80'in 0,5 µl/ml seviyesinde uygulanması *in-vitro* rumen fermentasyon pH'sını düşürmüştür. Diğer uygulamaların *in-vitro* rumen pH seviyesine herhangi bir etkisi tespit edilememiştir. Farklı yem substratları ile bu etkiye yönelik çalışmaların arttırılması ileride gerçekleştirilebilecek *in-vivo* araştırmalar için olumlu olacaktır. Yine farklı esansiyel yağlar ve sürfaktanlar ile rumen fermentasyon sonucu oluşan pH'nın değerlendirilmesi de bu bileşiklerin pH düzenleyicisi olarak değerlendirilmesi açısından önem arz etmektedir.



ÖZET

POLYSORBATE 80 ve EUGENOLÜN IN-VITRO RUMEN FERMENTASYONUNA ETKİLERİ

Yapılan çalışmalarda ruminantların tükettikleri brüt enerjinin yaklaşık olarak %8'i metan oluşumu ile kaybettikleri bildirilmiştir. Ruminantlarda ruminal fermentasyon etkinliğini arttırdığı bildirilen antibiyotik büyüme faktörlerinin kullanımının yasaklanması ile rumen fermentasyonunu daha verimli kılacak farklı yem katkı maddeleri arayışına gidilmiştir. Yapılan çalışmalarda bazı bitki ekstraktlarının antibiyotik büyüme faktörü benzeri etki gösterebileceği tespit edilmiştir. İyonik yapıda olmayan sürfaktanlar ile yapılan çalışmalarda ise bu tür bileşiklerin çeşitli yem maddelerinin rumen yıkımlanabilirliğini arttırabileceği yönünde bulgular mevcuttur. Daha önce gerçekleştirilmiş çalışmalarda sürfaktanların bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkisini güçlendirebilecekleri sonucuna varılmıştır.

Bu araştırma ile bir esansiyel yağ olan Eugenol ile sürfaktan olan Polysorbate 80'in *in-vitro* olarak rumen fermentasyonu ve yemlerin rumen sindirimine olan etkileri iki farklı teknik ile değerlendirilmiştir. Çalışmada yem olarak arpa ve arpa samanı 50:50 oranında kullanılmıştır. Araştırmada Ankom Daisy II inkübatörü ile dört farklı inkübasyon gerçekleştirilerek adı geçen katkıların yemlerin *in-vitro* kuru madde, organik madde ve NDF sindirilebilirliklerine etkileri değerlendirilmiştir.

İn-vitro gerçek kuru madde sindirilebilirliklerinin kontrol grubunda (K) diğer bütün gruplara göre daha yüksek şekillendiği tespit edilmiştir ($p<0.001$). Yalnızca sürfaktan uygulanan gruplarda (S1 ve S2) kuru madde sindirilebilirliği yalnızca eugenol uygulanan gruplara (E3 ve E6) göre daha yüksektir ($p<0.001$). Farklı dozlarda sürfaktan içeren S1 ve S2 grupları arasında kuru madde sindirilebilirliği açısından bir fark gözlenmemiştir, aynı durum farklı dozlarda eugenol içeren E3 ve E6 grupları için de geçerlidir. En düşük kuru madde sindirilebilirliği M3 grubunda şekillenmiştir.

İn-vitro organik madde sindirilebilirliği kontrol grubunda (K) diğer bütün gruplara göre daha yüksek şekillendiği tespit edilmiştir ($p<0.01$). Yalnızca sürfaktan uygulanan gruplarda (S1 ve S2) organik madde sindirilebilirliği yalnızca eugenol uygulanan gruplara (E3 ve E6) ve farklı dozlarda eugenol ve sürfaktan karışımı içeren gruplara (M1, M2, M3, M4) göre daha yüksek şekillenmiştir ($p<0.01$). Farklı dozlarda sürfaktan içeren S1 ve S2

grupları arasında organik madde sindirilebilirliği açısından bir fark gözlenmemiştir, aynı durum farklı dozlarda eugenol içeren E3 ve E6 grupları için de geçerlidir. En düşük organik madde sindirilebilirliği M3 grubunda gözlenmiştir.

In-vitro NDF sindirilebilirliğinin kontrol grubunda (K) diğer bütün gruplara göre daha yüksek şekillendiği tespit edilmiştir ($p<0.001$). Yalnızca sürfaktan uygulanan gruplarda (S1 ve S2) NDF sindirilebilirliği yalnızca eugenol uygulanan gruplara (E3 ve E6) göre daha yüksektir ($p<0.001$). En düşük NDF sindirilebilirliği M1, M3 ve E6 gruplarında şekillenmiştir. Farklı dozlardaki sürfaktan uygulamaları arasında (S1 ve S2) NDF sindirilebilirliği açısından bir fark gözlenmezken, farklı doz eugenol uygulamaları (E3 ve E6) arasında farklılık gözlenmiştir ($p<0.001$).

Araştırma dahilinde kullanılan bir diğer teknik ise *in-vitro* gaz üretim yöntemidir (Menke ve ark., 1979). Bu yöntem ile de ismi geçen katkılar ile *in-vitro* inkübasyona bırakılan yemlerin 24. Saat sonunda her gram yem kuru maddesi için açığa çıkardığı gaz miktarı ve metan gazı miktarı, üreyen gazda bulunan metan gazının yoğunluğu, fermentasyon ortam pH'sı, $\text{NH}_3\text{-N}$ yoğunluğu, uçucu yağ asiti konsantrasyonu ve bu yağ asitlerinin birbirlerine olan oranı değerlendirilmiştir.

Her gram yem kuru maddesi için açığa çıkan gaz miktarı en yüksek olarak K ve S2 gruplarında gözlenmiştir ($p<0.001$). S1 ve S2 grupları arasında gaz üretimi açısından bir farklılık gözlenmemiştir. En düşük gaz üretim miktarları E6, M2, M3 ve M4 gruplarında gözlenmiştir.

In-vitro fermentasyon sonucu 6. saatte üreyen gazda metan yoğunluğu değerlendirilmiştir. En yüksek metan yoğunluğu S1 grubunda tespit edilmiş, K, E6, M1, M3 ve M4 gruplarında da benzer metan yoğunlukları tespit edilmiştir ($p=0.004$). 6-24 saat arasında üreyen gazdaki metan yoğunluklarına bakıldığında en yüksek seviye M4 grubunda gözlenmekle birlikte benzer seviyeler S2, E3, M1, M2 ve M3 gruplarında da gözlenmiştir ($p<0.001$).

Her gram yem kuru maddesi için 24 saat inkübasyon sonunda oluşan toplam net metan gazı miktarı en düşük seviyede M2 grubunda gözlenmekle birlikte E6, M3 ve M4 gruplarında da benzer sonuçlar gözlenmiştir ($p<0.001$). Her bir gram yem maddesinin fermentasyonu için en yüksek seviyede metan gazı üretimi K grubunda gözlenmiş ve S1 ile S2 gruplarında da benzer sonuçlar ortaya çıkmıştır.

Uçucu yağ asitlerine bakıldığında en düşük asetik asit seviyesi E6 grubunda gözlenmiştir ($p<0.001$). En yüksek asetik asit yoğunluğu ise K, S1 ve S2 gruplarında gözlenmiştir ($p<0.001$). Propiyonik asit yoğunluğuna bakıldığında en düşük seviye E6 ve M2 gruplarında gözlenmiştir ($p<0.001$). Diğer gruplardaki propiyonik asit seviyesinde bir fark bulunmamaktadır. Bütirik asit seviyesi en yüksek seviyede M4 grubunda gözlenmekle birlikte E3 grubu hariç diğer gruplar arasında bir fark bulunmamaktadır ($p<0.001$). Toplam uçucu yağ asidi yoğunluklarına bakıldığında en düşük seviye E6

grubunda gözlenmiştir ve bu sonuç E3 grubunda gözlenen sonuca benzerdir ($p<0.001$). Diğer gruplar arasında toplam uçucu yağ asidi yoğunluğu açısından bir fark tespit edilememiştir.

Fermentasyon sonu $\text{NH}_3\text{-N}$ seviyelerine bakıldığında en düşük yoğunluk E6 grubunda gözlenmiştir ($p<0.001$). Diğer gruplar arasında $\text{NH}_3\text{-N}$ yoğunluğu açısından bir farklılık bulunmamaktadır.

Fermentasyon sonu pH değerlerine bakıldığında en düşük seviye S1 grubunda gözlenmekle birlikte S2, E3 ve M1 gruplarında da benzer seviyeler gözlenmiştir ($p<0.001$). Diğer gruplar arasında pH değeri açısından bir farklılık gözlenmemiştir.

Bu araştırma bir sürfaktan olan Polysorbate 80 ve esansiyel yağ olan Eugenol'un ayrı ayrı ve karışım halinde *in-vitro* rumen sindirilebilirliği ve *in-vitro* rumen fermentasyon parametreleri üzerine etkilerini değerlendirmek amacı ile gerçekleştirilmiştir. Polysorbate 80 ve Eugenolün *in-vitro* rumen fermentasyon parametreleri üzerine etkileri bulunduğu tespit edilmiştir. Polysorbate 80 ve Eugenol'un karışım halinde kullanılmasının fermentasyon parametrelerine olan etkileri genel olarak istatistiksel anlamda tek başına kullanılmalarına göre bir fark yaratmamıştır. *In-vitro* sindirilebilirlik parametrelerine bakıldığında Polysorbate 80 ya da Eugenolün kullanıldığı gruplarda genel olarak sindirilebilirlik olumsuz yönde etkilenmiştir. *In-vitro* sindirilebilirlikte gözlenen olumsuz etki Eugenol içeren gruplarda daha da belirginleşmektedir. Bu durum denemede kullanılan dozlar ile ilişkilendirilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bitki Ekstraktları, Eugenol, In-Vitro, Rumen, Sürfaktan.

SUMMARY

EFFECTS OF POLYSORBATE 80 and EUGENOL on IN-VITRO RUMEN FERMENTATION

Studies have revealed that 8 % of the gross energy consumed by ruminants is wasted as methane. Ban on the use of antibiotic growth promoters which increase the rumen fermentation efficiency has caused a quest for new substances which would improve the rumen fermentation efficiency. Studies have shown that some plant extracts would deliver an antibiotic growth promoter-like effect and these compounds would improve the rumen fermentation efficiency. In addition, non-ionic surfactants have shown some positive effects on the rumen degradation of various feedstuffs. Researches in different domains has unveiled that surfactants would increase the antimicrobial effect of plant extracts.

This study aims to show the effects of an essential oil, Eugenol, and a surfactant, Polysorbate 80, on the rumen fermentation and rumen degradability of feeds by using two different techniques. In this study barley and barley straw was used with a proportion of 50 : 50. Ankom Daisy II incubator was used and four different incubations conducted in order to ascertain the effects of different additives on *in-vitro* true dry matter degradability, organic matter degradability and NDF degradability.

In-vitro true dry matter degradability were highest in the control group (K) compared to others ($p < 0.001$). Only surfactant added groups (S1 and S2) had higher true dry matter degradability than the groups which contained only eugenol (E3 and E6) ($p < 0.001$). There was no difference between groups contain only surfactants on different levels (S1 and S2) in terms of true dry matter degradability. There was no difference between groups contain only eugenol (E3 and E6). Lowest true dry matter degradability were seen in the M3 group.

In-vitro organic matter degradability were highest in the control group (K) compared to others ($p < 0.01$). Only surfactant added groups (S1 and S2) had higher organic matter degradability than the groups which contained only eugenol (E3 and E6) and different levels of eugenol and surfactants combinations (M1, M2, M3, M4) ($p < 0.001$). No difference were observed between only surfactant containing groups (S1 and S2) in terms of organic matter degradability. Lowest organic matter degradability was observed in M3 group ($p < 0.001$).

In-vitro NDF degradability were highest in the control group (K) compared to other groups ($p<0.001$). Solely surfactant containing groups (S1 and S2) had higher NDF degradability compared to only eugenol containing groups (E3 and E6) ($p<0.001$). Lowest NDF degradability was observed in the M1, M3 and M6 groups. Groups which contained different levels of surfactant had no difference in terms of NDF degradability. However, a difference was observed between E3 and E6 groups ($p<0.001$).

Another technique which was applied during the research was *in-vitro* gas production (Menke et al., 1979). The objective of the *in-vitro* gas production technique was to investigate the effects of different additives on the gas production per gram of dry matter fermentation in 24 hours, methane production, level of methane in the gas produced during fermentation, pH, $\text{NH}_3\text{-N}$ and some volatile fatty acid levels of the fermentation medium.

Highest gas production for the fermentation of each gram of feed dry matter for 24 hours was observed in K and S2 groups ($p<0.001$). No difference was seen between S1 and S2 groups. Lowest gas production was observed in the E6, M2, M3 and M4 groups.

Methane concentration in the gas which is produced by *in-vitro* rumen fermentation was measured at the 6 hours of fermentation. Highest methane concentration was observed in the S1 group and similar results was obtained from K, E6, M1, M3 and M4 groups ($p=0.004$). Methane level were also measured from gas sample obtained between 6-24 hours of fermentation. Highest methane concentration was observed in M4 group and similar results were also observed in S2, E3, M1, M2 and M3 groups ($p<0.001$).

Lowest methane production for the fermentation of each gram of feed dry matter for 24 hours was observed in M2 group and similar results were also observed in E6, M3 and M4 groups ($p<0.001$). Highest methane production for the fermentation of each gram of feed dry matter for 24 hours was observed in K group and similar results were observed in S1 and S2 groups.

Considering volatile fatty acids, lowest level of acetic acid was observed in the E6 group ($p<0.001$). Highest acetic acid concentration was detected in the K, S1 and S2 groups. Lowest propionic acid level was observed in E6 and M2 groups ($p<0.001$). There was no difference in the other groups in terms of propionic acid concentration. Highest butyric acid concentration was observed in the M4 group and there was no difference between M4 and other groups but E3. Lowest total volatile fatty acid concentration was observed in E6 group and similar result were observed in E3 group ($p<0.001$). No difference was observed between other groups in terms of total volatile fatty acid ($p<0.001$).

Lowest $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration was observed in E6 group ($p<0.001$). No difference was observed between other groups in terms of $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration.

Lowest pH level was observed in S1 group and similar results were also

observed in S2, E3 and M1 groups. No difference observed in other groups in terms of pH levels.

This study was conducted in order to ascertain the effects of Polysorbate 80 and Eugenol separately or in a combination on *in-vitro* rumen fermentation parameters and *in-vitro* rumen degradability of feeds. It was seen that Polysorbate 80 and Eugenol have impacts on *in-vitro* rumen fermentation parameters. Combining Polysorbate 80 and Eugenol generally did not give different results compared to the treatments which have only one of these compounds. Incorporation of Polysorbate 80 or Eugenol has resulted with reduced degradability levels in the groups containing these substances. Reduction in the degradability were more pronounced in the groups containing eugenol. This incorporated with the level of inclusion of these additives.

Key Words: Eugenol, In-Vitro, Plant extract, Rumen, Surfactant.



KAYNAKLAR

- AGARWAL N, SHEKHAR C, KUMAR R, CHAUDHARY LC, KAMRA DN (2009). Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on in vitro methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Anim. Feed Sci. Technol.* **148**: 321–327.
- AHMED MG, EL-ZARKOUNY SZ, EL-SHAZLY KA, SALLAM SMA (2014). Impact of Essential Oils Blend on Methane Emission, Rumen Fermentation Characteristics and Nutrient Digestibility in Barki Sheep. *J. Agric. Sci.* **6**: 144-156.
- AHN G-C, KIM J-H, PARK E-K, OH Y-K, LEE G-Y, LEE J-I, KIM C-M, PARK K-K (2009). Effects of Non-ionic Surfactant Supplementation on Ruminal Fermentation, Nutrient Digestibility and Performance of Beef Steers Fed High-roughage Diets. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **22**: 993-1004.
- ALI HAIMOUD D, VERNAY M, BAYOURTHE C, MONCOULON R (1995). Avoparcin and monensin effects on the digestion of nutrients in dairy cows fed a mixed diet. *Can. J. Anim. Sci.* **75**:379-385.
- ALLEN JD, HARRISON DG (1979). The effect of the dietary addition of monensin upon digestion in the stomachs of sheep. *Proc. Nutr. Soc.* **38**: 32A.
- ARAMBEL MJ, KENT BA, WALTERS JL (1990). Effect of graded levels of dried fermentation extract and cellulase enzyme on fermentation characteristics of nonlactating Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* **73**: 236.
- ARAUJO RC, PIRES AV, MOURAO GB, ABDALLA AL, SALLAM SMA (2011). Use of blanks to determine in-vitro net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers. *Anim. Feed Sci. Technol.* **166**: 155-162.
- ARMENTANO LE (1992). Ruminal hepatic metabolism of volatile fatty acids, lactate and pyruvate. *J. Nutr.* **122**(3):838-842.
- ASANUMA N, IWAMOTO M, HINO T (1999). Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms in vitro. *J. Dairy Sci.* **82**(4):780-787.
- BAAH J, SHELFORD JA, HRISTOV AN, MCALLISTER TA, CHENG KJ (2005). Effects of Polysorbate 80 and fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and digestibility of feeds in Holstein cows. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **18**: 816–824.
- BACH A, CALSAMIGLIA S, STERN MD (2005). Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* **88**:(Suppl. 1): E9-E21.
- BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D, IDAOMAR M (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 446-475.
- BALANDRIN MF, KLOCKE JA (1985). Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science* **228**: 1154–1160.
- BALDWIN RL, ALLISON MJ (1983). Rumen metabolism. *J. Anim. Sci.* **57**: 461-477.
- BALDWIN RL, WOOD WA, EMERY RS (1963). Conversion of glucose-C14 to propionate by the rumen microbiota. *J. Bacteriol.* **85**: 1346-1349.
- BAREL OA, PAYE M, MAIBACH HI (2014) Handbook of Cosmetic Science and Technology, 4th edn. CRC PRESS, U.S.A.

- BARTLEY EE (1976). In: Buffers in Ruminant Physiology and Metabolism. M.S. Weinburg and A.L. Sheffner (Ed.), Church and Dwight, Inc., N.Y. . p. 61-81.
- BEAM TM, JENKINS TC, MOETA PJ, KOHN RA, PALMQUIST DL (2000). Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *J. Dairy Sci.* **83(11)**: 2564-2573.
- BEAUCHEMIN KA, MCGINN SM (2006). Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *J. Anim. Sci.* **84**: 1489-1496.
- BENCHAAR C, PETIT HV, BERTHIAUME R, WHYTE TD, CHOUINARD PY (2006). Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **89**: 4352-4364.
- BENCHAAR C, CHAVES AV, FRASER GR, BEAUCHEMIN KA, MCALLISTER TA (2007). Effects of essential oils and their components on in vitro rumen microbial fermentation. *Can. J. Anim. Sci.* **87(3)**: 413-419.
- BENCHAAR C, CALSAMIGLIA S, CHAVES AV, FRASER GR, COLOMBATTO D, MCALLISTER TA, BEAUCHEMIN KA (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim. Feed Sci. Technol.* **145**: 209-228.
- BERGMAN EN, HEITMANN RN (1978). Metabolism of amino acids by the gut, liver, kidneys, and peripheral tissues. *Fed. Proc.* **37**: 1228-1232.
- BETTS TJ (2001). Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. *J. Chromatogr.* **936**: 33-46.
- BHATTA R, ENISHI O, KURIHARA M (2007). Measurement of methane production from ruminants. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **20(8)**: 1305 – 1318.
- BIRD SH, LENG RA (1978). The effects of defaunation of the rumen on the growth of cattle on low-protein high-energy diets. *Br. J. Nutr.* **40**:163-167.
- BOADI D, BENCHAAR C, CHIQUETTE J, MASSÉ D (2004). Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Can. J. Anim. Sci.* **4**: 319-335.
- BODAS R, PRIETO N, GARCIA-GONZALEZ R, ANDRES S, GIRALDEZ FJ, LOPEZ S (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **176**: 78-93.
- BONHOMME A (1990). Rumen ciliates: their metabolism and relationships with bacteria and their hosts. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **30**: 203-266.
- BOOTTEN TJ, JOBLIN KN, MCARDLE BH, HARRIS PJ (2011). Degradation of lignified secondary cell walls of lucerne (*Medicago sativa* L.) by rumen fungi growing in methanogenic co-culture. *Journal of Applied Microbiology* **111**: 1086-1096.
- BORCHERS R (1965). Proteolytic activity of rumen fluid in vitro. *J. Anim. Sci.* **24**:1033-1038.
- BOWLES EJ (2003). Chemistry of Aromatherapeutic Oils, 3rd Edition. Allen & Unwin, Australia.
- BÖRJESSON J, ENGGVIST M, SIPOS B, TJERNELD F (2007). Effect of poly(ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose. *Enzyme. Microb. Tech.* **41**: 186-195.
- BRODERICK GA, BALTHROP JE (1979). Chemical inhibition of amino acid deamination by ruminal microbes in vitro. *J. Anim. Sci.* **49**: 1101-1111.
- BROWN MS, PONCE CH, PULIKANTI R (2006). Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: Performance and ruminal metabolism. *J. Anim. Sci.* **84**: 25-33.

- BURT S (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *Int. J. Food Microbiol.* **94**: 223–253.
- BUSQUET M, CALSAMIGLIA S, FERRET A, CARRO MD, KAMEL C (2005)a. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* **88**: 4393–4404.
- BUSQUET M, CALSAMIGLIA S, FERRET A, KAMEL C (2005)b. Screening for the effects of natural plant extracts and secondary plant metabolites on rumen microbial fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* **123**: 597–613.
- BUSQUET M, CALSAMIGLIA S, FERRET A, KAMEL C (2006). Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* **89**: 761–771.
- CALLAWAY TR, MARTIN SA (1996). Effects of organic acid and monensin treatment on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation of cracked corn. *J. Anim. Sci.* **74**(8):1982-1989.
- CALSAMIGLIA S, BUSQUET M, CARDOZO PW, CASTILLEJOS L, FERRET A (2007). Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *J. Dairy Sci.* **90**: 2580-2595.
- CALSAMIGLIA S, CASTILLEJOS L, BUSQUET M (2006). Alternatives to antimicrobial growth promoters in cattle. In: *Recent Advances in Animal Nutrition*. Ed: Garnsworthy P.C., Wiseman J., Nottingham University Press, Nottingham, UK, p. 129–167.
- CARDOZO PW, CALSAMIGLIA S, FERRET A, KAMEL C (2005). Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *J. Anim. Sci.* **83**: 2572–2579.
- CARRO MD, RANILLA MJ (2003). Effect of the addition of malate on in vitro rumen fermentation of cereal grains. *Br. J. Nutr.* **89**(2):181-188.
- CASTILLEJOS L, CALSAMIGLIA S, FERRET A, LOSA R (2005). Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Anim. Feed Sci. Technol.* **119**: 29–41.
- CASTILLEJOS L, CALSAMIGLIA S, FERRET A (2006). Effect of essential oils active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems. *J. Dairy Sci.* **89**: 2649–2658.
- CASTILLEJOS L, CALSAMIGLIA S, FERRET A, LOSA R (2007). Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oils compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* **132**: 186–201.
- CASTILLO AR, KEBREAB E, BEEVER DE, FRANCE J (2000). A review of the efficiency of nitrogen utilisation in lactating dairy cows and its relationship with environmental pollution. *J. Anim. Feed Sci.* **9**:1–32.
- CASTILLO-GONZÁLEZ AR, BURROLA-BARRAZA ME, DOMÍNGUEZ-VIVEROS J, CHÁVEZ-MARTÍNEZ A (2014). Rumen microorganisms and fermentation. *Arch. Med. Vet.* **46**: 349-361.
- CHALUPA W (1975). Rumen Bypass and Protection of Proteins and Amino Acids. *J. Dairy Sci.* **58**: 1195-1218.
- CHANDLER PT (1996). Environmental challenges as related to animal agriculture – dairy. In: *Nutrient management of food animals to enhance and protect the environment*. Ed: Kornegay, E.T., CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. p.7-19.
- CHAO SC, YOUNG DG (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *J. Essent. Oil Res.* **12**: 639–649.
- CHAVES AV, HE ML, YANG WZ, HRISTOV AN, MCALLISTER TA, BENCHAAAR C (2008). Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. *Can. J. Anim. Sci.* **88**: 117–122.

- CHEN GJ, SONG SD, WANG BX, ZHANG ZF, PENG ZL, GUO CH, ZHONG JC, WANG Y (2015). Effects of Forage : Concentrate Ratio on Growth Performance, Ruminal Fermentation and Blood Metabolites in Housing feeding Yaks *Asian Australas. J. Anim. Sci.* **28(2)**: 1736-1741.
- CHEN M, WOLIN MJ (1979). Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**: 72-77.
- CHEN Y, ZHANG H, WANG H, YANG K (2011). Effects of Dietary Addition of Non-Ionic Surfactants on Ruminal Metabolism and Nutrient Digestion of Chinese Merino Sheep. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* **6(7)**: 688-696.
- CHENG K-J, AKIN DE, COSTERTON JW (1977). Rumen bacteria: Interaction with particular dietary components and response to dietary variation. *Fed. Proc.* **36**: 193-197.
- CHOW JM, VAN KESSEL JS, RUSSELL JB (1994). Binding of radiolabeled monensin and lasalocid to ruminal microorganisms and feed. *J. Anim. Sci.* **72**: 1630-1635.
- CIMANGA K, KAMBU K, TONA L, APERS S, BRUYNE T, HERMANS N, TOTTE J, PIETERS L, VLIETINCK AJ (2002). Correlation bepolsorbate chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.* **79**: 213-220.
- CONG ZH, TANG SX, TAN ZL, SUN ZH, ZHOU CS, HAN XF, WANG M, REN GP (2009). Effects of different nonionic surfactants on in vitro fermentation characteristics of cereal straws. *J. Anim. Sci.* **87**: 1085-1096.
- COTTA MA, HESPELL RB (1986) Protein and amino acid metabolism of rumen bacteria. In: Control of Digestion and Metabolism in Ruminants. Ed: Milligan, LP, Grovum, WL, Dobson, A Prentice-Hall, New Jersey. p.122-136.
- COTTRELL T, VAN PEIJ J (2004). Sorbitan esters and polysorbates. In: Emulsifiers in Food Technology. Ed: Whitehurst R.J., Blackwell Publishing, Northampton, UK, p. 162-186.
- COUNOTTE GHM, PRINS RA, JANSSEN HAM, DEBIE MJA (1981). Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-¹³C] lactate in the Rumen of Dairy Cattle. *Applied and Environmental Microbiology* **42(4)**: 649-655.
- COX SD, MANN CM, MARKHAM JL, BELL HC, GUSTAFSON JE, WARMINGTON JR, WYLLIE SG (2000). The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* **88**: 170-175.
- COX SD, MANN CM, MARKAM JL (2001). Interaction bepolsorbate components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Microbiol.* **91**: 492-497.
- CROTEAU R, KUTCHAN TM, LEWIS NG (2000). Natural products (secondary metabolites). In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Ed: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones R., American Society of Plant Physiologists. p.165-219.
- CUSHNIE GH, RICHARDSON AJ, SHARMAN GAM (1981). Procedures and equipment for the production and rearing of gnotobiotic lambs. *Laboratory Animals* **15**: 199-204.
- DAVIDSON P.M., NAIDU A.S. (2000). Phyto-phenols. In: Natural Food Antimicrobial Systems. Ed: Naidu, A.S. CRC Press, Boca Raton, FL. p.265- 293
- DE MEYER DI (1981). Rumen microbes and digestion of plantcell walls. *Agric. Environ.* **6**: 295-337.
- DEHORITY BA (1969). Pectin-fermenting bacteria isolated from the bovine rumen. *J. Bacteriol.* **99(1)**: 189-196.
- DEHORITY BA (1984). Evaluation of Subsampling and Fixation Procedures Used for Counting Rumen Protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* **48(1)**: 182-185.

- DEHORITY BA, TIRABASSO PA (1989). Factors Affecting the Migration and Sequestration of Rumen Protozoa in the Family Isotrichidae. *Journal of General Microbiology* **135**: 539-548.
- DEHORITY BA, ORPIN CG (1997) Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. The Rumen Microbial Ecosystem (Hobson PN & Stewart CS, eds), pp.196–245. Elsevier, London
- DEMİRTAŞ A, ÖZTÜRK H, PIŞKIN İ, DEMİRKIRAN D, SALGIRLI Y, FIDANCI UR, EMRE B (2011). Biberiye ve Adaçayı Ekstraktlarının Ruminal Fermantasyon Üzerine Etkilerinin Rumen Simülasyon Tekniği (RUSITEC) ile Araştırılması. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.* **37(2)**: 127-134.
- DENTON BL, DIESE DE, FIRKINS JL, HACKMANN TJ (2015). Accumulation of reserve carbohydrate by protozoa and bacteria in competition for glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 1832–1838.
- DIJKSTRA, J (1994) Production and absorption of volatile fatty acids in the rumen. *Livestock Production Science* **39**: 61–69.
- DINTARAN P, KAMRA DN, PAL D (2000). Changes in rumen fermentation pattern in faunated and defaunated cattle calves on feeding of low protein diet. *Indian J. Dairy Sci.* **53**: 428—433.
- DONG R, ZHAO G (2014). Predicting In Vitro Rumen VFA Production Using CNCPS Carbohydrate Fractions with Multiple Linear Models and Artificial Neural Networks. *PLoS ONE* **9(12)**: e116290.
- DORMAN HJD, DEANS SG (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 308–316.
- DUSKOVA D, MAROUNEK M (2001). Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rumen bacterium *Lachnospira multiparus*. *Applied Microbiology* **33(2)**: 159-163.
- EADIE J, HOBSON PN (1962). Effect of the Presence or Absence of Rumen Ciliate Protozoa on the Total Rumen Bacterial Count in Lambs *Nature* **193**: 503-505.
- EMMANUEL B, LAWLOR MJ VE MCALEESE DM (1969). The rumen buffering system of sheep fed pelleted roughage-concentrate rations. *Br. J. Nutr.* **23**: 805.
- ERWIN ES, MARCO GJ, EMERY EM (1961). Volatile Fatty Acid Analyses of Blood and Rumen Fluid by Gas Chromatography. *J. Dairy Sci.* **44(9)**: 1768–1771.
- ESCHENLAUER SCP, MCKAIN N, WALKER ND, MCEWAN NR, NEWBOLD CJ, WALLACE RJ (2002). Ammonia Production by Ruminal Microorganisms and Enumeration, Isolation, and Characterization of Bacteria Capable of Growth on Peptides and Amino Acids from the Sheep Rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4925-4931.
- EVANS JD, MARTIN SA (2000). Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Curr. Microbiol.* **41**: 336-340.
- FAULKNER DB, KLOPFENSTEIN TJ, TROTTER TN, BRITTON RA (1985). Monensin effects on digestibility, ruminal protein escape and microbial protein synthesis on high fiber diets. *J. Anim. Sci.* **61**:654-660.
- FIGURA N., MARCOLONGO R., CAVALLO G., SANTUCCI A., COLLODEL G., SPREAFICO A., MORETTI E. (2012). Polysorbate 80 and *Helicobacter pylori*: a microbiological and ultrastructural study. *12*: 217.
- FIRKINS JL, REYNOLDS CK (2005). Whole-animal nitrogen balance in cattle. In: Nitrogen and phosphorus nutrition of cattle: reducing the environmental impact of cattle operations. Ed: Pfeffer E., Hristov A.N. CABI Int., Wallingford, UK. p.167–186

- FONDEVILA M, NEWBOLD CJ, HOTTEN PM, ORSKOV ER (1990). A note on the effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the rumen fermentation of sheep fed straw. *Anim. Prod.* **51**: 422-425.
- FONTY G, JOUANY JP, CHAVAROT M, BONNEMOY F, GOUET P (1991) Development of the rumen digestive functions in lambs placed in a sterile isolator a few days after birth. *Reprod Nutr Dev.* **31(5)**:521-528.
- FRANCE J, DIJKSTRA J (2005). Volatile Fatty Acid Production. In: Quantitative Aspects Of Ruminant Digestion And Metabolism. Ed.: Dijkstra J., Forbes J.M., France J., Cabi Publishing, Oxfordshire. pp. 157-175.
- FRASER GR, CHAVES AV, WANG Y, MCALLISTER TA, BEAUCHEMIN KA, BENCHAAAR C (2007). Assessment of the effects of cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems. *J. Dairy Sci.* **90**: 2315–2328.
- FRUMHOLTZ PP, NEWBOLD CJ, WALLACE RJ (1989). Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the fermentation of a basal ration in the rumen simulation technique (Rusitec). *J. Agric. Sci., Camb.* **113**: 169-172.
- GENTHNER BR (1981). Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H₂-CO₂-utilizing species. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**:12-19.
- GERSHENZON J, CROTEAU R (1991). Terpenoids In: Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites. Vol. 1 Ed: Rosenthal G.A. ve Berenbaum M.R., Academic Press, San Diego, CA, p.165–219.
- GOFF HD (1997). Colloidal aspects of ice cream—A review. *Int. Dairy J.* **7**: 363–373.
- GOMEZ-ALARCON R, OLIVEIRS J, HUBER JT (1988). Effect of *Aspergillus oryzae* on in vitro and in situ rumen fermentation. *J. Anim. Sci.* **66**: 638.
- GOTO M, BAE H, YAHAYA MS, KARITA S, WANJAE K, BAAH J, SUGAWARA K, CHENG KJ (2003)a. Effects of surfactant Polysorbate80 on enzymatic accessibility and degradation of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) at different growth stages. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* **16**: 83–87.
- GOTO M, BAE H, YAHAYA MS, KARITA S, WANJAE K, CHENG KJ (2003)b. Effects of Surfactant Polysorbate 80 on Forage Degradability and Microbial Growth on the In vitro Rumen Mixed and Pure Cultures. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **16**: 672-676.
- GOTO M, BAE H, LEE SS, YAHAYA MS, KARITA S, WANJAE K, CHENG KJ (2003)c. Effects of Surfactant Polysorbate 80 on Forage Degradability and Microbial Growth on the In vitro Rumen Mixed and Pure Cultures. *Asian-australas. J. Anim. Sci* **16(5)**: 672-676.
- GREENING RC, LEEDLE JA (1989). Enrichment and isolation of *Acetitomaculum ruminis*, gen. nov., sp. nov.: acetogenic bacteria from the bovine rumen. *Arch Microbiol.* **151**: 399-406.
- GRIFFIN SG, WYLLIE SG, MARKHAM JL, LEACH DN (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragr. J.* **14**: 322–332.
- GRISWOLD KE, HOOVER WH, MILLER WV, THAYNE WV (1996). Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture. *J. Anim. Sci.* **74**: 483– 491.
- GUSTAFSON RH, BOWEN RE (1997). Antibiotic use in animal agriculture. *J. Appl. Microbiol.* **83**: 531–541.
- HA JK, LEE SS, GOTO M, MOON YH, CHENG K-J (2002). Influence of Polysorbate 80 on the Enzyme Distribution in Rumen Liquor and on the Growth of Rumen Bacteria and Fungi. *J. Appl. Anim. Res.* **21**: 129-143.

- HACKMANN TJ, DIESE LE, FIRKINS, JL (2013). Quantifying the responses of mixed rumen microbes to excess carbohydrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 3786–3795.
- HACKMANN TJ, FIRKINS JL (2015). Maximizing efficiency of rumen microbial protein production. *Front. Microbiol.* **6**: 465–481.
- HARRISON GA, HEMKEN RW, DAWSON KA, HARMON RJ, BARKER KB (1988). Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. *J. Dairy Sci.* **71**: 2967–2975.
- HEBRAUD M, FEVRE M (1988). Characterization of Glycoside and Polysaccharide Hydrolases Secreted by the Rumen Anaerobic Fungi *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* and *Piromonas communis*. *Journal of General Microbiology* **134**: 1123–1129.
- HEGARTY R, GERDES R (1998). Hydrogen production and transfer in the rumen. *Rec. Adv. Anim. Nutr.* **12**: 37–44.
- HEGARTY RS (1999). Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Aust. J. Agric. Res.* **50**: 1321–1327.
- HELANDER IM, ALAKOMI H, LATVA-KALA K, MATTILA-SANDHOLM T, POL I, SMID EJ, GORRIS LGM, WRIGHT A (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 3590–3595.
- HELLE SS DUFF SJB, COOPER DG (1993). Effect of surfactants on cellulose hydrolysis. *Biotech. Bioeng.* **42**: 611–617.
- HENDERSON C, HODGKISS W (1973) An electron microscopic study of *Anaerovibrio lipolytica* (strain 5S) and its lipolytic enzyme. *J Gen Microbiol* **76**: 389–393.
- HINO T, RUSSELL JB (1987). Relative contributions of ruminal bacteria and protozoa to the degradation of protein in vitro. *J. Anim. Sci.* **64**(1): 261–270.
- HOEWELL JA, MANGAT M (1978). Enzyme deactivation during cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* **20**: 847–863.
- HOFFMANN C, EVANS CA (1911). The use of spices as preservatives. *J. Ind. Eng. Chem.* **3**: 835–838.
- HOLMBERG K, JÖNNSSON B, KRONBERG B, LINDMAN B (2003). Surfactants and Polymers in Aqueous Solution, 2nd Edn.. John Wiley & Sons, Ltd. pp.157–174.
- HOLTER JB, YOUNG AJ (1992). Methane prediction in dry and lactating Holstein cows. *J Dairy Sci.* **75**(8): 2165–2175.
- HOOK SE, DIJKSTRA J, WRIGHT DG, MCBRIDE BW, FRANCE J. (2012). Modelling the distribution of ciliate protozoa in the reticulo-rumen using linear programming. *J. Dairy Sci.* **95**: 255–265.
- HRISTOV AN, MCALLISTER TA, OLSON ME, CHENG K-J, YANKE LJ, SHELFORD JA (2000). Effect of Polysorbate 80 and salinomycin on ruminal fermentation and nutrient digestion in steers fed a diet containing 70% barley. *Can. J. Anim. Sci.* **80**(2): 363–372.
- HRISTOV AN, IVAN M, NEILL L, MC ALLISTER TA (2003). Evaluation of several potential bioactive agents for reducing protozoal activity in vitro. *Anim. Feed Sci. Tech.* **105**: 163–184.
- HRISTOV AN, JOUANY JP (2005). Factors affecting the efficiency of nitrogen utilization in the rumen. In: Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle: Reducing the Environmental Impact of Cattle Operations. Ed: Pfeffer, E., Hristov A.V., CABI Publishing. p.117–166.
- HUNGATE RE, SMITH W, BAUCHOP T, YU I, RABINOWITZ JC (1970). Formate as an Intermediate in the Bovine Rumen Fermentation. *Journal of Bacteriology* **102**(2): 389–397.

- HUNTINGTON GB (1989). Hepatic urea synthesis and site and rate of urea removal from blood of beef steers fed alfalfa hay or a high concentrate diet. *Can. J. Anim. Sci.* **69**: 215-223.
- HUNTINGTON GB (1997) Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *J Anim Sci.* **75**: 852–867
- HWANG HI, LEE CH, KIM SW, SUNG HG, LEE SY, LEE SS, HONG H, KWAK YC, HA JK (2008). Effects of Mixtures of Polysorbate80 and Cellulolytic Enzymes on Nutrient Digestion and Cellulolytic Bacterial Adhesion. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **11**: 1604 – 1609.
- IMMIG I (1996). The Rumen and Hindgut as Source of Ruminant Methanogenesis. *Environmental Monitoring and Assessment* **42**: 57-72.
- IRFAN M, SHAHI SK, SARMA PK (2015). In vitro synergistic effect of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* MTCC 441 against drug resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Pharm. Sci.* **5**: 113-116.
- IVES SE, TITGEMEYER EC, NAGARAJA TG, DEL BARRIO A, BINDEL DJ, HOLLIS C (2002). Effects of virginiamycin and monensin plus tylosin on ruminal protein metabolism in steers fed corn-based finishing diets with or without wet corn gluten feed. *J. Anim. Sci.* **80**: 3005-3015.
- JACKSON MJ, BEAUDET AL, O'BRIEN WE (1986). Mammalian Urea Cycle Enzymes. *Ann. Rev. Genet.* **20**: 431-464.
- JAHANI-AZIZABADI H, MESGARAN MD, VAKILI AR, REZAYAZDI K, HASHEMI M (2011). Effect of various medicinal plant essential oils obtained from semi-arid climate on rumen fermentation characteristics of a high forage diet using in vitro batch culture. *Afr. J. Microbiol. Res.* **5(27)**: 4812-4819.
- JALC D (2002). Effect of Polysorbate 80 and monensin on ruminal fermentation of the diet containing 70% wheat straw treated by white-rot fungus in artificial rumen. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **115 (11-12)**: 453-457.
- JENKINS TC, WALLACE RJ, MOATE PJ, MOSLEY EE. (2008). Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim. Sci.* **86**: 397-412.
- JOBLIN KN (1999). Ruminal acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. *Aust. J. Agric. Res.* **50**: 1307–1313.
- JOCH M, CERMAK L, HAKL J, HUCKO B, DUSKOVA D, MAROUNEK M (2016). In vitro Screening of Essential Oil Active Compounds for Manipulation of Rumen Fermentation and Methane Mitigation. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* **29(7)**: 952-959.
- JOHNSON DE, WARD GW, RAMSEY JJ (1996). Livestock methane: Current emissions and mitigation Potential in Nutrient management of food animals to enhance and protect the environment. p. 219–234 E. T. Kornegay, ed. Lewis Publishers, New York, NY.
- JOHNSON KA, JOHNSON DE (1995). Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* **73**: 2483–2492.
- JOUANY JP (1996). Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *J. Nutr.* **126**: 1335-1346.
- JOUANY J-P, MORGAVI DR (2007). Use of “natural” products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal* **1**:1443–1466.
- KALEMBA D, KUNICKA A (2003). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Curr. Med. Chem.* **10**: 813-829.
- KAMALAK A, ATALAY AI, OZKAN CO, TATLIYER A, KAYA E (2011). Effects of Essential Oange (*Citrus Sinensis* L.) Oil On Rumen Microbial Fermentation Using In Vitro Gas Production Technique. *J. Anim. Plant Sci.* **21(4)**: 764-769.

- KAMANDE GM, BAAH J, CHENG KJ, MCALLISTER TA, SHELFORD JA (2000). Effects of Polysorbate 60 and Polysorbate 80 on Protease Activity, Thiol Group Reactivity, Protein Adsorption, and Cellulose Degradation by Rumen Microbial Enzymes. *J. Dairy Sci.* **83**: 536-542.
- KAMRA DN (2005). Rumen microbial ecosystem. *Current Science* **89**: 124-135.
- KAMRA DN, ARGARWAL N, CHAUDHARY LC (2005). Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. In: 2nd Int. Conf. Greenhouse Gases Anim. Agric. Ed: Soliva C.R., Takahashi J., Kreuzer M., ETH, Zurich, Switzerland. p.102.
- KAY RNB (1966). The influence of saliva on digestion in ruminants. *World Rev. Nutr. Diet.* **6**: 292-325.
- KESSEL JAS, RUSSELL JB (1996). The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **20(4)**: 205-210.
- KIM CH, KIM JN, HA JK, YUN SG, LEE SS (2004). Effects of dietary addition of surfactant Polysorbate 80 on ruminal fermentation and nutrient digestibility of Hanwoo steers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **17**: 337-342.
- KIM W, GAMO Y, YAHAYA MS, YIMITI W, GOTO M (2005). Pretreatment of surfactant Polysorbate 80 and fibrolytic enzyme influencing volatile fatty acid and methane production of a total mixed ration by mixed rumen microorganisms at in vitro. *Grassland Sci.* **51**: 145-152.
- KIM W, GAMO Y, YAHAYA MS, YIMITI W, GOTO M (2005). Pretreatment of surfactant Polysorbate 80 and fibrolytic enzyme influencing volatile fatty acid and methane production of a total mixed ration by mixed rumen microorganisms at in vitro. *Grassland Sci.* **51**: 145-152.
- KONG Y, XIA Y, SEVIOUR R, FORSTER R, MCALLISTER TA (2013). Biodiversity and composition of methanogenic populations in the rumen of cows fed alfalfa hay or triticale straw. *FEMS Microb. Ecol.* **84**: 302-315.
- KRAUSE DO, RUSSELL JB (1996). How many ruminal bacteria are there? *J. Dairy Sci.* **79-8**: 1467-1475.
- KURAKAKE M, OOSHIMA H, KATO J, HARANO Y (1994). Pretreatment of bagasse by nonionic surfactant for the enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technol.*, **49**: 247-251.
- LAMBERT RJW, SKANDAMIS PN, COOTE P, NYCHAS G-JE (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* **91**: 453-462.
- LAPIERRE H, LOBLEY GE (2001). Nitrogen recycling in the ruminant: A review. *J. Dairy Sci.* **84**(Suppl.):E223-E236.
- LASCANO GJ, HEINRICHS AJ (2009). Rumen fermentation pattern of dairy heifers fed restricted amounts of low, medium, and high concentrate diets without and with yeast culture. *Livestock Science* **124**: 48-57.
- LEE CH, SUNG HG, ESLAMI M, LEE SY, SONG JY, LEE SS, HA JK (2007). Effects of Polysorbate 80 Pretreatment on Dry Matter Disappearance of Rice Straw and Cellulolytic Bacterial Adhesion. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **20(9)**: 1397-1401.
- LEE SS, AHN BH, KIM HS, KIM CH, CHENG K-J, HA J K (2003). Effects of Non-ionic Surfactants on Enzyme Distributions of Rumen Contents, Anaerobic Growth of Rumen Microbes, Rumen Fermentation Characteristics and Performances of Lactating Cows. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **16(1)**: 104-115.
- LEE SS, HA JK (2003). Influences of Surfactant Polysorbate 80 on the Gas Production, Cellulose Digestion and Enzyme Activities by Mixed Rumen Microorganisms. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **16(8)**: 1151-1157.

- LEE SS, KIM HS, MOON YH, CHOI NJ, HA JK (2004). The effects of a non-ionic surfactant on the fermentation characteristics, microbial growth, enzyme activity and digestibility in the rumen of cows. *Anim. Feed. Sci. Tech.* **115**: 37-50.
- LENG RA, NOLAN JV (1984). Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* **67**: 1072-1089.
- LIN B, WANG JH, LU Y, LIANG Q, LIU X (2013). In vitro rumen fermentation and methane production are influenced by active components of essential oils combined with fumarate. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **97**: 1-9.
- LIU K, WANG J, BU D, ZHAO S, MCSWEENEY C, YU P, LI D (2009). Isolation and biochemical characterization of two lipases from metagenomic library of China Holstein cow rumen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **385**: 605-611.
- LIU Q, DONG M, ZHOUA W, AYUB M, ZHANG YP, HUANG S (2004). Improved oil recovery by adsorption-desorption in chemical flooding. *J. Petrol Sci. Eng.* **43**: 75-86.
- LIU Y, CAMACH LM, TANG S, TAN Z, SALEM AZM (2013). Advances in nutritional manipulation rumen functions of surfactants. *Afr. J. Microbiol. Res.* **7**: 1451-1458.
- LOCKWOOD BC, COOMBS GH, WILLIAMS AG (1988). Proteinase Activity in Rumen Ciliate Protozoa. *Journal of General Microbiology* **134**: 2605-2614.
- LOPEZ S, VALDES C, NEWBOLD CJ, WALLACE RJ (1999)a. Influence of sodium fumarate addition on rumen fermentation in vitro. *Br. J. Nutr.* **81**: 59-64.
- LOPEZ S, MCINTOSH FM, WALLACE RJ, NEWBOLD CJ (1999)b. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. *Anim. Feed Sci. Technol.* **78**: 1-9.
- MACHEBOEUF D, MORGAVI DP, PAPON Y, MOUSSET JL, ARTURO-SCHAAN M (2008). Dose-response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumen microbial population. *Anim. Feed Sci. Technol.* **145**: 335-350.
- MACKIE RI, HEATH S (1979). Enumeration and isolation of lactate-utilizing bacteria from the rumen of sheep. *Applied and Environmental Microbiology* **38(3)**: 416-421.
- MACKIE RI, MCSWEENEY CS, AMINOV RI (2013). Rumen, In: Encyclopedia of Life Sciences, <http://www.els.net>, London, John Wiley & Sons, Ltd.
- MAIA MRG, CHAUDHARY LC, BESTWICK CS, RICHARDSON AJ, MCKAIN N, LARSON TR, GRAHAM IA, WALLACE RJ (2010). Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *B.M.C. Microbiology* **10**:52.
- MAKKAR HPS (2003). Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Rumin. Res.* **49**: 241-256.
- MALES JR, PURSER B (1970). Relationship Bepolysorbate Rumen Ammonia Levels and the Microbial Population and Volatile Fatty Acid Proportions in Faunated and Defaunated Sheep. *Appl. Microbiol.* **19**: 485-490.
- MARINI JC, VAN AMBURGH ME (2003). Nitrogen metabolism and recycling in Holstein heifers. *J. Anim. Sci.* **81**: 242-248.
- MARTIN SA (1998). Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. *J. Anim. Sci.* **76**: 3123-3132.
- MARTIN SA, NISBET DJ (1990). Effects of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation of amino acids, bermudagrass and starch by mixed ruminal microorganisms in vitro. *J. Anim. Sci.* **68**: 2142-2149.

- MARTIN SA, NISBET DJ (1992). Effect of direct fed microbials on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* **75**: 1736-1744.
- MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ G, ABECIA L, MARTÍN-GARCÍA AI, RAMOS-MORALES E, HERVÁS G, MOLINA-ALCAIDE E, YÁÑEZ-RUIZ DR (2013). In vitro-in vivo study on the effects of plant compounds on rumen fermentation, microbial abundances and methane emissions in goats. *Animal* **7**(12): 1925-1934.
- MATSUZAKI Y, TSUJISAWA T, NISHIHARA T, NAKAMURA M, KAKINOKI Y (2013). Antifungal activity of chemotype essential oils from rosemary against *Candida albicans*. *Open Journal of Stomatology* **3**: 176-182.
- MC CULLOUGH H (1967). The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin. Chim. Acta.* **17**: 297-304.
- MCALLISTER TA, BAE HD, JONES GA, JONES KJ (1994). Microbial attachments and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.* **72**: 3004-3018.
- MCALLISTER TA, OKINE EK, MATHISON GW, CHENG KJ (1996). Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* **76**(2): 231-244.
- MCALLISTER TA, STANFORD K, BAE HD, TREACHER RJ, HRISTOV AN, BAAH J, SHELFORD JA, CHENG K-J (2000). Effect of a surfactant and exogenous enzymes on digestibility of feed and on growth performance and carcass traits of lambs. *Can. J. Anim. Sci.* **80**: 35-44.
- MCBRIDE BW, KELLY JM (1990). Energy cost of absorption and metabolism in the ruminant gastrointestinal tract and liver: a review. *J. Anim. Sci.* **68**: 2997-3010.
- MCDONALD IW (1958). The utilization of ammonia-nitrogen by the sheep. In: Proceedings of the Australian Society of Animal Production; 2nd Biennial Meeting; February; Melbourne. Armidale, NSW: ASAP: p. 46 - 51.
- MCDUGALL EI (1948). Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem J.* **43**(1): 99-109.
- MCINTOSH FM, WILLIAMS P, LOSA R, WALLACE RJ, BEEVER DA, NEWBOLD CJ (2003). Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5011-5014.
- MENKE KH, RAAB L, SALEWSKI A, STEINGASS H, FRITZ D, SCHNEIDER W (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J. Agric. Sci. Camb.* **93**: 217-222.
- MILLER TL (1991). Biogenic Sources of Methane. In: Microbial Production and Consumption of Greenhouse Gases: Methane, Nitrogen Oxides, and Halomethanes. Ed: Rogers, JE ve Withman, WB American Society for Microbiology, Washington D.C. 175-187.
- MOHAMMED N, AJISAKA N, LILA ZA, MIKUNI K, HARA K, KANDA S, ITABASHI H (2004). Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation in vitro and in steers. *J. Anim. Sci.* **82**: 1839-1846.
- MOLERO R, IBARS M, CALSAMIGLIA S, FERRET A, LOSA R (2004). Effect of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate rations. *Anim. Feed Sci. Technol.* **114**: 91-104.
- MORALES MS, DEHORITY B (2009). Ionized calcium requirement of rumen cellulolytic bacteria. *J. Dairy Sci.* **92**: 5079-5091.
- MUTSVANGWA T, EDWARDS IE, TOPPS JH, PATERSON GFM (1992). The effect of dietary inclusion of yeast culture (YeaSacc) on patterns of rumen fermentation, food intake and growth of intensively fed bulls. *Anim. Prod.* **55**: 35-40.

- NA R, DONG H, ZHU Z, CHEN Y (2013). Effects of Forage Type And Dietary Concentrate to Forage Ratio On Methane Emission and Rumen Fermentation Characteristics of Dairy Cows in China. *Transactions of the Asabe* **56** (3): 1115-1122.
- NAGY JG, TENDERDY RP (1968). Antibacterial action of essential oils of *Artemisia* as an ecological factor. II. Antibacterial action of the volatile oils of *Artemisia tridentata* (big sagebrush) on bacteria from the rumen of mule deer. *Appl. Microbiol.* **16**: 441-444.
- NAM IS, GARNSWORTHY PC (2007). Biohydrogenation Pathways for Linoleic and Linolenic Acids by *Orpinomyces* Rumen Fungus. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **20**: 1694 – 1698.
- NANONA A, SUKSOMBAT W, YANG WZ (2014). Effects of essential oils supplementation on in vitro and in situ feed digestion in beef cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* **196**: 50-59.
- National Research Council. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. National Academy Press. Washington, DC.
- NEWBOLD CJ (2007). Microbial feed additives for ruminants. In: *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*, Ed. Wallace RJ, Chesson A, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. p. 259-278.
- NEWBOLD CJ, MCINTOSCH FM, WILLIAMS P, LOSA R, WALLACE RJ (2004). Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* **114**: 105-112.
- NOLLET L, MBANZAMIHIGO L, DEMEYER D, VERSTRAETE W (1998). Effect of the addition of *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 on reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem after inhibition of methanogenesis by cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* 80. *Anim. Feed Sci. Technol.* **71**: 49-66.
- OELLERMANN SO, ARAMBEL MJ, KENT BA, WALTERS JL (1990). Effect of graded amounts of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility in cattle. *J. Dairy Sci.* **73**: 2412- 2416.
- OH HK, SAKAI T, JONES MB, LONGHURST WM (1967). Effect of various essential oils isolated from Douglas fir needles upon sheep and deer rumen microbial activity. *Appl. Microbiol.* **15**: 777-784.
- OH HK, JONES MB, LONGHURST WM (1968). Comparison of rumen microbial inhibition resulting from various essential oils isolated from relatively unpalatable plant species. *Appl. Microbiol.* **16**: 39-44.
- ORPIN CG (1978). Invasion of Plant Tissue in the Rumen by the Flagellate *Neocallimastix frontalis*. *Journal of General Microbiology* **98**:423-430.
- ORSKOV ER, FLATT WP, MOE W (1968). Fermentation Balance Approach to Estimate Extent Fermentation and Efficiency of Volatile Fatty Acid Formation in Ruminants. *J. Dairy Sci.* **51**(9): 1429-1435.
- OUSSALAH M, CAILLET S, LACROIX M (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **69**: 1046-1055.
- OWENS FN, SECRIST DS, HILL WJ, GILL DR (1998). Acidosis in cattle: a review. *J. ANIM. SCI.* **76**: 275-286.
- OYEDEMI SO, OKOH AI, MABINYA LV, PIROCHENVA G, AFOLAYAN AJ (2009). The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *Afr. J. Biotechnol.* **8**(7): 1280-1286.
- PARK JW, TAKAHATA Y, KAJIUCHI T, AKEHATE T (1992). Effects of nonionic surfactant on enzymatic hydrolysis of used newspaper. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**: 117-120.

- PATRA AK, YU Z (2012). Effects of Essential Oils on Methane Production and Fermentation by, and Abundance and Diversity of, Rumen Microbial Populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 4271-4280.
- PATRA AK, KAMRA DN, AGARWAL N (2005). Effect of spices on rumen fermentation, methanogenesis and protozoa counts in in vitro gas production test. In: Proceedings of the 2nd International Conference of Greenhouse Gases and Animal Agriculture Ed: Soliva C.R., Takahashi J., Kreuzer M., ETH Zurich, Zurich, Switzerland, p.115–118.
- PATRONE V, CAMPANA R, VITTORIA E, BAFFONE W (2009). In Vitro Synergistic Activities of Essential Oils and Surfactants in Combination with Cosmetic Preservatives Against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* **60-4**: 237-241.
- POOS MI, HANSON TL, KLOPFENSTEIN TJ (1979). Monensin effects on diet digestibility, ruminal protein bypass and microbial protein synthesis. *J. Anim. Sci.* **48**:1516-1524
- PRANGE RW, DAVIS CL, CLARK JH (1978). Propionate production in the rumen of Holstein steers fed either a control or a monensin supplemented diet. *J. Anim. Sci.* **46**:1120-1124.
- PRESSMAN BC (1976). Biological applications of ionophores. *Annu. Rev. Biochem.* **45**: 501-503.
- PRESTON TR, LENG RA (1987). Matching ruminant production systems with available resources in the tropics and sub-tropics. Penambul Books, Armidale.
- PRINS RA, VAN RHEENEN DL, VAN'T KLOOSTER AT (1983). Characterization of microbial proteolytic enzymes in the rumen. *J. Microbiol. Serol.* **49**: 585-595.
- PRINS RA (1977) Biochemical activities of gut micro-organisms. In: Microbial Ecology of the Gut. Ed.: Clarke RTJ, Bauchop T Academic Press, New York, p. 73–184.
- PUTNAM DE, SCHWAB CG, SOCHA MT, WHITEHOUSE NL, KIERSTEAD NA, GARTHWAITE BD (1997). Effect of Yeast Culture in the Diets of Early Lactation Dairy Cows on Ruminal Fermentation and Passage of Nitrogen Fractions and Amino Acids to the Small Intestine. *J. Dairy Sci.* **80**: 374-384.
- REESE ET, MAGUIRE A (1968). Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Appl. Microbiol.* **17**: 242-245.
- REGULATION (EC) No 1831/2003 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Official Journal of the European Union. 268: 29-43.
- REYNOLDS CK, KRISTENSEN NB (2008). Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: An asynchronous symbiosis. *J. Anim. Sci.* **86(E. Suppl.)**: E293-E305.
- REZNIK G, VISHWANATH P, PYNN M, SITNIK J, TODD J, WU J, JIANG Y, KEENAN B, CASTLE A, HASKELL R, SMITH T, SOMASUNDARAN P, JARRELL K (2010). Use of sustainable chemistry to produce an acyl amino acid surfactant. *Appl. Environ. Microbiol.*, **86**: 1387-1397.
- ROBINSON PH, CAMPBELL M, FADEL JG (1999). Influence of storage time and temperature on in vitro digestion of neutral detergent fibre at 48 h, and comparison to 48 h in sacco neutral detergent fibre digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.* **80**: 257-266.
- RODWELL VW (2003). Catabolism of Proteins and of Amino Acid Nitrogen In: Harper's Illustrated Biochemistry. 26th edition Ed: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, McGraw-Hill Companies, Inc., USA., p. 237-270.
- ROFIQ MN, GÖRGÜLÜ M (2014). Combination Effect of Clove and Orange Peel Oils on in Vitro Digestion of Dairy Total Mixed Ration Using ANKOM DAISYII Incubator. *J. Adv. Agri. Technol.* **1**: 14-18.

- ROGERS JA, DAVIS CL (1982). Rumen volatile fatty acid production and nutrient utilization in steers fed a diet supplemented with sodium bicarbonate and monensin. *J. Dairy Sci.* **65**: 944-952.
- ROSEN MJ, KUNJAPPU JT (2012). Surfactants and interfacial phenomena (4th ed.). Ed: John Wiley and Sons, New Jersey.
- RUMPLER WV, JOHNSON DE, BATES DB (1986). The effect of high dietary cation concentration on methanogenesis by steers fed diets with and without ionophores. *J. Anim. Sci.* **62**:1737-1741.
- RUSSELL JB, SNIFFEN CJ (1984). Effect of carbon-4 and carbon-5 volatile fatty acids on growth of mixed rumen bacteria in vitro. *J. Dairy Sci.* **67**: 987-994.
- RUSSELL JB, STROBEL HJ, CHEN G (1988). Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *App. Environ. Microbiol.* **54**: 872-877.
- RUSSELL JB, O'CONNOR JD, FOX DG, VAN SOEST PJ, SNIFFEN CJ (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J. Anim Sci* **70**: 3551-3561.
- RUSSEL JB, STROBEL HJ (2005). Microbial Energetics. In: Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism, Ed: Dijkstra, J, Forbes, JM, France J Cabi Publishing, Oxfordshire. p. 229-262.
- RUSSELL JB, MUCK RE, WEIMER PJ (2009). Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. *Microbiol Ecol.* **67(2)**:183-97.
- RUSSELL K, LOBLEY GE, RAWLINGS J, MILLWARD DJ, HARPER EJ (2000). Urea kinetics of a carnivore. *Felix silvestris catus. Br. J. Nutr.* **84**: 597-604.
- RUSSELL JB, WALLACE RJ (1997). "Energy-yielding and energy-consuming reactions," in The Rumen Microbial Ecosystem Ed: Hobson and PN, Stewart CS Blackie Academic & Professional, London. 246-282.
- RYAN W, HENNESSY D, MURPHY JJ, BOLAND TM, SHALLOO L (2011). A model of nitrogen efficiency in contrasting grass-based dairy systems. *J. Dairy Sci.* **94**:1032-1044.
- SALES M, LUCAS F, BLANCHART G (2000). Effects of Ammonia and Amino Acids on the Growth and Proteolytic Activity of Three Species of Rumen Bacteria: *Prevotella Albensis*, *Butyrivibrio Fibrisolvens*, and *Streptococcus Bovis*. *Curr Microbiol.* **40(6)**: 380-386.
- SALTER DN, DANESHAVER K, SMITH RH (1979). The origin of nitrogen incorporated in to compounds in the rumen bacteria of steers given protein- and urea-containing diets. *Br. J. Nutr.* **41**: 197-209.
- SANGWAN NS, FAROOQI AHA, SHABIH F, SANGWAN RS (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Reg.* **34**: 3-21.
- SANTORO GF, CARDOSO MG, GUIMARAES LG, MENDONCA LZ, SOARES MJ (2007). *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* **116**: 283-290.
- SATTER LD, ROFFLER RE (1975). Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **58**: 1219-1237.
- SCHÄREN M, DRONG C, KIRI K, RIEDE S, GARDENER M, MEYER U, HUMMEL J, URICH T, BREVES G, DÄNICKE S (2017). Differential effects of monensin and a blend of essential oils on rumen microbiota composition of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* **100**: 2765-2783.
- SIEVERT SJ, SHAVER, RD (1993). Effects of nonfiber carbohydrate and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on intake, milk production and digestion in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* **71**: 1032-1040.

- SIKKEMA J, BONT JAM, POOLMAN B (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**: 8022–8028.
- SINGER MA (2003). Do mammals, birds, reptiles and fish have similar nitrogen conserving mechanisms? *Comp. Biochem. And Physiol. Part B: Biochem. and Mol. Biol.* **134**: 543-558.
- SINGH A, VAN HAMME JD, WARD OP (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects *Biotechnol. Adv.* **25**: 99-121.
- SINHA RN, RANGANATHAN B (1983). Cellulolytic bacteria in buffalo rumen. *J. Appl. Microbiol.* **54**: 1–6.
- SMITH HW (1965). Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. *J. Pathol. Bacteriol.* **89**: 95-122.
- SMITH-PALMER A, STEWART J, FYFE L (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**: 118–122.
- SNIFFEN CJ, O'CONNOR JD, VAN SOEST PJ, FOX DG, RUSSELL JB (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J Anim. Sci.* **70**: 3562-3577.
- SOYLU EM, SOYLU S, KURT S (2006). Antimicrobial activity of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* **161**: 119–128.
- SPEARS JW (1990). Ionophores and nutrient digestion and absorption in ruminants. *J. Nutr.* **120**: 632-638.
- SPERLING RA, PARAK WJ (2010). Surface modification, functionalization and bio conjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos. T. Roy. Soc. A.* **368**:1333-1383.
- STEWART GS, SMITH CP (2005). Urea nitrogen salvage mechanisms and their relevance to ruminants, non-ruminants and man. *Nutr. Res. Rev.* **18**: 49-62.
- STORM E, ØRSKOV ER (1983). The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants. 1. Large-scale isolation and chemical composition of rumen micro-organisms. *Br. J. Nutr.* **50**: 463-470.
- SULING WJ, O'LEARY WM (1975). Effect of surfactants on antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **8(3)**: 334-343.
- TAF AJ M, KOLANECI V, JUNEK B, MAULBETSCH A, STEINGASS H, DROCHNER W (2005). Influence of Fiber Content and Concentrate Level on Chewing Activity, Ruminal Digestion, Digesta Passage Rate and Nutrient Digestibility in Dairy Cows in Late Lactation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **18(8)**: 1116-1124.
- TAKIGUCHI M, MORI M (1995). Transcriptional regulation of genes for ornithine cycle enzymes. *Biochem. J.* **312**: 649-659.
- TAMMINGA S (1992). Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. *J. Dairy Sci.* **75**: 345-357.
- TAMMINGA S (1979). Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *J. Anim. Sci.* **49**: 1615-1619.
- TAN Z, MURPHY MR (2004). Ammonia production, ammonia absorption, and urea recycling in ruminants. A review. *J. Anim. Feed Sci.* **13**: 389-404.
- TEKELI A, GÜLTEKIN Y, DROCHNER W, STEINGASS H (2015). Efficacy of essence oil supplementation to feeds on volatile fatty acid production. *Rev.MVZ Córdoba* **20**: 4884-4894.
- TEKIPPE JA, TACOMA R, HRISTOV AN, LEE C, OH J, HEYLER KS, CASSIDY TW, VARGA GA, BRAVO D (2013). Effect of essential oils on ruminal fermentation and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **96**: 7892-7903.

- TU M, PAN X, SADDLER JN (2009). Adsorption of cellulase on cellulolytic enzyme lignin from lodgepole pine. *J. Agric. Food. Chem.* **57**: 7771-7778.
- TURINA ADV, NOLAN MV, ZYGADLO JA, PERILLO MA (2006). Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophys. Chem.* **122**: 101–113.
- ULTEE A, BENNIK MHJ, MOEZELAAR R (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1561–1568.
- ULTEE A, KETS EP, SMID EJ (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4606–4610.
- UMA MAHESWAR RAO J, SATYANARAYANA T (2003). Enhanced secretion and low temperature stabilization of a hyperthermostable and Ca²⁺- independent α -amylase of *Geobacillus thermoleovorans* by surfactants. *Lett. Appl. Microbiol.* **36**: 191–196.
- UNGERFELD EM (2015). Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: a meta-analysis. *Front Microbiol.* **6**: 538.
- VAN DE HAAR MJ, ST-PIERRE N (2006). Major Advances in Nutrition: Relevance to the Sustainability of the Dairy Industry. *J. Dairy Sci.* **89**: 1280–1291.
- VAN LINGEN HJ, PLUGGE CM, FADEL JG, KEBREAB E, BANNINK A, DIJKSTRA J (2016). Thermodynamic Driving Force of Hydrogen on Rumen Microbial Metabolism: A Theoretical Investigation. *PLoS ONE* **11**(10): e0161362.
- VAN MAANEN RW, HERBEIN JH, MCGILLIARD AD, YOUNG JW (1978) Effect of monensin on in vivo rumen propionate production and blood glucose kinetics in cattle. *J. Nutr.* **108**:1002-1007.
- VAN NEVEL CJ, DEMEYER DI (1988). Manipulation of rumen fermentation. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Ed: Hobson P.N., Elsevier Applied Science, New York, NY, p. 387–443.
- VAN NEVEL CJ, DEMEYER DI (1996). Control of rumen methanogenesis. *Environ. Monit. Assess.* **42**: 73–97.
- VAN SOEST PJ, ROBERTSON JB, LEWIS BA (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J. Dairy Sci.* **74**: 3583-3597.
- VAN ZWIETEN JT, VAN VUUREN AM, DIJKSTRA J (2008). Effect of nylon bag and protozoa on in vitro corn starch disappearance. *J. Dairy Sci.* **91**: 1133-1139.
- VIPARELLI P, ALFANI F, CANTARELLA M (2001). Experimental validation of a model for [alpha]-chymotrypsin activity in aqueous solutions of surfactant aggregates. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic* **15**: 1-8
- VIRTANEN A (1966). The Biological Fixation of Nitrogen and the Preservation of Fodder in Agriculture, and Their Importance to Human Nutrition. In: *Nobel Lectures, Chemistry 1901-1921*, Elsevier, Amsterdam the netherlands p. 74-103.
- WALLACE RJ, ARTHAUD L, NEWBOLD CJ (1994). Influence of *Yucca shidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* **60**(6):1762-1767.
- WALLACE RJ, ONODERA R, COTTA MA (1997). Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. 2nd Edition. Ed: Hobson, P. N., Stewart C. S., Chapman & Hall, London, UK. 283-328.
- WANG Y, ALEXANDER TW, MCALLISTER TA (2004). In vitro effects of monensin and Polysorbate 80 on ruminal fermentation of barley grain:barley silage-based diets for beef cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* **116**: 197-209.

- WANG Y, GIDD D, GREER D, MCALLISTER TA (2011). Effects of Moisture and a Saponin-based Surfactant during Barley Processing on Growth Performance and Carcass Quality of Feedlot Steers and on In vitro Ruminal Fermentation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **24**: 1690-1698.
- WANG Y, MCALLISTER TA, BAAH J, WILDE R, BEAUCHEMIN KA, RODE LM, SHELFORD JA, KAMANDE GM, CHENG KJ (2003). Effects of Polysorbate 80 on In Vitro Fermentation of Silages and Interactive Effects of Polysorbate 80, Monensin and Exogenous Fibrolytic Enzymes on Growth Performance by Feedlot Cattle. *Asian-Australas J Anim Sci.* **16**(7): 968-978.
- WANG Y, ALEXANDER TW, MCALLISTER TA (2004). In vitro effects of monensin and Polysorbate 80 on ruminal fermentation of barley grain:barley silage-based diets for beef cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* **116**: 197-209.
- WEIMER PJ (1996). Why Don't Ruminal Bacteria Digest Cellulose Faster? *J. Dairy Sci.* **79**:1496-1502
- WEIMER PJ (1998). Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *J. Anim. Sci.* **76**: 3114-3122.
- WERESZKA K, MICHALOWSKI T (2012). The ability of the rumen ciliate protozoan *Diploplastron* affine to digest and ferment starch. *Folia Microbiol.* **57**(4): 375-377.
- WILLIAMS A. (1986). Rumen Holotrich Ciliate Protozoa. *Microbiological Reviews* **50**: 25-49.
- WILLIAMS A.G. VE COLEMAN G.S. (1997). The rumen protozoa. In: Rumen microbes and digestive physiology in ruminants.. Ed: Onodera, R., Itabashi, H., Ushida, K., Yano H., Sasakai Y. 73-139.
- WILLIAMS PP, DAVIS RE, DOETSCH RN, GUTIERREZ J (1961). Physiological studies of the rumen protozoan *Ophryoscolex caudatus* Eberlein. *Appl. Microbiol.* **9**: 405-409.
- WILLIAMS AG, COLEMAN GS (1997). The rumen protozoa. In: The Rumen Microbial Ecosystem, 2nd edn. Ed: Hobson, PN ve Stewart CS. Blackie Academic and Professional, London. p. 73–138.
- WRIGHT PA (1995). Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *J. Exp. Biol.* **198**: 273-281.
- XUE J, DAVIDSON PM, ZHONG Q (2017). Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* growth in milk and cantaloupe juice by thymol nanoemulsions prepared with gelatin and lecithin. *Food Control* **73**: 1499-1506.
- YANG C, ROOKE JA, CABEZA I, ROBERT JW (2016). Nitrate and Inhibition of Ruminal Methanogenesis: Microbial Ecology, Obstacles, and Opportunities for Lowering Methane Emissions from Ruminant Livestock. *Front Microbiol* **7**: 132.
- YANG WZ, BENCHAAAR C, AMETAJ BN, BEAUCHEMIN KA (2010). Dose response to eugenol supplementation in growing beef cattle: Ruminal fermentation and intestinal digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.* **158**: 57-64.
- YARLETT N, HANN AC, LLOYD D (1983). Hydrogenosomes in a mixed isolate of *Isotricha prostoma* and *Isotricha intestinalis* from ovine rumen contents. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* **74**:357-364.
- YAZDI MT, WOODWARD JR, RADFORD A (1990). The cellulase complex of *Neurospora crassa*: activity, stability and release. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1313-1319.
- YILDIZ G, TEKELI A, DROCHNER W, STEINGASS H (2014). Determination of the effects of some plant extracts on rumen fermentation and protozoal counts by hohenheim in-vitro gas production technique. *Int. J. Anim. Veter. Adv.*, **7**(2): 18-26.
- YU P, GOELEMA JO, LEURY BJ, TAMMINGA S, EGAN AR (2002). An analysis of the nutritive value of heat processed legume seeds for animal production using the DVE/OEB model: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* **99**:141–176.

ZENG G, SHI J, YUAN X, LIU J, ZHANG Z, HUANG G, LI J, XI B, LIU H (2006). Effects of Polysorbate 80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes of *Penicillium simplicissimum* isolated from compost. *Enzyme and Microb. Tech.* **39**: 1451–1456.



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Oğuz Berk
Soyadı: Güntürkün
Doğum yeri ve tarihi: Keçiören/Ankara, 04.03.1987
Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti
Medeni Durumu: Bekar
İletişim adresi ve telefonu: o.b.gunturkun@gmail.com
+905358879475

II- Eğitimi

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi – Lisans Eğitimi (2004-2014)
Batıkent Lisesi (2000-2004)
Yabancı Dili: İngilizce

III- Ünvanları

Veteriner Hekim (2010)

IV- Mesleki Deneyimi

Abalıoğlu Yem Soya ve Tekstil A.Ş. (2011-2011)
Matlı Yem A.Ş. (2011-2012)
Nutriline Yem Katkıları (2012-2013)
Ankara Üniversitesi (2013-2016)
DuPont – Danisco Endüstriyel Biyobilimler (2017 -)

V- Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Hekimler Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar

GÜNTÜRKÜN OB, ŞEHU A (2015). Ruminant Beslemede Emülsifiyerlerin Kullanım Olanakları. *Yem Magazin* **74**: 45-50

ÇALIK A, GÜNTÜRKÜN OB (2016). Hayvansal Ürünlerin Vitamin Düzeylerini Artırmaya Yönelik Hayvan Besleme Yöntemleri. *Türkiye Klinikleri J Anim Nutr&Nutr Dis-Special Topics* **2**(3): 71-76.

SIZMAZ Ö, GÜNTÜRKÜN OB, ZENTEK J (2016). A Point on Nutritive Value of Camelina Meal for Broilers: A Review. *Inter. J. Vet. Sci.* **5**(3): 114-117.

GÜNTÜRKÜN OB, ŞEHU A (2017). Yemlerin Hazırlanması ve Üretim Tekniklerinden İleri Gelen Problemler. *Türkiye Klinikleri J Anim Nutr&Nutr Dis-Special Topics* **3**(2): 83-91.

YALCIN S, ONBASILAR İ, GEBEŞ ES, RAMAY MS, GÜNTÜRKÜN OB (2017). Effects of Sepiolite Usage in the Manufacturing of Pellet Concentrate Feeds for Dairy Cattle and Fattening Cattle on Some Production Parameters and Pellet Quality Characteristics. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.* **57**(1): 39-43.

Kongreler

GÜNTÜRKÜN OB, YALÇIN S, SAÇAKLI P, DEMİR T, SIZMAZ Ö, ÇALIK A, AHLAT O (2016). Mikronize Klinoptilolit Broylerlerde Performans, Bağırsak Histomorfolojisi, ve Kemik Parametreleri Üzerine Etkisi. 1st International Animal Nutrition Congress. September, Antalya. (Poster Sunumu)

KÜÇÜKERSAN S, YALÇIN S, SAÇAKLI P, GÜNTÜRKÜN OB, GEBEŞ ES, DİLBER F, PİRPAHAHİ M (2016) Süt İneği Karma Yeminde Mikronize Klinoptilolit Kullanımının Pelet Kalitesi ve Üretim Parametreleri Üzerine Etkisi. 1st International Animal Nutrition Congress. September, Antalya. (Poster Sunumu)

VII- Bilimsel Etkinlikler

Seminerler

1. Ruminant Yemlerinde Organik Minerallerin Kullanımı
2. İyonik Olmayan Sürfaktanların Rumen Fermentasyonuna Etkisi

VIII- Diğer Bilgiler

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası 06 – 15 Ocak 2014

