

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NARENCİYE FLAVONOİD EKSTRAKTLARININ RUMEN FERMANTASYON PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Uğur SÜER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAYVAN BESLEME VE BESLENME HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Mustafa Selçuk ALATAŞ

KONYA-2025

T. C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NARENCİYE FLAVONOİD EKSTRAKTLARININ RUMEN FERMANTASYON PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Uğur SÜER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAYVAN BESLEME VE BESLENME HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Mustafa Selçuk Alataş

KONYA-2025

ÖNSÖZ

Ruminant besleme beşerî alanda temel protein kaynağı olarak kabul edilir. Artan insan nüfusunun protein ihtiyacını karşılamak amacı ile besleme ve üremeyi de artıracak araştırmalar yapılmaktadır. Gelişen teknoloji sayesinde birçok bitkisel ürün yan ürünlerinin hayvan beslemede kullanılabilirliği araştırmaya konu olmuştur. Akdeniz bölgesi narenciye açısından oldukça zengin bir coğrafik alan olarak kabul edilir. Narenciye ürünlerinin doğrudan veya yan ürün olarak ortaya çıkan ürünlerin hayvan beslemede önemi üzerine araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Bu tez çalışmasında narenciye ekstresinin rumen fermentasyon parametrelerine olan etkisi in vitro şartlarda incelenmiştir. Bu tez çalışmasında narenciye ekstresinin olası ruminant beslemede yeri ve önemi hakkında bilgiler edinilmeye çalışılmıştır.

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimim süresince ilgi ve deneyimlerinden faydalandığım tez danışmanım Prof. Dr. Mustafa Selçuk ALATAŞ başta olmak üzere, Prof. Dr. Huzur Derya ARIK, Prof. Dr. Erdoğan ŞEKER, Prof. Dr. Fatma İNAL, Prof. Dr. Tahir BALEVİ, Prof. Dr. Varol KURTOĞLU, Prof. Dr. Nurettin GÜLŞEN, Prof. Dr. Cavit ARSLAN, Prof. Dr. Emel GÜRBÜZ, Doç. Dr. Esat Sami POLAT, Doç. Dr. Oğuzhan KAHRAMAN, Araş. Gör. Safa İNANÇ ve Melahat ÇELİK'e teşekkür ederim.

Uğur SÜER

Mayıs / 2025

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	iii
ÖZET	iv
SUMMARY	v
1. GİRİŞ	1
1.1. Rumen ve Fizyolojisi	1
1.2. Narenciye ve Rumen Fermentasyon Parametreleri.....	3
1.3. İyonofor Antibiyotikler	5
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	7
2.1. Gereç	7
2.1.1. Yem Materyali	7
2.1.2. Hayvan Materyali.....	7
2.2. Yöntem.....	7
2.2.1. Deneme 1: İn vitro Gaz Sistemi ile Rumen Fermentasyon Özelliklerinin Belirlenmesi	8
2.2.2. İn vitro Rumen Ortam Sıvısı Analizleri.....	10
2.2.3. Deneme 2: İn Vitro Sindirim Değerlendirilmesi (DAİSY İnkübatör)	11
2.2.4. İstatistik Analizler	15
3. BULGULAR.....	16
3.1. Rumen pH'sı üzerine etkisi.....	16
3.2. Rumen amonyak (NH ₃ -N) seviyesi üzerine etkisi	17
3.3. Rumen uçucu yağ asitleri üzerine etkisi	18
3.4. İn vitro gaz üretimi üzerine etkisi	19
3.5. İn vitro gaz üretim sistemi ile belirlenen fermentasyon kinetiği parametrelerine etkisi...	20
3.6. Daisy inkübatörde belirlenen sonuçlar üzerine etkisi	21
4. TARTIŞMA	22
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	29
6. KAYNAKLAR	30
7. EKLER.....	34
EK-A: Etik Kurul Kararı.....	34
EK-B: Turnitin Raporu	35
8. ÖZGEÇMİŞ.....	36

SİMGELER VE KISALTMALAR

CH₄: Metan

CO₂: Karbon dioksit

NH₃-N: Amonyak

KM: Kuru madde

HK: Ham kül

HP: Ham protein

HY: Ham yağ

OM: Organik madde

OMS: Organik madde sindirimi

IVGS_{KM}: İn vitro gerçek kuru madde sindirilebilirliği

IVNDFS_{KM}: İn vitro kuru madde düzeyinde nötral deterjan fiber sindirilebilirliği

IVOMS_{KM}: Kuru madde düzeyinde in vitro gerçek organik madde sindirilebilirliği

TMR_{KAB}-K: Kaba yem ağırlıklı TMR kontrol grubu (negatif kontrol)

TMR_{KON}-K: Konsantre yem ağırlıklı TMR kontrol grubu (negatif kontrol)

TMR_{KAB}-C2,5: %2,5 narenciye ekstraktlı kaba yem ağırlıklı TMR grubu

TMR_{KON}-C2,5: %2,5 narenciye ekstraktlı konsantre yem ağırlıklı TMR grubu

TMR_{KAB}-C5: %5 narenciye ekstraktlı kaba yem ağırlıklı TMR grubu

TMR_{KON}-C5: %5 narenciye ekstraktlı konsantre yem ağırlıklı TMR grubu

TMR_{KAB}-M: Monensin eklenen kaba yem ağırlıklı TMR grubu (pozitif kontrol)

TMR_{KON}-M: Monensin eklenen konsantre yem ağırlıklı TMR grubu (pozitif kontrol)

L: Litre

mL Mililitre

UYA: Uçucu yağ asitleri

TUYA: Toplam uçucu yağ asitleri

As/Pr: Asetik asit / Propiyonik asit

LAG: Gaz üretimine başlama zamanı

VF: Maksimum gaz üretimi

Kd: Fermentasyon hızı oranı

EYKD: En yüksek fermentasyon hızı oranına ulaşılan zaman

MBP_{24s}: 24 saatlik inkübasyonda üretilen mikrobiyal biyokütle

ÖZET

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Narenciye Flavonoid Ekstraktlarının Rumen Fermantasyon Parametreleri Üzerine Etkileri

Uğur SÜER

Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/KONYA-2024

Bu tez çalışmasının amacı *in vitro* ortamda rumen içeriğine narenciye (*citrus*) ekstresi (%2,5; %5) ilavesinin pH, amonyak (NH₃-N), uçucu yağ asitleri (UYA), *in vitro* gaz üretimi, fermentasyon kinetikleri ile *in vitro* kuru madde nötral deterjan lif sindirilebilirliği (IVNDFS_{KM}), gerçek sindirilebilirliği (IVGS_{KM}) ve organik madde sindirilebilirliği (IVOMS_{KM}) üzerine etkisini belirlemektir.

Araştırmada kaba yem ağırlıklı TMR (TMR_{kaba}; 30g yonca, 30g mısır silajı, 15g mısır, 15g arpa, 15g buğday; Kaba/Kesif yem oranı 60/40) ile konsantre yem ağırlıklı TMR (TMR_{kon}; 20g yonca, 20g mısır silajı, 20g mısır, 20g arpa, 20g buğday; Kaba/Kesif yem oranı 40/60) hazırlanarak *in vitro* ortamda substrat kaynağı olarak kullanıldı. Araştırmada gruplar; hiçbir katkı eklenmemiş kontrol grubu, ticari (Elito® Smart kimya; su ekstraktı) narenciye (*citrus*) flavonoid ekstraktının iki farklı dozunun (%2,5 ve %5) kullanıldığı deneme grupları ile iyonofor antibiyotiklerden monensin'in (Sigma Chemical Co.) 30 ppm düzeyinde eklendiği bir de pozitif kontrol grubu ile deneme düzeni oluşturuldu (2 TMR x 4 Grup). *In vitro* rumen ortamının oluşturulmasında gerekli olan rumen sıvısı yaklaşık 650 kg canlı ağırlığında rumen kanüllü iki adet Holstein inekten temin edildi. Araştırmada *in vitro* ortamdan 6., 12. ve 24. saatlerde alınan rumen sıvısı örneklerinin pH değerleri TMR grupları arası istatistiki bir fark (p>0,05) belirlenmezken narenciye ekstraktı (özellikle de %5) eklenen grupların 24. saat pH (p<0,006) ve NH₃-N (p<0,001) değerleri diğer gruplara göre daha düşük olduğu belirlendi. 6., 12. ve 24. saatlerde alınan rumen sıvısı örneklerinin NH₃-N değerleri ile toplam *in vitro* gaz üretimlerinde TMR tipi ile ortama katılan ekstrakt ve monensin grupları arasında bir etkileşim görülmedi (p>0,05). TMR çeşidi fark etmeksizin ekstrakt eklenen gruplarda daha fazla TUYA (p<0,024) ve *in vitro* gaz üretimi (p<0,001) gözlenirken daha az metan üretimi (p<0,022) belirlendi. Farklı TMR çeşidi ve ekstrakt ve monensin eklenen CO₂ üretimine etki etmediği belirlendi (p>0,05). Monensin ilave edilen gruplarda maksimum gaz üretim değerleri (VF, mL) en düşük hesaplandı (p<0,001). Mikrobiyal kütle üretimi (MBP₂₄, mg/g) ekstrakt eklenen bütün gruplarda fazla bulunurken monensin ilave edilen gruplarda daha düşük hesaplandı (p<0,001). Kontrol grubuna göre %IVGS_{KM} değerinde narenciye ekstraktı ve monensin eklenen gruplarda azalmalar belirlendi (p<0,001).

Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde narenciye (*citrus*) flavonoidlerinin iyonofor antibiyotiklerine bir alternatif olabileceği görülmektedir. *In vitro* denemeden elde edilen bu sonuçların farklı ekstraksiyon yöntemleri ve değişen dozlar kullanılmak suretiyle *in vivo* çalışmalarla daha detaylı bir şekilde araştırılarak desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Rumen, narenciye (*citrus*) ekstraktı, flavonoid, *in vitro*, fermentasyon kinetiği

SUMMARY

REPUBLIC of TÜRKİYE
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Effects of Citrus Flavonoid Extracts on Rumen Fermentation Parameters

Uğur SÜER

Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases

MASTER THESIS/KONYA-2025

The aim of this thesis study was to determine the effect of citrus extract (2.5%; 5%) addition to rumen contents on pH, ammonia (NH₃-N), volatile fatty acids (VFA), *in vitro* gas production, fermentation kinetics and *in vitro* dry matter neutral detergent fibre digestibility (IVNDFD_{DM}), true digestibility (IVTD_{DM}) and organic matter digestibility (IVOMD_{DM}).

In the study, forage-weighted TMR (TMR_{kaba}; 30g alfalfa, 30g maize silage, 15g maize, 15g barley, 15g wheat; forage/concentrate ratio 60/40) and concentrate-weighted TMR (TMR_{kon}; 20g alfalfa, 20g maize silage, 20g maize, 20g barley, 20g wheat; forage/concentrate ratio 40/60) were prepared and used as substrate source *in vitro*. In the study, groups were formed as a control group without any additive, experimental groups in which two different doses (2.5% and 5%) of a commercial (Elito® Smart chemistry; water extract) citrus flavonoid extract were added and a positive control group in which monensin (Sigma Chemical Co.), one of the ionophoric antibiotics, was added at a level of 30 ppm (2 TMR x 4 groups). The rumen fluid required to create the *in vitro* rumen environment was obtained from two rumen cannulated Holstein cows with a live weight of approximately 650 kg. In the study, the pH values of the rumen fluid samples taken from the *in vitro* environment at 6, 12 and 24 hours were not statistically different ($p>0.05$) between the TMR groups, while the 24-hour pH ($p<0.006$) and NH₃-N ($p<0.001$) values of the groups to which citrus extract (especially 5%) was added were lower than the other groups. At 6, 12 and 24 h, there was no interaction between TMR type and extract and monensin groups for ammonia (NH₃-N) values and total *in vitro* gas production of rumen fluid samples ($p>0.05$). Regardless of TMR type, more total volatile fatty acids (TVFA; $p<0.024$) and *in vitro* gas production ($p<0.001$) and less methane production ($p<0.022$) were observed in the extract-supplemented groups. It was found that different TMR cultivars and extracts and monensin had no effect on CO₂ production ($p>0.05$). Maximum gas production values (VF, mL) were lowest in the monensin supplemented groups ($p<0.001$). Microbial biomass production (MBP₂₄, mg/g) was higher in all extract supplemented groups and lower in monensin supplemented groups ($p<0.001$). Compared to the control group, the %IVTD_{DM} value decreased in the citrus extract and monensin added groups ($p<0.001$).

When the results of the study are evaluated, it is seen that citrus flavonoids may be an alternative to ionophoric antibiotics. It is considered that these results from *in vitro* studies should be supported by more detailed *in vivo* studies using different extraction methods and varying doses.

Keywords: Rumen, citrus extract, flavonoids, *in vitro*, fermentation kinetics

1. GİRİŞ

1.1. Rumen ve Fizyolojisi

Ruminantlarda (geviş getirenler) mide; rumen (işkembe), retikulum (börkenek), omasum (kırkbayır) ve abomasum (şirden) olmak üzere dört bölümden oluşur. İlk üç bölüm kutan mukozaya sahipken, son bölüm glandüler mukozaya sahiptir. Rumen en büyük mide bölümüdür ve karın boşluğunun sol tarafında bulunur. Bu bölüm fermentatif sindirimin büyük oranda gerçekleştiği bölümdür. Rumenin iç yüzü mukozal çıkıntılar olan papilla ruminis ile kaplıdır (Berardinelli ve ark 2014). Sığırlarda toplam mide hacminin yaklaşık %80'nini rumen, %5'ni retikulum, %8'ini omasum ve %7'sini abomasum oluşturur. Yetişkin bir sığırdaki mide karın boşluğunun yaklaşık %75'ini oluşturur ve rumen tek başına canlı hayvan ağırlığının yaklaşık %6'sına karşılık gelir. Rumenin hacimsel kapasitesi küçük boy sığırlarda 100-150 L, orta boy sığırlarda 130-160 L ve büyük boy sığırlarda 120-300 L kadar hacim kapsar. Sığırlarda genel ortalama olarak rumenin 150-200 L civarında hacim kapsadığı ifade edilmiştir (Maria ve Membrive 2016).

Ruminantların sindirim sistemlerinin anatomik yapısı ve fizyolojik fonksiyonları tek mideli canlılardan oldukça farklıdır. Ruminantlar fonksiyonel olarak monogastrik doğarlar (Öztürk ve Gür 2021). Buzağılarda doğum sonrası ilk 3-8 haftalık dönemde ön midelerin gelişim hızının, tüm vücudun gelişim hızından 4-8 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Gülşen 2020). Doğumdan sonraki 8-12 hafta içinde ise rumen tam olarak selülitik etkinliği erişmektedir (Gümüş ve Küçükersan 2018). Ruminantlarda glandüler yapı göstermeyen ilk üç mide bölümünü rumen, retikülüm ile omasumdan oluşurken, abomasum bezli mideyi oluşturur. Ruminantlar yemler ile almış oldukları besinleri retikulo-rumen sistemlerinde bulunan mikroorganizmalarca (protozoa, bakteri, maya-mantar, archaea) salgılanan enzimler sayesinde fermentasyona maruz bırakarak sindirilebilir şekle getirirler (Arslan ve Çelebi 2017). Bu durum ruminantlara doğada en bol bulunan ve diğer memeliler ile insanların sindiremediği veya yetersiz sindirdiği pektin, hemiselüloz, selüloz ve lignin gibi maddelerden besin maddesi olarak yararlanmayı sağlar. Rumen, kaba ve sindirilmemiş olan düşük özgül ağırlığa sahip kaba yem ve gazın toplandığı dorsal kese ve daha yüksek özgül ağırlığa sahip hapsedilmiş ve sindirilmiş kaba yemin çöktildiği ventral kese olmak üzere iki bölümden oluşur. Rumen mikroorganizmalarının etkili bir şekilde fermentasyon sağlayabilmesi için sıcaklığı 38-40 °C arasında değişir (Öztürk ve Gür 2021). Bir mililitre rumen içeriğinde yaklaşık 10^{10} – 10^{11} bakteri ve 10^5 – 10^6 protozoa bulunur. Ruminal mikroorganizmalar alınan karbonhidratlardan asetik,

propiyonik ve bütirik asit üretilirler. Bu asitler rumende hızla iyonize formları olan asetat, propiyonat ve bütirata dönüşür. Ruminantlarda rumende fermente edilerek oluşturulan uçucu yağ asitleri (UYA; asetik asi, propiyonik asit, isobütirik asit, bütirik asit, isovalerik asit, valerik asit), hidrojen ve karbondioksit dönüştürülür (Maria ve Membrive 2016, Arslan ve Çelebi 2017). Rumende metan üreten metanojen mikroorganizmalar için hidrojen en önemli enerji kaynağıdır ve karbondioksiti metana indirgemek için hidrojeni kullanırlar (Keser ve Kutay 2021). UYA, hayvanın enerji ihtiyacının yaklaşık %80'ini karşılamaktadır (Öztürk ve Gür 2021).

Sığırlarda geğirme sindirim fermentasyonu ile oluşan rumen gazlarının atılması için işleyen fizyolojik bir işlemdir. Yetişkin sığırlar saatte yaklaşık 30-50 L gaz üretirler. Rumen gazları genel olarak %0,2 hidrojen, %0,5 oksijen, %7 azot, %26,8 metan ve %65,5 karbondioksitten oluşur. Oluşan gazlar geğirme yolu ile dışarı atılırken, bu mekanizma ruminantların hayatta kalması için hayati ve temel bir fizyolojik mekanizmadır (Maria ve Membrive 2016). Karbondioksit, rumende mikrobiyal faaliyetler veya tükürük ile kandan rumene giren bikarbonatın, asitleri nötralize etmesi sonucu üretilir (Nagaraja 2016). Rumende, fermentatif sindirim süreci sırasında yüksek miktarda metan (CH₄) üreten büyük bir metanojenik mikroorganizma grubu bulunur (Maria ve Membrive 2016). Metan üreten mikroorganizmalar Archaea grubunun üyeleridir ve filogenetik olarak bakteri, protozoa ve mantarlardan farklıdır. Yapılarında peptidoglikan içermezler ve oldukça farklı lipid yapılarına sahiptirler. Metan üreten mikroorganizmaların rumendeki bakteri popülasyonunun yaklaşık %2-4'ünü oluşturduğu düşünülmektedir (Owens ve Basalan 2016). Metan üretimi, rumen içindeki aşırı hidrojen iyonlarının dış ortama salınmasını sağlar. Bu durum ruminal pH'ın korunması sağlar. Metan, ruminal boşlukta birikemez ve ruktus (geğirme) yolu ile dışarı atılır. Yetişkin bir sığırın bir günde yaklaşık olarak 500-1000 L gaz çıkardığı bildirilmiştir (Maria ve Membrive 2016). Fermentasyon sonucu ortaya çıkan hidrojen ve karbondioksit, metanojenik rumen mikroorganizmalarınca metan gazına (metanogenezis) dönüştürülür. Atmosfere bırakılan metan gazı ise küresel ısınmaya katkı sağlayarak eko sisteme zarar vermektedir. Dünyada bir yıllık küresel metan gazı üretiminin %19'unun hayvancılık kaynaklığı olduğu ve bu oranın %95-97'sinin ruminantlardan ve %3-5'inin ise tek mideli hayvanlardan kaynaklandığı bildirilmiştir (Arslan ve Çelebi 2017). Bir sığır yılda yaklaşık olarak 80-110 kg metan üretir. Bu oran sığır başına düşük olarak kabul edilmekle birlikte, sayılarının fazlalığı küresel oranı yükseltmektedir (Koyuncu ve Akgün 2018).

Kolay sindirilebilir karbonhidratları içeren rasyonların, hayvanları alıştırmaksızın ani olarak fazla miktarda verilmesi veya hayvan tarafından alınması rumen mikroflorasında değişime neden olur. Bu durumda rumen fermantasyonu üzerinde değişimlere neden olarak rumen pH değerinde düşmeye neden olur. Rumen asidozu ruminantlarda en sık gözlenen beslenme kaynaklı sindirim sistemi hastalığıdır. Sağlıklı bir inekte rumen pH değeri 5.5-7 arasında değişir. Rumen pH değerinde alt sınır olarak 5,6 olarak kabul edilir. Akut asidoz durumlarında bu değer 5.0'ın altına kadar düşebilir. pH değerindeki düşmenin nedeni olarak laktik asit birikimi kabul edilmektedir. Rumen pH düzeyi ise rumende oluşan uçucu yağ asitleri, rumen epitelinden bikarbonat üretimi/salınımı, tükürüğün tamponlayıcı etkisi, uçucu yağ asitlerinin rumenden Emilimi ve sindirim sisteminin devamına gönderilmesi ile dengede tutulur. Rumende bulunan amonyak (NH_3), tamponlayıcı maddeler arasında bulunur (Öztürk ve Pişkin 2009). Ruminantlarca alınan azotun yaklaşık %60-90'ı rumen bakterilerince amonyağa (NH_3) dönüştürülür. Ancak rumende oluşan amonyağın geneli iyonize (NH_4) formdadır. Rumende yeni bakterilerin oluşumunda kullanılan azotun %50-70'inin amonyaktan temin edildiği düşünülmektedir. Rumen mikroorganizmalarının fonksiyonlarında amonyak üretimi ile kullanımı arasında bir denge bulunmaktadır. Ruminantlarda en önemli protein olmayan azot kaynağı ise üredir. Rumende üretilen amonyak rumen duvarınca emilerek karaciğere taşınır. Karaciğerde ise amonyak üreye dönüştürülür ve idrar ile vücut dışına atılır. Ancak ruminantlarda üre rasyonda bulunarak, tükürüğün bir parçası olarak ve kan dolaşımında bulunan ürenin ruminal duvardan rumene geçmesi ile sürekli rumene gelir. Rumende üreaz sayesinde ise hızla amonyak ve karbondioksit dönüştürülür. Bu mekanizmaya ruminantlarda üre geri dönüşüm süreci denir (Maria ve Membrive 2016).

1.2. Narenciye ve Rumen Fermentasyon Parametreleri

Dünyada narenciye olarak en fazla portakal üretilirken (*Citrus sinensis*, %67,8), bunu mandalina (*C. reticulate*, %17,9), limon (*C. limon*, %6,3) ve greylort (*C. paradise*, %5,0) takip etmektedir (Tayengwa ve Mapiye 2018). Türkiye'de ise narenciye üretimi 1930'lu yıllardan sonra hızlı bir gelişim göstermiştir. Narenciye ürünlerinden en fazla portakal üretimi yapılırken, bunu mandalina, limon, greylort ve turunc üretimi takip etmektedir. En fazla ağacın ise Akdeniz bölgesinde (portakal üretiminin %92) bulunmaktadır (Bedestenci ve Vuruş 2000). Türkiye narenciye üretiminde dünyada 9. sıradadır (Atlı ve Söyler 2018) ve narenciye üretiminin yaklaşık %37'sini ihraç etmektedir (Aras ve ark 2016). Türkiye'de 2014-2023 yılları arasında yapılan çalışmada toplam narenciye ağac sayısının yaklaşık 50 milyon adete (portakal: 13,2 milyon, mandalina: 20,2 milyon, limon: 15,4 milyon, greylort: 1 milyon, turunc: 70 bin) eriştiği

belirtilmiştir (Kaya ve Ateş 2024). Narenciye ürünleri insan tüketiminde taze olarak tüketilmekle birlikte, gıda sanayisinde işlenerek reçel, meyve suyu, gazlı içecek, bazı gıda ürünlerine katkı maddesi (Atlı ve Söyler 2018), konsantre, marmelat, likör, narenciye tozları ve sanayi artıklarının hayvan yemi ve pektin olarak tüketilmektedir (Tortopoğlu 1980). Narenciye posası, taze meyvelerden meyve suyu çıkarıldıktan sonra kalan kısım olarak bilinir. Posa, taze meyve ağırlığının %50-70'ini (%60-65: kabuk, %30-35: iç doku, %0-10: çekirdek) oluşturur (Tayengwa ve Mapiye 2018). Narenciye kabuklarının ise değişik oranlarda karotenoid bileşikler, askorbik asit ile fenolik bileşikler içerdiği ve antioksidan etki gösterebildiği belirtilmiştir (Güzel ve Akpınar 2017).

Ruminant beslemede birçok bitkisel sanayi yan ürünlerinin önemi ve kullanılabilirliği ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmada meyve suyu üretim tesislerince üretilen tonlarca narenciye posalarının hayvan beslemede kullanılabileceği bildirilmiştir (Başar ve Atalay 2020). Ruminant beslemede narenciye meyveleri taze doğranmış şekilde veya silolanmış olarak kullanılabilmektedir. Taze narenciye posası, yaklaşık olarak %13-18 kuru madde içerir. Posa fazla miktarda su içerdiğinden uzun süreli bekletilememektedir. Bu nedenle kurutulması veya silaj yapılması önerilmektedir (Gemalmaz ve Bilal 2016). Narenciye posalarının çok fazla yetiştirildiği tropik bölgelerde ruminantlar için kaba yem kaynağı veya pelet yemi olarak kullanılabildiği belirtilmiştir. Besi sığırı rasyonlarına ilave olarak peletlenmiş narenciye posası verildiğinde, hayvanlarda enerji alımını artırabileceği ve mikrobiyal protein sentezini destekleyeceği ifade edilmiştir (Kutlu ve Serbester 2014). Boğa rasyonlarına narenciye ekstresi ilavesinin antioksidan ve antienflamatuar etkileri nedeni ile daha iyi rumen sağlığına neden olduğu (Paniagua ve ark 2018), turunçgil flavonoidleri ile takviye edilen ve yüksek konsantre rasyonla beslenen boğaların verimliliğinin yanı sıra hayvan davranışının ve refahının iyileştirilmesinde rol oynayabileceği (Paniagua ve ark 2019) ve keçilerde rasyonlarına enerji kaynağı olarak turunçgil posası ilavesinin büyümeyi ve gebeliği artırdığı ifade edilmiştir (Olomola ve ark 2008). Besi kuzu rasyonlarına farklı dozlarda (100, 500 ve 1000 mg/kg) portakal esansiyel yağı ilavesi değerlendirildiğinde büyüme performansı ve karkas özelliklerine etkisi açısından monensinden daha etkili olduğu, rumen morfometri üzerine belirgin etkisinin olmadığı ve kuzularda verimi artırmak için kullanılabileceği ifade edilmiştir (Junior ve ark 2024). Narenciye meyvelerinin rumen fermentasyon parametrelerine etkisi ile çalışmalar yapılmıştır. Meyve işleme endüstrisinin yan ürünlerinden olan turunçgil posasının pektin açısından zengin olduğu, sağmal ineklerin rasyonlarına ilave edildiğinde süt yağını artırabileceği, rumen pH'sı üzerine farklı (yükselme veya düşme) etkiler gösterse de sonuçta

stabil tutulmasına yardımcı olabileceği ifade edilmiştir (Rodrigues 2016). Konsantre yemlere turunçgil posası ilavesi ile beslenen rumen kanüllü ineklerin rumen pH değerinin, beslemeden sonraki ilk 12 saat süresince 6 ve üzeri olduğu bildirilmiştir (Millen ve ark 2016). Rasyonlarına sarımsak ile narenciye ekstresi ilavesi yapılan süt sığırlarında metan üretiminin azaldığı, rumen pH, uçucu yağ asitleri, amonyak ve karbondioksit oluşumu üzerine etkisinin olmadığı ifade edilmiştir (Khurana ve ark 2023). Farklı narenciye posalarının ruminantlar için besin değerinin incelendiği *in vitro* araştırmada; posaların yüksek metabolik enerjiye ve organik madde sindirilebilirliğine sahip olduğu, ruminantlar için yem kaynağı olarak yüksek bir potansiyele sahip olduğu, ancak narenciye posalarının ham protein oranlarının dikkate alınması gerektiği ve narenciye posaları rasyona dahil edilmesi düşünüldüğünde ek ham protein kaynakları ilave edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Güven ve Kamalak 2017). Narenciye posası silajlarının genellikle organik madde, organik madde sindirilebilirliği ve metabolik enerji açısından iyi kalitede olduğu, ancak silaja mısır eklenmesi gerektiği bildirilmiştir (Ülger ve ark 2020). Ruminantlarda narenciye posası, kaliteli kuru yonca otu ve konsantre yemle birlikte verildiğinde süt verimini yükseltebileceği bildirilmiştir. Kuru narenciye posasının sığır karma yemi rasyonuna %10 oranına kadar ilave edilebileceği bildirilmiştir (Gemalmaz ve Bilal 2016). Yapılan silaj çalışmasında turunçgil posalarının tek başına silolanarak ruminant yemi olarak kullanılabileceği, böylece atıkların değerlendirilmesiyle çevre kirliliğini azaltılabileceği ve hayvancılık ekonomisine katkı sağlayabileceği ifade edilmiştir (Beyzi ve ark 2018). Narenciye meyvelerinden elde edilen bazı ürünlerin ise veteriner sahada yavru ruminantlarda giardiosis ve ishal gibi sindirim sistemi hastalıkları tedavisinde kullanımı ile ilgili olumlu bilgiler de rapor edilmiştir (Dominguez-Vigil ve ark 2015, Alıç Ural ve ark 2021, Alıç Ural ve ark 2022).

1.3. İyonofor Antibiyotikler

İyonofor antibiyotikler (monensin, salinomisin vs) özellikle gram pozitif bakterilerde hücre duvarında iyon geçişlerini bozarak etki gösterirler. Ruminantlara oral uygulama ile rumen bakterilerinin gram negatif bakteriler yönünde artmasını sağlar. Uygulama sonrasında ruminantlarda glikoz üretimini sağlayan propiyonik asit üreten bakteri sayısı artar. Hayvanda kan keton düzeyi azalırken, kan glikoz düzeyi yükselir ve sonuçta ketozis insidensi düşer. Bu neden ile sığırlarda gebeliğin son dönemi veya erken laktasyon döneminde monensin içeren sürekli salınım yapan ticari ürün (Kexxtone; rumen içi sürekli salımlı rumen içi cihaz) uygulandığında ketozis görülme riskini azaltmaktadır. Ancak kanserojenik etkileri nedeni ile kullanımı yasaklanmakla birlikte, Tarım Orman Bakanlığı web sitesinde ticari ürünün satış ruhsatı bulunmaktadır (HBS-Tarbil 2024, Yazar 2024). Diğer yandan ruminant rasyonlarına

iyonofor antibiyotik ilavesinin metan oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (Johnson ve Johnson 1995, Gür ve Öztürk 2021, Coşkun ve Yazar 2029). Bu etkisi rumen ortamında artan gram negatif bakteri sayısı sonucu metan üretimini baskılaması ile ilişkilendirilmektedir. Sonuçta rumende laktik asit, asetik asit, bütirik asit, formik asit ve hidrojen üreten bakteri sayısı azalırken, süksinik asit ve propiyonik asit üreten bakterileri oranı artmaktadır. Yapılan çalışmalarda metan oluşumunu azaltmak amacı ile en fazla monensin kullanıldığı, ancak lasolisid, tetronasin, lizosellin, narasin, salinomisin ve laidomisin gibi iyonofor antibiyotiklerinde benzer etkiler gösterebileceği ifade edilmiştir (Boadi ve ark 2004, Meral ve Biricik 2013, Coşkun ve Yazar 2019).

Yapılan literatür taramalarında bazı narenciye sanayi yan ürünleri içeren bitki ekstralarının rasyona ilave edilmesinin sindirim sistemi fizyolojisini değiştirebildiği (Sallam ve Abdelgaleil 2010, Millen ve ark 2016, Rodrigues 2016, Paniagua ve ark 2018, Paniagua ve ark 2019) dikkate alındığında, *in vitro* ortamda rumen içeriğine narenciye ekstresi ilavesinin fermentasyon parametrelerini etkileyebileceği hipoteze edildi.

Bu tez çalışmasının amacı *in vitro* ortamda rumen içeriğine narenciye (*citrus*) ekstresi (%2,5; %5) ilavesinin pH, amonyak, uçucu yağ asitleri, *in vitro* gaz üretimi, fermentasyon kinetikleri ile *in vitro* kuru madde nötral deterjan fiber sindirilebilirliği, gerçek kuru madde sindirilebilirliği ve gerçek organik madde sindirilebilirliği üzerine etkisini belirlemektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Yem Materyali

Araştırmada iki farklı TMR karışımları hazırlanarak *in vitro* ortamda substrat kaynağı olarak kullanıldı. Çalışmada kullanılan yem maddelerinden, kaba yem kaynağı olarak mısır silajı ve yonca kuru otu kullanılırken kesif yem kaynağı olarak mısır, arpa ve buğday taneleri kullanıldı. Araştırmada kullanılan kuru yem maddeleri Retsch® yem öğütücüsünde (Retsch GmbH, Haan, Germany) homojen bir şekilde 1 mm'lik elek kullanılarak öğütüldü. Öğütülen bu yem maddelerinden kaba yem ağırlıklı TMR: (TMR_{kaba}; 30 g yonca, 30 g mısır silajı, 15 g mısır, 15 g arpa, 15 g buğday; Kaba/Kesif yem oranı 60/40) ile konsantre yem ağırlıklı TMR: (TMR_{kon}; 20 g yonca, 20 g mısır silajı, 20 g mısır, 20 g arpa, 20 g buğday; Kaba/Kesif yem oranı 40/60) örnekleri hazırlandı.

2.1.2. Hayvan Materyali

In vitro rumen fermentasyon parametreleri denemelerinin belirlenebilmesi için rumen şartlarının oluşturulmasında gerekli olan rumen sıvısı Prof. Dr. Hümeysra Özgen Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde bulunan yaklaşık 650 kg canlı ağırlığındaki iki adet rumen kanüllü süt ineğinden temin edildi. Araştırmanın *in vitro* rumen denemelerinde kullanılan kanüllü inekler hayvanların yaşama payı ve günlük 500 g canlı ağırlık artışı sağlayacak şekilde kuru yonca, mısır silajı, buğday samanı ve %18 ham protein, 2750 kcal/kg metabolik enerji içeren karma yem karışımı ile NRC verileri dikkate alınarak beslendi (NRC 2001). Hayvanların vitamin ve mineral ihtiyaçlarının sağlanması için vitamin–mineral blokları yerleştirilerek, taze ve temiz su devamlı olarak sağlandı.

2.2. Yöntem

Araştırmada gruplar iki farklı TMR çeşidi substrat olarak hiçbir katkı eklenmemiş kontrol grubu, ticari (Elito® Smart kimya; su ekstraktı) narenciye (*citrus*) flavonoid ekstraktlarının iki farklı dozunun (%2,5 ve %5) kullanıldığı deneme grupları ile iyonofor antibiyotiklerden monensin'in (Sigma Chemical Co.) 30 ppm (Xue ve ark 2021) düzeyinde eklendiği bir de pozitif kontrol grubu ile deneme düzeni oluşturuldu (2 TMR x 4 Grup).

2.2.1. Deneme 1: *İn vitro* Gaz Sistemi ile Rumen Fermentasyon Özelliklerinin Belirlenmesi

İn vitro Gaz Üretim Tekniği için Rumen Sıvısının Alınması

Vakum pompalı sıvı alma sistemi ile yemlemeden 3 saat sonra kanül aracılığıyla rumenin farklı kısımlarından sonda yardımıyla analiz için rumen sıvısı alındı. Alınan rumen sıvısı termosu konularak sıcak zincir altında mümkün olduğunca hızlı bir şekilde laboratuvara getirildi. Çift kat tülbentten vakum yardımıyla süzülen rumen sıvısı özel doldurma şişesine konularak ince bir hortum yardımıyla şişelerin içerisine CO₂ gazı verildi. Rumen sıvısının bütün uygulamalarda aynı kişi tarafından alınmasına gayret edilerek oluşabilecek değişkenlik en aza indirilmeye çalışıldı.



Şekil 1. *İn vitro* gaz üretim tekniği için kanüllü inekten rumen sıvısının alınması.

Çözeltilerin Hazırlanması

Makromineral Çözeltisi;

Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)'tan 5,7 g; potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)'tan 6,2 g ve magnezyum sülfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)'tan 0,6 g tartılıp saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Rumen tampon çözeltisi sodyum bikarbonat (NaHCO_3)'tan 35 g ve amonyum bikarbonat ($(\text{NH}_4) \text{HCO}_3$)'tan 4 g tartılıp saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Mikromineral Çözeltisi;

Kalsiyum klorit ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)'ten 13,2 g; mangan klorit ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)'ten 10,0 g; kobalt klorit ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)'ten 1,0 g ve demir klorit ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)'ten 8,0 g tartılıp saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Redüksiyon çözeltisi sodyum sülfat ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)'ten 0,625 g tartılıp üzerine 1 N NaOH'den 4 mL koyuldu ve saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak her deneme günü taze olarak hazırlandı.

Resazurin Çözeltisi;

%0,1'lik (ağırlık/hacim) olarak hazırlandı.

İn vitro Gaz Üretim Tekniği için İnkübasyon Vasatının Hazırlanması

Denemede toplam grupların (2TMR x 4 Grup) gaz oluşum değerlerinin tespitinde kullanılan *in vitro* ortam Menke ve Steingass (1988)'in bildirdiği metoda göre hazırlandı. Özetle: Denemede kullanılan iki farklı TMR'ler 100 mL'lik pyrex şişelere 460 ± 5 mg miktarında tartılarak ve en az 12 saat öncesinden 39°C 'ye ayarlı inkübatörde bekletildi. Kontrol grubunu sadece TMR tartılan şişeler oluştururken, ticari olarak alınan narenciye ekstraktının (Elito® Smart kimya; su ekstrasyon metodu ile elde edilmiş) %2,5 ve %5'i gibi iki farklı doz halinde şişelere eklenmesiyle de deneme grupları oluşturuldu. Ayrıca monensin sodyum tuzu 30 ppm düzeyinde (Xue ve ark 2021) farklı şişelere eklenen bir de pozitif kontrol grup oluşturuldu. Deneme günü tartım yapılan pyrex şişelere 20 mL rumen sıvısı ve 40 mL tampon çözeltisi eklenerek inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında fermentasyona bağlı olarak oluşan gaz basınçları yardımıyla gaz miktarı dolaylı olarak hesaplandı (Lopez ve ark 2007). Otomatik modüler *in vitro* gaz sistemi içerisinde sensörlerden alınan bilgiler eşzamanlı olarak ekranda grafiksel olarak gösterip gerekli hesaplamaları gerçekleştirebilen ve sonuçları standart formatta raporlayan bir bilgisayar yazılımı bulunmaktadır. Bu yazılım sayesinde modüllerden 5 dakika aralıklarla basınç ve sıcaklık veri sonuçları alındı ve numunelerin inkübasyon başlangıcından itibaren gaz oluşturma kapasiteleri ve gaz oluşum hızları belirlendi.



Şekil 2. *In vitro* gaz üretim hazırlığı ve sonrası rumen sıvılarının pH ölçümleri.

2.2.2. *In vitro* Rumen Ortam Sıvısı Analizleri

pH değerinin belirlenmesi; İnkübatöre konulan, içerisinde yem numunesi ve inkübasyon vasatı bulunan şişe içeriklerinin 6., 12. ve 24. saat sonunda pH değerleri dijital pH metre yardımıyla (HI 8314, Hanna Inst, Portekiz) belirlendi.

Amonyak azotu tayini ($NH_3\cdot N$); İnkübatöre konulan, içerisinde yem numunesi ve inkübasyon vasatı bulunan şişe içeriklerinden 6., 12. ve 24. saatlik inkübasyon sonunda 5 mL alınarak 1 mL konsantre H_2SO_4 ile karıştırıldı. 2590 rpm’de 20 dakika santrifüj edildikten sonra 1 mL supernatant alınarak $NH_3\cdot N$ düzeyleri 625 nm’de spektrofotometrik olarak Weatherburn (1967)’ün bildirdiği metoda göre belirlendi.



Şekil 3. *In vitro* ortam içeriklerinde $NH_3\cdot N$ düzeylerinin belirlenmesi.

Uçucu yağ asitleri (UYA) tayini; İnkübatöre konulan, içerisinde yem numunesi, ekstrakt ve inkübasyon vasatı bulunan şişe içeriklerinden 24 saatlik inkübasyon sonunda asetik, propiyonik, isobütirik, bütirik, isovalerik ve valerik asit ile toplam UYA konsantrasyonları için pipetle 5 mL alınarak santrifüj tüpüne konuldu. Üzerine 1 mL %25'lik metafosforik asit ilave edilerek karıştırıldı ve 30 dakika bekletildi. Daha sonra 2000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant daha sonra UYA düzeyleri gaz kromatografi (Agilent 6890N GC, USA) ile DB-FFAP kapiller kolonu (30 m × 320 µm × 1.00 µm; Agilent J&W GC column) kullanılarak FID dedektör yardımıyla okundu. Özetle analiz günü tüplerin üzerinden 1 mL numune alınarak viallere yerleştirildi ve otomatik enjeksiyon sistemi ile 1 µL boyutunda numune alıcısı ile dozlandı. Gaz kromatografi (Agilent 6890N GC, ABD) ile DB-FFAP kapiller kolonu (30 m × 320 µm × 1.00 µm; Agilent J&W GC column) kullanılarak FID dedektör yardımıyla ölçüm yapıldı. Kolon fırınının sıcaklığı izotermal olarak 60 °C'de 5 dakika, sonrasında dakikada 5 °C artırılarak 140 °C'ye yükseltildi. Enjektör sıcaklığı 250 °C iken dedektör sıcaklığı 300 °C'ye ayarlandı (Supelco 1998). Standart olarak Supelco, Volatile fatty acid mix CRM46975 karışımı kullanıldı.

Tahmini metan üretimi (Moss ve ark 2000) ve karbondioksit (Blümmel ve ark 1999) miktarları stochiometrik olarak aşağıdaki formüller ile hesaplandı.

Metan (CH₄), mmol/L = 0.45*Asetik asit - 0.275*Propiyonik asit + 0.40*Bütirik asit

Karbon dioksit (CO₂), mmol/L = Asetik asi/2 + Propiyonik asit /4 + 1.5*Bütirik asit

2.2.3. Deneme 2: *In Vitro* Sindirim Değerlendirilmesi (DAİSY İnkübatör)

Filtre Kese ve Numunelerin Hazırlanması;

F57 (Ankom®) filtre keseleri aseton ile üç ila beş dakika önce yıkanıp daha sonra hava ile kurutuldu. Sonrasında her F57 filtre keseleri tartılarak ağırlığı (W1) kaydedildi. Darasını sıfırlanıp 0,5 g numune (W2) her iki TMR grubundan eşit sayıda doğrudan filtre keselere konuldu.

Keseler sıcak mühürleme ile kitlendi ve Daisy İnkübatör sindirim kavanozuna kavanoz başına en fazla 25 numune olacak şekilde yerleştirildi. Numuneler, sindirim kavanozu bölücüsünün her iki tarafına eşit olarak dağıtıldı. Düzeltme faktörü (CI) için kavanozlara en az bir adet kapalı torba eklendi.



Şekil 4. *In vitro* sindirim değerlendirmesi için filtre kese ve numunelerin hazırlanması.

Birleştirilmiş Tampon Çözeltisinin Hazırlanması (Her iki sindirim kavanozu için)

A) 39 °C önceden ısıtılan her iki tampon çözeltisi (A ve B) ayrı bir kaptan, 1330 mL A çözeltisine 266 mL B çözeltisi ilave edildi (1/5 oranında). A'dan B'ye 39 °C'de 6,8 pH olacak şekilde ayarlandı. Her sindirim kavanozuna 1600 mL kombine A/B karışımı eklendi.

B) Sindirim kavanozlarını numuneler ve tampon çözeltisi ile daisy inkübatöre yerleştirildi. Cihazın ısıtıcı ve karıştırıcısı çalıştırıldı. Sindirim kavanozlarının sıcaklıkları dengelenene kadar en az yirmi ila otuz dakika kadar beklendi.

Tablo 1. Daisy'de *in vitro* ortamın oluşturulmasında kullanılan kimyasallar;

Tampon çözeltisi A	g/L
KH ₂ PO ₄	10,0
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,5
NaCl	0,5
CaCl ₂ •2H ₂ O	0,1
Üre	0,5
Tampon çözeltisi B	g/L
NaB ₂ CO ₃	15,0
NaB ₂ S•9HB ₂ O	1,0



Şekil 5. Daisy inkübatöre numunelerin konulması.

İnokulum Hazırlanması ve İnkübasyon

Tüm cam eşyalar 39 °C’de muhafaza edildi. İki litrelik termos şişeler 39°C’lik su ile doldurularak önceden ısıtıldı. Rumen sıvısının toplanmasından hemen önce ısıtılmış su boşaltıldı. Uygun toplama prosedürünü kullanarak, en az 2000 mL rumen inokulum çıkarıldı ve elde edilen rumen içeriği süzmeden termosa uygun şekilde yerleştirildi. Bir karıştırıcı 39°C su ile doldurularak önceden ısıtıldı. Rumen sıvısını termostan dökmeden hemen önce ısıtılmış suyu boşaltıldı. Karıştırıcı kabı CO₂ uygulayarak anaerobite sağlandı.

Karıştırılmış rumen içeriği dört tabakalı tülbentten geçirilerek beş litrelik önceden 39°C’de ısıtılmış bir şişeye süzüldü. Bu aktarım sırasında CO₂ verilmeye devam edildi. Daisy inkübatörden sindirim kavanozlarından birini çıkarıp 400 mL süzölmüş rumen içeriği tampon çözeltisine ve numunelere eklendi. Daisy inkübatörde bulunan 4 farklı kavanoz içerisine eşit sayıda araştırmada oluşturulmuş 2 farklı TMR’ler konularak *in vitro* gaz üretim tekniğinde kullanılan grup ve dozlarda 4 farklı ortam oluşturuldu. Daisy inkübatörde hiçbir şey eklenmeyen kontrol grubu, narenciye (*citrus*) flavonoid ekstraktlarının iki farklı dozunun (kullanılan substrat %2,5 ve %5) eklendiği deneme grupları ile iyonofor antibiyotiklerden

monensinin (Sigma Chemical Co.) 30 ppm (Xue ve ark 2021) düzeyinde eklendiği bir de pozitif kontrol grubu oluşturuldu (2TMR x 4 Grup).

Sindirim kavanozuna 30 sn CO₂ uygulandı ve kapağı sabitlendi. Kullanılacak diğer kavanozlara da aynı işlem yapılarak 48 saat inkübasyona bırakıldı. Daisy inkübatörü 39,5°C ± 0,5 sıcaklıkta inkübasyon işlemi tamamlanıncaya kadar çalıştırıldı. İnkübasyon sonrası kavanozlar boşaltıldı. Keseler su berrak olana kadar musluğun altında yıkandı. Daha sonra daisy inkübatörden çıkan keseler 105 °C’de kurutularak tartıldı. Daha sonra ANKOM fiber Analyzer cihazına yerleştirilerek NDF düzeyleri belirlendi. *İn vitro* inkübasyon sonrası NDF ağırlığı belirlendi (W3). Daha sonra darası alınan porselen kül krozeleri ile eşleştirilen torbalar kül fırınına yerleştirildi ve 550 °C’de 4 saat yakıldı. Kül fırınından desikatöre yerleştirilen krozeler oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi ve tartılarak keselerdeki numunelerin külleri belirlendi. IVNDFS_{KM}, IVGS_{KM} ve IVOMS_{KM} değerleri aşağıda verilen formüller ile inkübasyon öncesi ile sonrası değerleri kullanılarak hesaplandı.

Hesaplama

$$\%IVGS_{KM} = 100 - ((W3 - (W1 * C1)) / (W2 * \%KM_{yem})) * 100$$

$$\%IVOMS_{KM} = 100 - ((W4 - (W1 * C1)) / (W2 * \%OM_{yem})) * 100$$

$$\%IVNDFS_{KM} = 100 * [(W2 * \%NDF_{yem}) - (W3 - (W1 * C1))] / (W2 * \%KM_{yem})$$

W1: Torba ağırlığı

W2: Numune ağırlığı

W3: Son ağırlık (Torba ağırlığı + Yem)

W4: W3-kül (OM ağırlığı)

OM_{yem}: Yemdeki % OM

KM_{yem}: Yemdeki % KM

C1: Boş torba için düzeltme faktörü

24. saatteki mikrobiyal biyokütle üretimi (MBP; mg/g, KM) Blümmel ve ark (1997)’a göre hesaplandı.

$$MBP \text{ (mg/g, KM)} = IVGS - (G\ddot{U}_{24} * 2,2)$$

G $\ddot{U}_{24}$: 24 saatlik toplam gaz üretimi gaz üretimi

2.2.4. İstatistik Analizler

Araştırma sonucu elde edilen *in vitro* gaz üretim ve daisy inkübatör denemesine ait rumen parametrelerine ilişkin elde edilen veriler (IVNDFS_{KM}, IVGS_{KM}, ve IVOMS_{KM} değerleri; gaz üretim miktarları, rumen pH, amonyak ve uçucu yağ asitleri sonuçları) normal dağılım gösterdiği Shapiro-Wilk testi ile varyansların homojen dağılım değerlendirilmesi de Levene testi kullanılarak belirlendi. Normal ve homojen dağılım gösteren sonuçlar normallik ve homojenliği kontrol edildikten sonra faktöriyel deneme tertibi gereği varyans analizine göre istatistiki analizi yapıldı. Ortalamalar arasındaki farklılıklar Tukey çoklu karşılaştırma metodu kullanılarak test edildi. Araştırmada elde edilen veriler 2 x 4 faktöriyel desende multi-varyans analizine göre “Genel Doğrusal Model” (General Linear Model) kullanıldı. Araştırmada substrat çeşidi olarak kaba yem ağırlık TMR ve konsantre yem ağırlıklı TMR ile faktör olarak hiçbir katkı eklenmeme, 2 farklı narenciye (*citrus*) ekstraktı dozu ve monensin eklenme durumu arasındaki etkileşim (interaksiyon) miks modelin (Proc. Mixed) kesin faktörleri (fixed factors) olarak ele alındı.

Tüm veriler için tanımlayıcı istatistikler, aritmetik ortalama ve ortalamanın standart sapması sunuldu. $P < 0,05$ değeri istatistiki açıdan önem sınırı kabul edildi (SPSS 29; IBM SPSS Statistics for Windows, Version 29.0. Armonk, NY: IBM Corp).

3. BULGULAR

3.1. Rumen pH'sı üzerine etkisi

Deneme gruplarına ait *in vitro* inkübasyonu sonrası farklı saatlerdeki ölçülen pH değerleri ait veriler Tablo 2’de sunuldu.

Tablo 2. Deneme gruplarının *in vitro* inkübasyonu sonrası farklı saatlerdeki ölçülen pH değerleri (Ort.±SD).

GRUPLAR	6.saat	12.saat	24.saat
TMR _{KAB-K}	6,93±0,09	6,89±0,07	6,73±0,03 ^{ab}
TMR _{KON-K}	6,91±0,12	6,82±0,08	6,73±0,04 ^{ab}
TMR _{KAB-C2,5}	6,86±0,03	6,73±0,15	6,50±0,26 ^c
TMR _{KON-C2,5}	6,91±0,01	6,66±0,23	6,45±0,23 ^c
TMR _{KAB-C5}	6,82±0,05	6,63±0,28	6,43±0,24 ^{cd}
TMR _{KON-C5}	6,83±0,2	6,59±0,34	6,37±0,30 ^d
TMR _{KAB-M}	6,93±0,12	6,78±0,14	6,77±0,04 ^a
TMR _{KON-M}	6,92±0,12	6,82±0,08	6,76±0,03 ^a
TOTAL	6,89±0,10	6,74±0,19	6,59±0,22
ANOVA----- <i>p</i> < -----			
TMR _{kaba&kon}	0,873	0,667	0,696
Faktör	0,405	0,175	0,006
TMR x Faktör	0,957	0,959	0,989

TMR_{KAB_K}: Kaba yem ağırlıklı TMR kontrol grubu (negatif kontrol); TMR_{KON-K}: Konsantre yem ağırlıklı TMR kontrol grubu (negatif kontrol); TMR_{KAB-C2,5}: %2,5 Narenciye ekstraktlı kaba yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KON-C2,5}: %2,5 Narenciye ekstraktlı konsantre yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KAB-C5}: %5 Narenciye ekstraktlı kaba yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KON-C5}: %5 Narenciye ekstraktlı konsantre yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KAB-M}: Monensin eklenen kaba yem ağırlıklı TMR grubu (pozitif kontrol); TMR_{KON-M}: Monensin eklenen konsantre yem ağırlıklı TMR grubu (pozitif kontrol); Faktör: Kontrol, %2,5 ve 5 Narenciye ekstraktı ve monensin eklenme durumu; ^{a, b, c, d}: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki açıdan farklıdır (*p*<0.05).

In vitro ortam pH değerleri değerlendirildiğinde 6., 12. ve 24. saatlerde alınan rumen sıvısı örneklerinde TMR grupları arası istatistiki fark belirlenmedi (*p*>0,05; Tablo 2). Sadece konsantre yem ağırlıklı TMR grupları (TMR_{KON}) matematiksel olarak inkübasyon süresince daha düşük seyretti. Çok yönlü varyans analizinin sonuçlarına göre sadece 24. saat verilerine göre narenciye ekstraktı eklenen grupların pH değerleri diğer gruplara göre daha düşük olduğu belirlendi (*p*<0,006). 6., 12. ve 24. saatlerde alınan rumen sıvısı örneklerinde TMR tipi ile ortama katılan ekstrakt ve monensin grupları arasında bir interaksiyona rastlanmadı (Tablo 2).

3.2. Rumen amonyak (NH₃-N) seviyesi üzerine etkisi

Deneme gruplarına ait *in vitro* inkübasyonu sonrası farklı saatlerde ölçülen NH₃-N değerleri Tablo 3'te sunuldu.

Tablo 3. Deneme gruplarının *in vitro* inkübasyonu sonrası farklı saatlerde ölçülen NH₃-N değerleri, mmol/L (Ort.±SD).

GRUPLAR	6.saat	12.saat	24.saat
TMR _{KAB-K}	6,69±0,23	6,31±0,24	6,63±0,54 ^a
TMR _{KON-K}	6,48±0,62	6,17±0,54	5,61±0,20 ^{abc}
TMR _{KAB-C2,5}	6,39±0,53	4,27±1,91	3,56±0,77 ^{bcd}
TMR _{KON-C2,5}	6,26±0,76	4,49±2,16	3,28±1,36 ^{cd}
TMR _{KAB-C5}	6,55±0,33	4,97±2,28	2,36±0,47 ^d
TMR _{KON-C5}	6,08±0,75	5,22±0,34	2,13±1,14 ^d
TMR _{KAB-M}	6,70±0,48	4,74±3,54	5,06±0,41 ^{abc}
TMR _{KON-M}	6,79±0,12	6,03±0,50	5,90±1,05 ^{ab}
TOTAL	6,50±0,50	5,28±1,70	4,31±1,77
ANOVA-----	<i>p</i> < -----		
TMR _{kaba&kon}	0,414	0,594	0,615
Faktör	0,436	0,394	0,001
TMR x Faktör	0,827	0,913	0,322

TMR_{KAB-K}: Kaba yem ağırlıklı TMR kontrol grubu (negatif kontrol); TMR_{KON-K}: Konsantre yem ağırlıklı TMR kontrol grubu (negatif kontrol); TMR_{KAB-C2,5}: %2,5 Narenciye ekstraktlı kaba yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KON-C2,5}: %2,5 Narenciye ekstraktlı konsantre yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KAB-C5}: %5 Narenciye ekstraktlı kaba yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KON-C5}: %5 Narenciye ekstraktlı konsantre yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KAB-M}: Monensin eklenen kaba yem ağırlıklı TMR grubu (pozitif kontrol); TMR_{KON-M}: Monensin eklenen konsantre yem ağırlıklı TMR grubu (pozitif kontrol); Faktör: Kontrol, %2,5 ve 5 Narenciye ekstraktı ve monensin eklenme durumu; NH₃-N: Amonyak azotu; ^{a, b, c, d}: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki açıdan farklıdır (p<0.05).

Amonyak değerleri değerlendirildiğinde 6. ve 12. saatlerde alınan rumen sıvısı örneklerinde gruplar arası istatistiki bir fark belirlenmezken (p>0,05), 24. saat örneklerinde TMR_{KON-C5}, TMR_{KAB-C5} grupları NH₃-N düzeylerinin en düşük değerlere sahip olduğu, kontrol ve monensin eklenen grupların ekstrakt eklenen gruplardan daha yüksek seyrettiği tespit edildi (p<0,05; Tablo 3). 24. saat verilerine göre %5 düzeyinde narenciye ekstraktı eklenen grupların NH₃-N değerleri daha düşük belirlendi (p<0,001). 6., 12. ve 24. saatlerde alınan rumen sıvısı örneklerinin NH₃-N değerlerinde TMR tipi ile ortama katılan ekstrakt ve monensin grupları arasında bir etkileşim görülmedi (Tablo 3).

3.3. Rumen uçucu yağ asitleri üzerine etkisi

Deneme gruplarının *in vitro* 24 saatlik inkübasyonu sonrası ölçülen uçucu yağ asitleri değerleri Tablo 4'te sunuldu.

Tablo 4. Deneme gruplarının *in vitro* 24 saatlik inkübasyonu sonrası ölçülen uçucu yağ asitleri, mmol/L (Ort±SD).

GRUPLAR	Asetik Asit	Propiyonik Asit	İsobütirik Asit	Bütirik Asit	İsovalerik Asit	Valerik Asit	A/P	TUYA	CO ₂	CH ₄
TMR_{KAB}-K	31,72 ±8,18	12,09 ^d ±5,70	0,23 ^{bc} ±0,06	2,44 ^b ±3,32	0,21 ±0,09	0,52 ^c ±0,24	2,85 ±0,78	47,34 ^d ±15,43	22,55 ±8,67	11,93 ^{ab} ±3,02
TMR_{KON}-K	34,25 ±5,81	15,92 ^c ±8,91	0,24 ^b ±0,03	3,99 ^a ±3,21	0,21 ±0,06	0,56 ^{bc} ±0,17	2,57 ±0,93	55,19 ^{bc} ±15,30	27,19 ±7,81	12,63 ^a ±1,97
TMR_{KAB}-C2,5	34,17 ±7,65	22,92 ^b ±17,01	0,24 ^b ±0,05	1,40 ^c ±2,93	0,22 ±0,08	0,59 ^b ±0,22	2,26 ±1,31	59,57 ^b ±22,26	24,92 ±8,45	9,64 ^d ±4,56
TMR_{KON}-C2,5	32,41 ±10,19	22,46 ^b ±18,54	0,22 ^c ±0,06	1,73 ^c ±2,60	0,18 ±0,07	0,58 ^b ±0,31	2,22 ±1,27	57,61 ^b ±26,43	24,42 ±9,53	9,10 ^d ±4,82
TMR_{KAB}-C5	37,93 ±5,26	27,48 ^{ab} ±19,23	0,27 ^a ±0,03	3,41 ^a ±5,10	0,24 ±0,06	0,73 ^a ±0,32	2,13 ±1,26	70,09 ^a ±27,23	30,97 ±13,41	10,88 ^c ±3,32
TMR_{KON}-C5	36,01 ±5,62	31,15 ^a ±16,71	0,25 ^{ab} ±0,03	1,05 ^c ±2,93	0,21 ±0,06	0,68 ^{ab} ±0,25	1,55 ±0,95	69,38 ^a ±20,10	27,37 ±7,04	8,06 ^e ±4,16
TMR_{KAB}-M	36,38 ±8,02	16,11 ^c ±6,40	0,21 ^d ±0,05	0,15 ^d ±0,24	0,18 ±0,07	0,43 ^d ±0,10	2,46 ±0,67	53,48 ^c ±13,87	22,46 ±5,37	12,01 ^a ±2,34
TMR_{KON}-M	34,35 ±6,33	15,11 ^{cd} ±3,75	0,20 ^c ±0,05	0,16 ^d ±0,28	0,16 ±0,06	0,39 ^c ±0,07	2,34 ±0,48	50,38 ^{cd} ±9,20	21,20 ±3,76	11,37 ^b ±2,31
TOTAL	34,66 ±7,21	20,48 ±14,32	0,23 ±0,05	1,82 ±3,15	0,20 ±0,07	0,56 ±0,24	2,30 ±1,02	57,97 ±20,32	25,18 ±8,61	10,69 ±3,59
ANOVA----- <i>p</i> < -----										
TMR_{kaba&kon}	0,648	0,641	0,438	0,870	0,292	0,783	0,286	0,908	0,922	0,317
Faktör	0,327	0,004	0,016	0,031	0,142	0,004	0,082	0,024	0,093	0,022
TMR x Faktör	0,744	0,922	0,807	0,274	0,936	0,930	0,861	0,833	0,538	0,485

A/P: Asetik asit/Propiyonik asit; TUYA: Toplam uçucu yağ asitleri; CO₂:Karbondioksit; CH₄:Metan; TMR_{KAB}_K: Kaba yem ağırlıklı TMR kontrol grubu (negatif kontrol); TMR_{KON}-K: Konsantre yem ağırlıklı TMR kontrol grubu (negatif kontrol); TMR_{KAB}-C2,5: %2,5 Narenciye ekstraktlı kaba yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KON}-C2,5: %2,5 Narenciye ekstraktlı konsantre yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KAB}-C5: %5 Narenciye ekstraktlı kaba yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KON}-C5: %5 Narenciye ekstraktlı konsantre yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KAB}-M: Monensin eklenen kaba yem ağırlıklı TMR grubu (pozitif kontrol); TMR_{KON}-M: Monensin eklenen konsantre yem ağırlıklı TMR grubu (pozitif kontrol); Faktör: Kontrol, %2,5 ve 5 Narenciye ekstraktı ve monensin eklenme durumu; ^{a, b, c, d, e}: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki açıdan farklıdır (*p*<0,05).

Gruplar arasında TMR çeşidi asetik asit, propiyonik asit, isobütirik asit, bütirik asit, isovalerik asit ve valerik asit, uçucu yağ asitleri düzeyleri üzerine istatistiki farka neden olmadı (*p*>0,05). Çok yönlü varyans analizine göre narenciye ekstraktı propiyonik ve valerik asit düzeyini artırırken (*p*<0,004), monensin ilavesi ise diğer gruplara göre isobütirik asit (*p*<0,016) ve bütirik asit (*p*<0,031) düzeylerini düşürdüğü tespit edildi (Tablo 4). TMR çeşidi fark etmeksizin ekstrakt eklenen gruplarda diğerlerine göre daha fazla TUYA (*p*<0,024) oluşumu gözlenirken metan üretiminin daha az (*p*<0,022) olduğu hesaplandı. Farklı TMR çeşidi ve ekstrakt ve monensin eklenen CO₂ üretimine etki etmediği belirlendi (*p*>0,05).

24 saatlik *in vitro* inkübasyon sonrası ölçülen rumen sıvısı uçucu yağ asitleri değerlerinin hiçbirinde TMR tipi ile ortama katılan ekstrakt ve monensin grupları arasında bir interaksyona rastlanmadı (Tablo 4).

3.4. *In vitro* gaz üretimi üzerine etkisi

Deneme gruplarının *in vitro* inkübasyonda 3., 6., 9., 12. ve 24. saatlerde toplam oluşan gaz üretim düzeyleri Tablo 5'te sunuldu.

Tablo 5. Otomatik *in vitro* gaz üretim sisteminde belirlenen saatlere göre gaz üretim düzeyleri, ml/460 mg KM (Ort±SD)

Gruplar	3. saat	6. saat	9. saat	12. saat	24. saat
TMR _{KAB-K}	5,05±1,63 ^b	12,93±3,24 ^{ab}	28,56±4,82 ^a	45,08±5,93 ^a	66,19±12,90 ^b
TMR _{KON-K}	6,15±1,26 ^{ab}	14,72±4,10 ^a	30,83±7,24 ^a	47,57±8,69 ^a	73,10±16,11 ^b
TMR _{KAB-C2,5}	6,35±1,71 ^{ab}	15,86±3,69 ^a	31,66±7,29 ^a	53,83±10,98 ^a	98,30±26,59 ^a
TMR _{KON-C2,5}	6,74±1,87 ^{ab}	15,11±5,17 ^a	31,39±8,05 ^a	51,65±13,63 ^a	113,81±20,20 ^a
TMR _{KAB-C5}	7,37±2,59 ^a	16,68±3,44 ^a	28,50±9,77 ^a	52,58±9,96 ^a	112,72±22,25 ^a
TMR _{KON-C5}	6,19±2,28 ^{ab}	14,35±4,57 ^a	29,32±8,02 ^a	45,21±9,95 ^a	104,92±23,21 ^a
TMR _{KAB-M}	4,99±1,58 ^b	8,67±4,05 ^b	15,99±5,44 ^b	23,18±7,60 ^b	43,64±11,38 ^c
TMR _{KON-M}	5,21±2,42 ^{ab}	8,04±2,59 ^c	15,83±3,33 ^b	22,95±4,72 ^b	37,69±12,11 ^c
TOTAL	6,01±2,07	13,30±4,88	26,51±9,24	42,76±14,88	81,30±33,99
ANOVA----- $p < $ -----					
TMR _{kaba&kon}	0,707	0,507	0,604	0,287	0,531
Faktör	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001
TMR x Faktör	0,160	0,246	0,889	0,220	0,058

TMR_{KAB-K}: Kaba yem ağırlıklı TMR kontrol grubu (negatif kontrol); TMR_{KON-K}: Konsantre yem ağırlıklı TMR kontrol grubu (negatif kontrol); TMR_{KAB-C2,5}: %2,5 Narenciye ekstraktlı kaba yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KON-C2,5}: %2,5 Narenciye ekstraktlı konsantre yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KAB-C5}: %5 Narenciye ekstraktlı kaba yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KON-C5}: %5 Narenciye ekstraktlı konsantre yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KAB-M}: Monensin eklenen kaba yem ağırlıklı TMR grubu (pozitif kontrol); TMR_{KON-M}: Monensin eklenen konsantre yem ağırlıklı TMR grubu (pozitif kontrol); Faktör: Kontrol, %2,5 ve 5 Narenciye ekstraktı ve monensin eklenme durumu; ^{a, b, c, d}: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir (p<0.05).

Farklı zamanlarda gruplar arası *in vitro* gaz üretimi değerlendirildiğinde, 3. saat TMR_{KAB-C5} grup değeri TMR_{KAB-K} ile TMR_{KAB-M} grubundan yüksek belirlenirken (p<0,05), 6. saat TMR_{KAB-M} ile TMR_{KON-M} grup değerleri diğer bütün gruplardan düşük belirlendi (p<0,05). Benzer şekilde 9., 12. ve 24. saat TMR_{KAB-M} ile TMR_{KON-M} grup değerleri diğer bütün gruplardan düşük tespit edildi (p<0,05). Çok yönlü varyans analizine göre ise narenciye ekstraktı eklenen grupların (özellikle de %5) diğer gruplara göre daha fazla gaz üretimine sebep olduğu belirlendi (p<0,001). Saatlere göre gaz üretimlerinde TMR tipi ile ortama katılan ekstrakt ve monensin grupları arasında bir interaksiyon görülmedi (Tablo 4).

3.5. *İn vitro* gaz üretim sistemi ile belirlenen fermentasyon kinetiği parametrelerine etkisi

Deneme gruplarının fermentasyon kinetiği parametrelerine ait veriler Tablo 6’da sunuldu.

Tablo 6. Gruplar arası otomatik *in vitro* gaz üretim sistemi ile belirlenen fermentasyon kinetiği parametreleri (Ort±SD)

	LAG, saat	VF, mL	Kd, saat ⁻¹	EYKD, saat	MBP ₂₄ , mg/g
TMR _{KAB-K}	4,48±0,51 ^{ab}	65,82±16,25 ^{ab}	0,083±0,03	16,67±4,93 ^{ab}	108,98±29,31 ^{ab}
TMR _{KON-K}	4,47±0,61 ^{ab}	71,44±20,28 ^{ab}	0,089±0,04	13,33±4,91 ^{ab}	115,70±31,71 ^{ab}
TMR _{KAB-C2,5}	5,13±1,07 ^a	90,91±39,23 ^a	0,088±0,04	18,03±5,99 ^a	137,04±50,81 ^a
TMR _{KON-C2,5}	5,29±1,12 ^a	96,94±43,14 ^a	0,085±0,04	13,41±7,40 ^{ab}	144,84±55,68 ^a
TMR _{KAB-C5}	4,83±1,16 ^a	98,11±51,61 ^a	0,068±0,03	10,80±2,61 ^b	141,19±69,64 ^a
TMR _{KON-C5}	5,41±0,89 ^a	80,18±51,19 ^{ab}	0,077±0,04	11,66±3,09 ^b	119,13±60,11 ^{ab}
TMR _{KAB-M}	3,42±1,60 ^b	41,52±16,24 ^b	0,069±0,02	14,73±6,54 ^{ab}	79,21±22,25 ^b
TMR _{KON-M}	3,46±1,63 ^b	40,89±22,30 ^b	0,059±0,03	16,03±6,54 ^{ab}	73,56±24,51 ^b
TOTAL	4,56±1,33	73,41±41,05	0,077±0,03	14,27±5,83	115,11±51,98
ANOVA----- p < -----					
TMR _{kaba&kon}	0,369	0,796	0,935	0,160	0,704
Faktör	0,001	0,001	0,077	0,007	0,001
TMR x Faktör	0,755	0,543	0,799	0,098	0,591

TMR_{KAB_K}: Kaba yem ağırlıklı TMR kontrol grubu (negatif kontrol); TMR_{KON-K}: Konsantre yem ağırlıklı TMR kontrol grubu (negatif kontrol); TMR_{KAB-C2,5}: %2,5 Narenciye ekstraktlı kaba yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KON-C2,5}: %2,5 Narenciye ekstraktlı konsantre yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KAB-C5}: %5 Narenciye ekstraktlı kaba yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KON-C5}: %5 Narenciye ekstraktlı konsantre yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KAB-M}: Monensin eklenen Kaba yem ağırlıklı TMR grubu (pozitif kontrol); TMR_{KON-M}: Monensin eklenen konsantre yem ağırlıklı TMR grubu (pozitif kontrol); LAG: gaz üretimine başlama zamanı; VF: Maksimum gaz üretimi; Kd: Fermentasyon hızı oranı; EYKD: En yüksek fermentasyon hızı oranına ulaşılan zaman; MBP₂₄: 24. saatte mikrobiyal kütle üretimi, mg/g substrat; Faktör: Kontrol, %2,5 ve 5 Narenciye ekstraktı ve monensin eklenme durumu; ^{a, b, c}: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir (p<0.05).

Gruplar arasında fermentasyon hızı oranı (Kd, saat⁻¹) değerleri arasında istatistiki fark tespit edilmezken (p>0.05), narenciye ekstraktı eklenen bütün gruplarda (TMR_{KAB-C2,5}; TMR_{KON-C2,5}; TMR_{KAB-C5}; TMR_{KON-C5}) fermentasyona geç başlanmıştır (p<0,001). Monensin eklenen gruplarda (TMR_{KAB-M} ile TMR_{KON-M}) ise fermentasyona başlama zamanı (LAG, saat) en erken grup olarak belirlendi (p<0,001). Maksimum gaz üretimi (VF, mL) TMR çeşidine bağlı olmaksızın ekstrakt eklenen bütün gruplarda yüksek gözlemlendi (p<0,001). Monensin ilave edilen gruplarda ise maksimum gaz üretim değerleri en düşük hesaplandı. En yüksek fermentasyon hızı oranına ulaşılan zaman %5 oranında narenciye ekstraktı ilave edilen grupta en düşük olarak etki etki gözlemlendi (p<0,007). 24. saatte hesaplanan mikrobiyal kütle üretimi (MBP₂₄, mg/g) değeri ise narenciye ekstraktı eklenen bütün gruplarda fazla bulunurken monensin ilave edilen gruplarda daha düşük hesaplandı (p<0,001). *İn vitro* otomatik gaz üretim

sistemi ile belirlenen fermentasyon kinetiği parametrelerinde TMR çeşidi ile ortama katılan ekstrakt ve monensin grupları arasında bir interaksiyona rastlanmadı.

3.6. Daisy inkübatörde belirlenen sonuçlar üzerine etkisi

Deneme grupları arasında Ankom Daisy II 200/220 Inkubator ile belirlenen sindirilebilirlik sonuçlarına ait veriler Tablo 7’de sunuldu.

Tablo 7. Gruplar arası Ankom Daisy II 200/220 Inkubator sonuçları (ort.±SD).

GRUPLAR	%IVNDFS _{KM}	%IVGS _{KM}	%IVOMS _{KM}
TMR _{KAB-K}	81,42±1,74 ^{bc}	68,12±2,51 ^b	96,44±2,08 ^{ab}
TMR _{KON-K}	86,64±2,03 ^a	74,51±3,50 ^a	97,02±1,43 ^a
TMR _{KAB-C2,5}	76,70±1,43 ^d	59,45±1,80 ^{de}	96,88±2,07 ^a
TMR _{KON-C2,5}	82,70±1,36 ^b	68,01±2,07 ^b	94,08±3,31 ^b
TMR _{KAB-C5}	76,33±1,63 ^d	58,27±1,89 ^e	98,27±1,19 ^a
TMR _{KON-C5}	80,25±1,16 ^c	63,03±2,01 ^c	90,10±1,80 ^c
TMR _{KAB-M}	71,88±1,22 ^c	52,50±1,84 ^f	97,50±1,57 ^a
TMR _{KON-M}	76,91±1,17 ^d	61,49±1,24 ^{cd}	90,41±2,56 ^c
TOTAL	79,10±4,54	63,17±6,80	95,09±3,64
ANOVA	p < -----		
--			
TMR _{kaba&kon}	0,001	0,001	0,001
Faktör	0,001	0,001	0,001
TMR x Faktör	0,070	0,001	0,001

TMR_{KAB-K}: Kaba yem ağırlıklı TMR kontrol grubu (negatif kontrol); TMR_{KON-K}: Konsantre yem ağırlıklı TMR kontrol grubu (negatif kontrol); TMR_{KAB-C2,5}: %2,5 Narenciye ekstraktlı kaba yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KON-C2,5}: %2,5 Narenciye ekstraktlı konsantre yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KAB-C5}: %5 Narenciye ekstraktlı kaba yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KON-C5}: %5 Narenciye ekstraktlı konsantre yem ağırlıklı TMR grubu; TMR_{KAB-M}: Monensin eklenen Kaba yem ağırlıklı TMR grubu (pozitif kontrol); TMR_{KON-M}: Monensin eklenen konsantre yem ağırlıklı TMR grubu (pozitif kontrol); %IVNDFS_{KM}: %KM’de *in vitro* NDF sindirilebilirliği; %IVGS_{KM}: %KM’de *in vitro* gerçek sindirilebilirlik; %IVOMS_{KM}: %KM’de *in vitro* organik madde sindirilebilirliği; Faktör: Kontrol, %2,5 ve 5 Narenciye ekstraktı ve monensin eklenme durumu; a, b, c, d, e, f: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir (p<0.05).

Gruplar arası daisy sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek %IVNDFS_{KM} değeri TMR_{KON-K} grubunda belirlendi (p<0,001). Konsantre yem ağırlıklı TMR’lerin narenciye ekstraktı ve monensin eklenen durumlarda %IVNDFS_{KM} değerlerinde kontrol grubuna göre düşmeler gözlemlendi (p<0,001). Kontrol grubuna göre %IVGS_{KM} değerinde narenciye ekstraktı ve monensin eklenen gruplarda azalmalar belirlendi (p<0,001). Gruplar arasında ise en düşük %IVOMS_{KM} değeri TMR_{KON-M} grubunda belirlenirken (p<0,001), en yüksek değerler TMR_{KON-C}, TMR_{KAB-C2,5}; TMR_{KAB-C5} ve TMR_{KAB-M} gruplarında belirlendi (p<0,001).

4. TARTIŞMA

Dünyada artan maliyetler sebebi ile narenciye yan ürünlerinin, ruminantlar için alternatif yem kaynağı olarak kullanılması üzerine olan ilgiyi artırmıştır. Ruminantlarda yem olarak verilen başlıca narenciye ürünlerinin turunçgil posası, turunçgil silajı, kurutulmuş turunçgil posası, turunçgil unu, turunçgil pekmezi ve turunçgil kabuğu suyu olduğu bildirilmiştir. Narenciye yan ürünlerinin ruminant rasyonlarına ilavesi ile büyümeyi ve laktasyonu desteklemek için yüksek enerjili bir yem kaynağı olarak kullanılabileceği ve rumen fermantasyonu üzerinde nişasta açısından zengin yemlere göre daha az olumsuz etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Ancak, bazı narenciye yan ürünlerinin çok yüksek düzeylerde uygulandığında rumende parakeratoz meydana gelebileceği de ifade edilmiştir. Narenciye yan ürünlerinin, ruminantların yüksek lifli yemleri rumende fermente edebilme yeteneği dikkate alındığında, ruminant rasyonlarına ilave edilmesinin uygun olabileceği belirlenmiştir (Bampidis ve Robinson 2006).

In vitro ortam pH değerleri değerlendirildiğinde 6., 12. ve 24. saatlerde alınan rumen sıvısı örneklerinde gruplar arası bir istatistiki bir fark belirlenmedi ($p>0,05$; Tablo 2). Sadece konsantre yem ağırlıklı TMR grupları (TMR_{KON}) matematiksel olarak inkübasyon süresince daha düşük seyretti. 24. saat pH verilerine göre narenciye ekstraktı eklenen grupların pH değerleri diğer gruplara göre daha düşük olduğu belirlendi ($p<0,006$). Ancak belirlenen bu pH değeri istatistiki değişiminin, sağlıklı sığırlar için ifade edilen rumen pH (5.5-7) değerleri arasında olduğu belirlendi (Öztürk ve Pişkin 2009). Genel olarak, doğal biyoaktif bileşik kaynağı olarak turunçgil yan ürünleri ile ruminant beslemenin, rumen pH'sını önemli ölçüde etkilemediği bilinmektedir (Tayengwa ve Mapiye 2018). Narenciye posaları yüksek oranda pektin ve selüloz içerir. Pektinler rumende çok hızlı parçalanırken, düşük laktat oluşumuna neden olur. Bu durumun ise rumen pH'ında az düşüşe neden olduğu bildirilmiştir (Bampidis ve Robinson 2006). Sığır rasyonlarına narenciye posası kuru maddesi (2,25 kg) ilavesinin *in vivo* ve *in vitro* şartlarda rumen pH düzeyini değiştirmedeği (McGee ve ark 2024), besi sığırlarında rasyona artan dozlarda (0, 200, 400, 800, 1200 ppm) portakal kabuğu ekstraktının (Afzalani ve ark 2015) ve ineklerden elde edilen rumen içeriğine narenciye flovanoid ekstraktı ilavesinin (Amin ve ark 2021, Yu ve ark 2024) rumen pH düzeyini etkilemediği ifade edilmiştir. Boğa rasyonlarına ticari olarak satılan narenciye ekstraktı ilave edilerek 168 gün beslendikten sonra kesime sevk edildiğinde rumen pH düzeyinin değişmediği (Paniagua ve ark 2021) veya yükseldiği (Paniagua ve ark 2022) ifade edilmiştir. Koyunlarda yapılan çalışmada *in vitro* şartlarda rumen sıvısına 300 mg/L portakal esansiyel yağı ilavesinin pH değerini değiştirmedeği

bildirilmiştir (Canbolat 2012). Koyun rasyonlarına sarımsak ile narenciye ekstresi (1, 5, 10 gram) ilave edildiğinde rumen pH düzeylerine etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Ahmed ve ark 2021). Monensin ile beslenen sığırların ruminal pH değerinin kontrol grup değerinden düşük olduğu bildirilmesine (McGinn ve ark. 2024) rağmen, bu pH değerlerinin referans aralıkta olduğu gözlenmiştir (Öztürk ve Pişkin 2009). Sığırlarda turunçgil posasının akut rumen laktik asidozu oluşturma riskinin araştırıldığı çalışmada, 15 rumen kanüllü sığırın rastgele 3 gruba ayrıldığı ve grupların kontrol, sükroz (laktik asidoz grubu) ve turunçgil posası (canlı ağırlığın %1,65) gruplarından oluşturulduğu ifade edilmiştir. Uygulamadan sonraki 24 saat süresince pH ve laktik asit konsantrasyonu ölçmek için rumen içeriği ve kan alındığı, klinik belirtilerin gözlemlendiği ve sonraki bir hafta süresince yem alımının takip edildiği ifade edilmiştir. Sükroz grubunda sistemik ve ruminal asidozun gözlemlendiği, turunçgil posası grubunda hafif ve kısa süreli rumen asidozu (6. saatte pH: 5.35) olduğu, ancak kan pH değerinin değişmediği ve klinik belirtilerin gözlenmediği, sonuçta turunçgil posasının sığırlarda asidoz oluşturmada düşük riskli olduğu ve sığırlar için bir yem maddesi olarak kullanılabileceğini ifade edilmiştir (Juniorve ark 2008). Bu bulguların aksine fistüllü koyunlardan elde edilen rumen içeriğine esansiyel portakal yağı artan dozlarda (0, 100, 200, 400, 800 ve 1200 mg/L) ilave edildiğinde pH değerinin doza bağlı olarak arttığı da belirlenmiştir (Kamalak ve ark 2011). Mevcut çalışmada %2,5 ile %5 narenciye ekstraktı ilavesinin rumen pH değerlerine belirgin bir olumsuz etkisinin olmadığı ifade edilebilir.

Ruminantlarda rumende fermentasyon sonucu oluşan metan gazının küresel ısınmaya katkı sağladığı bildirilmiştir. Dünyada bir yıllık küresel metan gazı üretiminin %19'unun hayvancılıktan kaynaklandığı ve bu oranın %95-97'sinin ise ruminantlardan kaynaklandığı ifade edilmiştir (Arslan ve Çelebi 2017). Küresel ısınmada metan gazının atmosferde ısı yakalama kapasitesinin karbondioksit göre 21 kat daha fazla olduğu bilindiğinden, metan gazının sera gazı etkisi oluşturmada birinci sırada olduğu ifade edilmiştir. Bir ineğin yıl içinde ortalama 80-110 kg civarında metan üretebildiği belirlenmiştir (Koyuncu ve Akgün 2018). Mevcut tez çalışmasında *in vitro* gaz üretimi üzerine narenciye ekstraktının etkisi değerlendirildiğinde, bütün inkübasyon süresince narenciye ekstraktı eklenen gruplarda diğerlerine göre yüksek ($p<0,001$) olduğu belirlenirken, tam tersine monensin ilave edilen grupların ise gaz üretimleri diğer bütün gruplardan düşük olduğu tespit edildi ($p<0,001$; Tablo 5). Monensin ile beslenen sığırlarda karbondioksit miktarının kontrol gruptan farklı olmadığı bildirilmiştir (McGinn ve ark 2004). Keçilerden elde edilen rumen içeriğine farklı oranlarda (%0, %10, %20 ve %30) kurutulmuş narenciye posası ilavesinin gaz üretimini arttığı ve bu

durumun posada bulunan yüksek miktardaki pektinin nötr deterjan çözünür lif fraksiyonu içermesinden kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (Hernandez ve ark 2012). Narenciye meyve kabuklarının %10'luk sulu ve etanollü ekstraktlarının *in vitro* rumen fermantasyon parametrelerine etkisi incelendiğinde, kontrole göre toplam gaz üretimini düşürdüğü belirlenmiştir (Sarthak ve ark 2024). Sığırlardan elde edilen rumen içeriğine *in vitro* ortamda narenciye flavonoid (0,5 mg/g) ilavesinin total gaz oluşumu üzerine etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Amin ve ark 2021). Sığır rasyonlarına narenciye posası kuru maddesi (2,25 kg) ilavesinin amonyak düzeylerini düşürdüğü, ancak çalışma *in vitro* şartlarda yapıldığında total gaz ve metan düzeylerinde değişime neden olmadığı belirlenmiştir (McGee ve ark 2024). Sığırlardan elde edilen rumen içeriğine *in vitro* ortamda narenciye flavonoid (0,5 mg/g) ilavesinin metan oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Amin ve ark 2021). İneklerden elde edilen rumen içeriğine narenciye flavonoid ekstraktı ilavesinin metan düzeyini düşürdüğü ve bu durumun turuncgil flavonoidlerinin rumen içindeki metanojenik popülasyonlar üzerindeki doğrudan inhibitör etkisine bağlı olarak protozoa sayısındaki düşüşten kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (Yu ve ark 2024). Fistüllü koyunlardan elde edilen rumen içeriğine esansiyel portakal yağı artan dozlarda (0, 100, 200, 400, 800 ve 1200 mg/L) ilave edildiğinde *in vitro* gaz üretimini ve metan oluşumunu azalttığı belirlenmiştir (Kamalak ve ark 2011). Rasyonlarına sarımsak ve narenciye ekstresi ilavesi yapılan süt ineklerinde kontrol gruba göre daha düşük metan oluştuğu ve karbondioksit düzeyine etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Khurana ve ark 2023). Koyun rasyonlarına sarımsak ile narenciye ekstresi (1, 5, 10 gram) kombinasyonu ilave edildiğinde rumen karbon dioksit düzeylerine etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Ahmed ve ark 2021). Koyunlarda yapılan çalışmada *in vitro* şartlarda rumen sıvısına 300 mg/L portakal esansiyel yağı ilavesinin karbondioksit ve metan oranını düşürdüğü bildirilmiştir (Canbolat 2012). Sarımsak tozu ve narenciye ekstraktı kombinasyonunun ruminal fermantasyon ve metan üreten Arkea topluluğu üzerine etkileri rumen simülasyon tekniği kullanılarak *in vitro* model olarak değerlendirildiğinde rumen fermantasyonu üzerinde olumsuz etkiler göstermeden, Arkea topluluğunu değiştirerek metan üretimini etkili bir şekilde azaltabileceği bildirilmiştir (Eger ve ark 2018). Yayınlanan bir derlemede rasyona ilave edilen yağların metan oluşumunu azalttığı bildirilmiştir. Pamuk tohumu yağı:kanola yağı karışımı, keten tohumu yağı, hindistan cevizi yağı, kanola yağı, hurma çekirdeği yağı, zeytin yağı, soya yağı ve ayçiçeği yağı ilavesinin metan oluşumunu azalttığı bildirilmiştir. Derleme de rasyonlara özellikle de doymamış yağ asitleri içeriği fazla olan yağların ilavesinin rumendeki mikroorganizma yapısını değiştirdiği, sonuçta karbonhidratların sindirimi azaldığı, asetat/propiyonat oranının düştüğü veya metan üreten mikroorganizma sayısını düşürerek etki gösterebileceği ifade edilmiştir. Ayrıca rumende

Üretilen hidrojen miktarı oluşumunun azalmasına bağlı olarak metan oluşumunun azaltılabileceği ifade edilmiştir (Arslan ve elebi 2017). Ruminant rasyonlarında turunçgil yan ürünlerinden elde edilen esansiyel yağların takviye olarak kullanılmasının, metanojenik Arkeaları doğrudan inhibe ettiği ve/veya metanogeneze katkıda bulunan bazı mikrobiyal metabolik süreçleri doğrudan baskılayarak metan üretimini dolaylı olarak azaltılabileceği bildirilmiştir (Tayengwa ve Mapiye 2018). Bu çalışmada en düşük metan oluşumu TMR'nin kaba veya konsantre yem ağırlıklı olmasına bağlı olmadan narenciye ekstraktı ilave edilen gruplarda belirlendi (Tablo 6). Ruminant rasyonlarına iyonofor grubu antibiyotiklerden monensin (Johnson ve Johnson 1995, Sauer ve ark 1998, McGinn ve ark 2004), narasin, salisinomisin, lasolisid, tetronasin, lizosellin ve laidomisin (Boadi ve ark 2004, Meral ve Biricik 2013) antibiyotik ilavesinin metan oluşumunu baskılayabildiği de bilinmektedir. Mevcut çalışmada narenciye ekstraktı eklenen grupların (zellikle de %5) maksimum gaz retimi (VF, mL) TMR çeşidine bağlı olmaksızın diğer gruplara göre yüksek iken metan üretimini ise monensin eklenen gruptan daha fazla düşürdüğü önceki çalışmalarla benzer olup narenciye (*citrus*) flavinoid ekstraktlarının iyonofor antibiyotiklere iyi bir alternatif olmaya aday olduklarını ispatlar niteliktedir. Ayrıca narenciye ekstraktı eklenen bütün gruplarda 24 saatlik inkübasyon sonrası mikrobiyal kütle retimi (MBP₂₄) monensin ilave edilen gruplardan fazla bulunması narenciye flavonoidlerinin iyonofor antibiyotiklerinden üstünlükleri olarak değerlendirilebilir.

Rumen içeriğine %2,5 veya %5 narenciye ekstraktı ilavesinin ise özellikle inkübasyonun 24. saat olan numunelerinde diğer gruplara göre amonyak düşürücü etkisinin ($p < 0,001$) olduğu belirlendi (Tablo 3). Fistüllü koyunlardan elde edilen rumen içeriğine esansiyel portakal yağı artan dozlarda (0, 100, 200, 400, 800 ve 1200 mg/L) ilave edildiğinde amonyak üretiminin azaldığı belirlenmiştir (Kamalak ve ark 2011). Besi sığırları rasyonlarına artan dozlarda (0, 200, 400, 800, 1200 ppm) portakal kabuğu ekstraktı ilavesi yapıldığında doza bağlı olarak amonyak üretimini baskıladığı ifade edilmiştir (Afzalani ve ark 2015). Sığırlardan elde edilen rumen içeriğine *in vitro* ortamda narenciye flavonoid (0,5 mg/g) ilavesinin amonyak oluşumu üzerine etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Amin ve ark 2021). Rasyonlarına sarımsak ve narenciye ekstresi ilavesi yapılan süt ineklerinde kontrol gruba göre amonyak ve karbondioksit düzeyine etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Khurana ve ark 2023). Narenciye meyve kabuklarının %10'luk sulu ve etanollü ekstraktlarının *in vitro* rumen fermentasyon parametrelerine etkisi incelendiğinde, kontrole göre amonyak üretimi üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Sarthak ve ark 2024). Benzer şekilde koyun rasyonlarına sarımsak ile narenciye ekstresi (1; 5

ve 10g) ilave edildiğinde amonyak düzeyine etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Ahmed ve ark 2021). Koyunlarda yapılan çalışmada *in vitro* şartlarda rumen sıvısına 300 mg/L portakal esansiyel yağı ilavesinin amonyak oranını düşürdüğü (Canbolat 2012) ve rumen kanüllü koyunlardan elde edilen rumen içeriğine 0, 400, 800 ve 1200 mg/L oranında portakal yağı ilavesinin karbondioksit ile metan üretimini azalttığı bildirilmiştir (Canbolat ve ark 2011). Tayengwa ve Mapiye (2018) tarafından turunçgil yan ürünlerinin ruminant beslemede kullanımı ile ilgili genel bir değerlendirme yapılan derleme çalışmasında, turunçgil yan ürünlerinin amonyak üretimi ile ilişkili mekanizmalar üzerine daha fazla çalışma yapılması gerektiği ifade edilmiştir.

Mevcut araştırmada gruplar arasında asetik asit, isobütirik asit, bütirik asit, isovalerik asit ve valerik asit gibi uçucu yağ asitleri düzeyleri arasında istatistiki fark ($p>0.05$) tespit edilmezken, narenciye ekstraktı ilave edilen gruplarda propiyonik asit düzeyinin arttığı belirlendi ($p<0,001$; Tablo 4). Monensin ile beslenen sığırlarda total uçucu yağ asidi oranının değişmediği, ancak asetat düzeyinde düşme, propiyonik asit düzeyinde yükselme, bütirik asit, izobütirik asit, valerik ve izovalerik asit düzeylerinde değişim olmadığı bildirilmiştir (McGinn ve ark. 2004). Narenciye meyve kabuklarının %10'luk sulu ve etanollü ekstraktlarının *in vitro* rumen fermantasyon parametrelerine etkisi incelendiğinde, kontrole göre toplam uçucu yağ asitleri üretimine etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Sarhak ve ark 2024). Narenciye ürünlerinin ruminant rasyonlarına ilavesinin asetik asidin molar yüzdesini artırırken propiyonik asidin molar oranını azaltma eğiliminde olduğu, asetat/propiyonat oranını artırabileceği (Bampidis ve Robinson 2006) ve narenciye yan ürünlerinin yüksek enerjili bir yem olarak laktasyonu ve gelişimi artırmak için ruminant rasyonlarında kullanılabileceği bildirilmiştir (Habeeb 2023). Besi sığırları rasyonlarına artan dozlarda (0, 200, 400, 800, 1200 ppm) portakal kabuğu ekstraktı ilavesi yapıldığında doza bağlı olarak TUYA miktarını düşürdüğü belirlenmiştir. Uygulanan bütün dozlarda asetat düzeyini düşürdüğü, propiyonik asit düzeyini 200 ile 400 ppm dozda yükseltirken 1200 ppm dozunda düşürdüğü, bütirik, isobütirik, valerik ve izovalerik asit düzeylerine etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Araştırma sonucunda 400 ppm dozun besi sığırlarında rumen mikrobiyal fermantasyonunu düzenlemede yem katkı maddesi olarak düşünülebileceği ifade edilmiştir (Afzalani ve ark 2015). Sığır rasyonlarına narenciye posası kuru maddesi (2,25 kg) ilavesinin toplam uçucu yağ asidi konsantrasyonlarını artırdığı bildirilmiştir. Asetik asit, propiyonik ve valerik asit düzeylerini değiştirmede, ancak bütirik asit düzeyinin yükseldiği belirtilmiştir. *In vitro* şartlarda inceleme yapıldığında ise asetik, propiyonik, bütirik ve valerik asit düzeylerinin değişmediği ifade edilmiştir (McGee ve ark

2024). İneklerde rumen fermantasyonu üzerine farklı dozlarda (0, 50, 100 ve 150 g/gün) turunçgil flavonoid ekstraktının rasyona ilavesinin asetik, propiyonik ve bütirik asidin konsantrasyonlarını doza bağlı olarak artırdığı ifade edilmiştir (Yu ve ark 2023). Boğaların rasyonlarına ticari olarak satılan narenciye ekstraktı ilave edilerek 168 gün beslendikten sonra kesime sevk edildiğinde, rumendeki toplam uçucu yağ asitleri konsantrasyonunun etkilenmediği bildirilmiştir. Araştırmada isovalerik asidin molar oranının yükseldiği, asetik, propiyonik, bütirik, valerik ile isobütirik asidin molar oranlarının değişmediği ve asetat/propionat oranının etkilenmediği ifade edilmiştir (Paniagua ve ark 2021). Benzer çalışmada boğaların rasyonlarına ticari olarak satılan narenciye ekstraktı ilave edilerek 168 gün beslendikten sonra kesime sevk edildiğinde, rumen toplam UYA konsantrasyonunun düştüğü, asetik ile bütirik asit oranlarının yükseldiği, propiyonik oranının düştüğü, isobütirik, valerik ve isovalerik asit düzeyinin değişmediği ve asetat/propionat oranının yükseldiği ifade edilmiştir (Paniagua ve ark 2022). İneklerden elde edilen rumen içeriğine narenciye flavonoid ekstraktı ilavesi sonrasında TUYA konsantrasyonu, asetik, propiyonik, isobütirik, isovalerik ile valerik düzeylerinin değişmediği, bütirik asit düzeyinin düştüğü belirtilmiştir (Yu ve ark 2024). Sığırlardan elde edilen rumen içeriğine *in vitro* ortamda narenciye flavonoid (0.5 mg/g) ilavesinin TUYA üzerine etkisinin olmadığı, ancak isobütirik asit düzeyi yükselirken, asetik, propiyonik, bütirik, valerik ile isovalerik asit düzeyine etkisinin olmadığı ve asetat/propiyonat oranının değişmediği belirtilmiştir (Amin ve ark 2021). Fistüllü koyunlardan elde edilen rumen içeriğine esansiyel portakal yağı artan dozlarda (0, 100, 200, 400, 800 ve 1200 mg/L) ilave edildiğinde TUYA (asetik asit doza bağlı olarak artış; propiyonik, bütirik, isobütirik, valerik ve isovalerik asit düzeyinde ise azalış) düzeyini düşürdüğü belirlenmiştir (Kamalak ve ark 2011). Rasyonlarına sarımsak ve narenciye ekstresi ilavesi yapılan süt ineklerinde kontrol gruba göre UYA üzerine etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Khurana ve ark 2023). Koyunlarda yapılan çalışmada rumen sıvısına 300 mg/L portakal esansiyel yağı ilavesinin TUYA ve asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit, isobütirik asit, valerik asit ile isovalerik asit düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir (Canbolat 2012). Bu çalışma sonuçları dikkate alındığında %2,5-5 düzeylerinde narenciye ekstresi ilavesinin TMR çeşidi fark etmeksizin daha fazla TUYA üretimine etki ettiği ifade edilebilir.

Diğer çalışmalara bakıldığında keçilerden elde edilen rumen içeriğine farklı oranlarda (%0, %10, %20 ve %30) kurutulmuş turunçgil posası ilavesinin *in vitro* kuru madde sindirilebilirliğini (IVKMS) artırdığı belirlenmiştir. Araştırma sonunca %30 oranında kurutulmuş narenciye posası ilavesinin IVKMS ile IVOMS üzerine olumlu etkileri olduğu ifade

edilmiştir (Hernandez ve ark 2012). Fistüllü koyunlardan elde edilen rumen içeriğine esansiyel portakal yağı artan dozlarda (0, 100, 200, 400, 800 ve 1200 mg/L) ilave edildiğinde, organik madde sindirilebilirliği, gerçek kuru madde sindirilebilirliği ve nötr deterjan lifi sindirilebilirliğini azalttığı belirlenmiştir (Kamalak ve ark 2011). Ruminant rasyonlarına 150 g/kg oranında narenciye posası ilave edildiğinde, KM, OM, HP ve NDF sindirilebilirliğinin azalabileceği belirlenmiştir. Bu durumun posalarda bulunan polifenollerin, proteinler ve karbonhidratlar gibi doğal polimerlerle kompleksler oluşturarak, ruminantlarda sindirilebilirliği azaltabileceği teorisi ile açıklanmaktadır. Sınırlı sayıda araştırmada ise ruminant rasyonlarına KM düzeyinde 50-100 g/kg oranında narenciye yan ürünü ilave edildiğinde KM, OM, HP, NDF ve ADF sindirilebilirliğinin arttığı bildirmiştir. Sonuçta ruminant rasyonlarına 150 g/kg narenciye yan ürünleri ilavesinin besinlerin sindirilebilirliği üzerinde olumsuz etkilere yol açmayabileceği ifade edilmiştir (Tayengwa ve Mapiye 2018). Fistüllü koyunlardan elde edilen rumen içeriğine farklı narenciye posaları (portakal, mandalina, limon, greyfurt) ilave edilerek yapılan *in vitro* çalışmada, organik madde sindirilebilirlik değerinin %82,72 ile %91,53 arasında olduğu belirlenmiştir (Güven ve Kamalak 2017). Koyunlarda yapılan çalışmada, *in vitro* ortamda rumen sıvısına 300 mg/L portakal esansiyel yağı (Canbolat 2012) veya rumen kanüllü koyunlardan elde edilen rumen içeriğine 0, 400, 800 ve 1200 mg/L oranında portakal yağı ilavesinin organik madde sindirilebilirliğini azalttığı, ruminant beslemede düşük oranlarda kullanılması gerektiği ve yüksek dozların rumen fonksiyonu ve yemden yararlanmayı düşüreceği ifade edilmiştir (Canbolat ve ark 2011). Mevcut çalışmada ise gruplar arası daisy sonuçları değerlendirildiğinde narenciye ekstraktı ve monensin eklenen gruplarda IVNDFS ve IVGS değerlerinde kontrol grubuna göre düşmeler literatür bilgileriyle paralel bulunmuştur (Kamalak ve ark 2011; Canbolat ve ark 2011; Canbolat 2012).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Geniş getiren hayvanlarda verim artırma amacı ile yem katkı maddesi olarak özellikle iyonofor grubu antibiyotiklerin kullanımı kansorejen olmaları, bakteriyel direnci uyarmaları ve çevre kirliliğine neden olmaları nedeniyle kısıtlanmış ve/veya yasaklanmıştır. Bu tez çalışması ile *in vitro* ortamda rumen içeriğine narenciye (*citrus*) ekstraktı (%2,5; %5) ilavesinin pH, amonyak, uçucu yağ asitleri, *in vitro* gaz üretimi, fermentasyon kinetikleri ile *in vitro* kuru madde nötral deterjan lif sindirilebilirliği, gerçek kuru madde sindirilebilirliği ve organik madde sindirilebilirliği üzerine etkileri belirlendi.

Sonuç olarak narenciye ekstraktı eklenen gruplar (bilhassa %5 içeren) diğer gruplara göre daha az rumen amonyak ($\text{NH}_3\text{-N}$) değeri ile metan (CH_4) üretimine, TMR çeşidi fark etmeksizin daha fazla toplam uçucu yağ asidi (TUYA) oluşumuna, *in vitro* gaz üretimine (VF), mikrobiyal kütle üretim (MBP_{24}) değerine ve en yüksek fermentasyon hızı oranına (kd) sebep olmuştur. Daisy sonuçlarına göre konsantre yem ağırlıklı TMR'lerin narenciye ekstraktı ve monensin ilavesinin $\% \text{IVNDFS}_{\text{KM}}$ ile $\% \text{IVGS}_{\text{KM}}$ değerlerinde düşmelere neden olmuştur. Gruplar arasında $\% \text{IVOMS}_{\text{KM}}$ değeri en düşük $\text{TMR}_{\text{KON-M}}$ grubunda belirlenirken, en yüksek değerler ise $\text{TMR}_{\text{KON-C}}$, $\text{TMR}_{\text{KAB-C2,5}}$, $\text{TMR}_{\text{KAB-C5}}$ ve $\text{TMR}_{\text{KAB-M}}$ gruplarında belirlenmiştir.

Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde narenciye (*citrus*) flavonoidlerinin iyonofor antibiyotiklere bir alternatif olabileceği görülmektedir. *İn vitro* denemeden elde edilen bu sonuçların farklı ekstraksiyon yöntemleri ve değişen dozlar kullanılmak suretiyle *in vivo* çalışmalarla daha detaylı bir şekilde araştırılarak desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Afzalani, Zein M, Jamarun N, Musnandar E, 2015. Effect of increasing doses of essential oil extracted from berastagi orange (*Citrus sinensis* L.) peels on performance, rumen fermentation and blood metabolites in fattening bali cattle. *Pak J Nutr*, 14:480-486.
- Ahmed E, Batbekh B, Fukuma N, Kand D, Hanada M, Nishida T, 2021. A garlic and citrus extract: Impacts on behavior, feed intake, rumen fermentation, and digestibility in sheep. *Anim Feed Sci Technol*, 278:115007.
- Aliç Ural D, Erdoğan S, Balıkcı C, Ayan A, Erdoğan H, Ural K, 2021. Turunçgil ekstraktı anti-giardial terapötik destek sağlayabilir mi?. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 16:149-154.
- Aliç Ural D, Erdoğan S, Erdoğan H, Zararyok G, Doğan B, Ural K, 2022. Investigation the effectiveness of citrus extract application on stool consistency and hide cleanliness in diarrhoeic and non-diarrhoeic calves at field conditions. *J Adv VetBio Sci Tec*, 7:283-288.
- Amin N, Bailoni L, Wendler KR, Caldwell J, Pourazad P, 2021. Effects of citrus flavonoid, vanillin, and their combination on in vitro rumen fermentation parameters and methane production. 9. Boku-Symposium Tierernährung, Universität für Bodenkultur Wien, Austria, pp:1-4.
- Aras Y, Uysal O, Subaşı OS, Gültekin U, Budak DB, Kafa G, 2016. Türkiye’de turunçgil ihracatında stratejilerin belirlenmesi. XII. Ulusal Tarım Ekonomi Kongresi, 25-27 Mayıs, Isparta, pp:1311-1320.
- Arslan C, Çelebi E, 2017. Ruminantlarda rumende oluşan metan üretimini azaltmaya yönelik çalışmalar. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 12(3):327-337.
- Atlı HF, Söyler O, 2018. Dünyada ve türkiye’de turunçgil üretiminin ve ihracatının değerlendirilmesi. *J Acad Soc Sci*, 6:357-366.
- Bampidis VA, Robinson PH, 2006. Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Anim Feed Sci Technol*, 128:175-217.
- Başar Y, Atalay Aİ, 2020. Turunçgil posalarının ruminant beslemede alternatif yem kaynağı olarak kullanımı ve metan üretim kapasiteleri. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10:1449-1455.
- Bedestenci HÇ, Vuruş H, 2000. Türkiye’de turunçgil üretimi ve geleceği. *Fen ve Mühendislik Dergisi*, 3:149-159.
- Berardinelli P, Ianniciello R, Russo V, Ninios T. 2014. Post-Mortem Inspection and Related Anatomy. *Meat Inspection and Control in the Slaughterhouse*, 73-155.
- Beyzi SB, Ülger İ, Kaliber M, Konca Y, 2018. Determination of chemical, nutritional and fermentation properties of citrus pulp silages. *Turk J Agr Food Sci Tec*, 6:1833-1837.
- Blümmel M, Steinga H, Becker K. 1997. The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *Br J Nutr*, 77, 911-921.
- Blümmel M, Aiple KP, Steingass H, Becker K, 1999. A note on the stoichiometrical relationship of short chain fatty acid production and gas evolution in vitro in feedstuffs of widely differing quality. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 81, 157-167.
- Boadi D, Benchaar C, Chiquette J, Masse D, 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Can J Anim Sci*, 84:319-335.
- Canbolat Ö, 2012. Bazı esansiyel yağların in vitro sindirim, rumen fermantasyonu ve metan gazı üretimi üzerine etkileri. *Iğdır Univ J Inst Sci Tech*, 2:91-98.
- Canbolat Ö, Kalkan H, Karaman Ş, Filya İ, 2011. Esansiyel yağların sindirim, rumen fermantasyonu ve mikrobiyal protein üretimi üzerine etkileri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17:557-565.
- Coşkun D, Yazar E, 2019. Sığırlarda monensin kullanımı, in: Büyükbaş Hayvan Yetiştiriciliğinde Kullanılan İlaçlar, Ed: Vural H, Türkiye Klinikleri, 1. Baskı, Ankara, Türkiye, pp:1-5.
- Curabay B, Filya İ, Canbolat Ö. 2020. Bazı esansiyel yağların yonca kuru otunun in vitro sindirilebilirliği, rumen fermantasyonu ve metan gazı üretimi üzerine etkileri. *Bursa Uludağ Üniv Ziraat Fak Derg*, 34:19-35.
- Dominguez-Vigil IG, Camacho-Corona MR, Heredia-Rojas JA, Vargas-Villarreal J, de la Fuente AOR, Heredia-Rodriguez O, Mata-Cardenas BD, 2015. Anti-giardia activity of hexane extract of citrus aurantifolia (christim) swingle and some of its constituents. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 12(2):55-59.

- Eger M, Graz M, Riede S, Breves G, 2018. Application of Mootral™ reduces methane production by altering the Archaea community in the rumen simulation technique. *Front Microbiol*, 9:2094
- Gemalmaz E, Bilal T, 2016. Alternatif kaba yem kaynakları. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*, 56:63-69.
- Gülşen N, 2020. Sütten kesim döneminde buzağların beslenmesi ve buzağı kayıplarının önlenmesi, in: Buzağı Kayıplarının Önlenmesinde Buzağı Sağlığı ve Yetiştiriciliği, Eds: Erdem H, Çiftci E, Işık K, Yorgancılar M, Yaralı C, Medisan, Ankara, Türkiye, ss:49-52.
- Gümüş E, Küçükersan S, 2018. Buzağlarda preruminant dönem beslenmesinin rumen gelişimi üzerine etkisi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 13: 98-105.
- Gür G, Öztürk H, 2021. Ruminantlarda metan salinimini azaltma stratejileri. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 12:43-54.
- Güven İ, Kavalak A, 2017. Effect of species on nutritive value and methane production of citrus pulps for ruminants. *Hayvansal Üretim*, 58:8-12.
- Güzel M, Akpınar Ö, 2017. Turunçgil kabuklarının biyoaktif bileşenleri ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. *GUSTIJ*, 7:153-167.
- Habeeb AAM, 2023. Importance of utilization of citrus by-product waste in ruminant animal nutrition. *Ind J Agr Life Sci*, 3:1-9.
- HBS-tar, 2024. Monensin sodyum, <https://hbs.tarbil.gov.tr/Receipt/SearchProduct>, erişim tarihi: 21.10.24
- Hernandez J, Rojo R, Salem AZM, Mirzaei F, Gonzalez A, Vazquez JF, Montanez OD, Lucero FA, 2012. Influence of different levels of dried citrus pulp on in vitro ruminal fermentation kinetics of total mixed ration in goat rumen inocula. *J Anim Feed Scie*, 21:458–467.
- Johnson KA, Johnson DE, 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci*, 73:2483–2492.
- Junior PCGD, Silva ALA, dos Santos IJ, Soares LCB, Carlis MSP, Vicente ACS, Souza TT, de Assis RG, Biava JS, Quigley S, Pires AV, Ferreira EM, 2024. Orange (*Citrus sinensis*) essential oil inclusion in high-energy diets for feedlot lambs: productivity, eating behavior, carcass characteristics, rumen morphometry, and fatty acid profile of the meat. *Smal Rumin Res*, 238:107326.
- Junior RAB, Minervino AHH, Rodrigues FAML, Antonelli AC, SUCUPIRA MCA, Mori CS, Ortolani EL, 2008. [Comparative study of the citrus pulp to cause acute rumen lactic acidosis in cattle], *Braz J Vet Res Anim Sci*, Sao Paulo, 45:421-428.
- Kamalak A, Atalay AI, Ozkan CO, Tatliyer A, Kaya E, 2011. Effect of essential orange (*Citrus sinensis* L.) oil on rumen microbial fermentation using in vitro gas production technique. *J Anim Plant Sci*, 21:764-769.
- Kaya A, Ateş M, 2014. Türkiye turunçgil üretiminde hatay ilinin yeri. *International Conference on Global Practice of Multidisciplinary Scientific Studies-VII July 04-06, Kyrenia, Cyprus*, pp:468-477.
- Keser O, Kutay HC, 2021. Küresel ısınmaya karşı ruminantlarda metan emisyonunu azaltmaya yönelik besleme stratejileri. *Türk Bil Der Der*, 14:138-159.
- Khurana R, Brand T, Tapio I, Bayat AR, 2023. Effect of a garlic and citrus extract supplement on performance, rumen fermentation, methane production, and rumen microbiome of dairy cows. *J Dairy Sci*, 6:4608-4621.
- Koyuncu M, Akgün H, 2018. Çiftlik hayvanları ve küresel iklim değişikliği arasındaki etkileşim. *U Ü Zir Fak Der*, 32:51-164.
- Koyuncu M, Akgün H, 2018. Çiftlik hayvanları ve küresel iklim değişikliği arasındaki etkileşim. *U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 32:151-164.
- Kutlu HS, Serbester U, 2014. Ruminant beslemede son gelişmeler. *Turk J Agr Food Sci Tec*, 2:18-37.
- Lopez S, Dhanoa MS, Dijkstra J, Bannink A, Kebreab E, France J, 2007. Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. *Anim Feed Sci Technol*, 135:139–156.
- Maria C, Membrive B, 2016. Anatomy and physiology of the rumen, in: *Rumenology*, Eds: Millen DD, De Beni Arrigoni M, Pacheco RDL, Springer International Publishing, Switzerland, pp:1-38.
- McGee M, O'Connor A, Cormican P, O'Kiely P, Moloney AP, 2024. Digestion, nitrogen excretion and rumen microbial communities in beef cattle, and in vitro methane output, of fresh temperate grass with or without citrus pulp supplementation. *Anim Feed Sci Technol*, 316:116059.

- McGinn SM, Beauchemin KA, Coates T, Colombatto D, 2004. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *J Anim Sci*, 82:3346-3356.
- Menke HH, Steingass H, 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim Res Develop*, 28:7-55.
- Meral Y, Biricik H, 2013. Ruminantlarda metan emisyonunu azaltmak için kullanılan besleme yöntemleri. VII. Ulusal Hayvan Besleme Kongresi, 26-27 Eylül 2013, Ankara.
- Millen DD, Pacheco RDL, Cabral LS, Cursino LL, Watanabe DHM, Rigueiro ALN, 2016. Ruminant acidosis, in: *Rumenology*, Eds: Millen DD, de Beni Arrigoni M, Pacheco RDL, Springer International Publishing, Switzerland, pp:127-156.
- Moss AR, Jouany JP, Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. In *Proceedings of the Annales De Zootechnie; Institut National de la Recherche Agronomique: Paris, France*, pp. 231-253.
- Nagaraja TG, 2016. Microbiology of the rumen, in: *Rumenology*, Eds: Millen DD, De Beni Arrigoni M, Pacheco RDL, Springer International Publishing, Switzerland, pp:39-62.
- NRC- National Research Council, 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. Seventh Revised Edition, National Academy Press, Washington DC.
- Olomola OO, Babayemi OJ, Akinsoyinu AO, 2008. Performance characteristics and nitrogen utilization of pregnant west african dwarf goats fed groundnut cake, urea and rumen epithelial wastes in cassava flour and citrus pulp-based diets. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 8:61-67.
- Owens FN, Basalan M, 2016. Ruminant fermentation, in: *Rumenology*, Eds: Millen DD, De Beni Arrigoni M, Pacheco RDL, Springer International Publishing, Switzerland, pp:63-102.
- Öztürk H, Gür G, 2021. Rumen physiology: microorganisms, fermentation and manipulation. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 68:423-434.
- Öztürk H, Pişkin İ, 2009. Rumen asidozuna fizyopatolojik bakış. *Vet Hekim Der Derg*, 80:3-6.
- Paniagua M, Crespo FJ, Aris A, Devant M, 2021. Effects of flavonoids extracted from citrus aurantium on performance, behavior, and rumen gene expression in holstein bulls fed with high-concentrate diets in pellet form. *Animals*, 11:1387.
- Paniagua M, Crespo FJ, Bach A, Devant M, 2018. Effects of flavonoids extracted from Citrus aurantium on performance, eating and animal behavior, rumen health, and carcass quality in Holstein bulls fed high-concentrate diets. *Anim Feed Sci Technol*, 246:114-126.
- Paniagua M, Crespo JF, Aris A, Devant M, 2022. Supplementing citrus aurantium flavonoid extract in high-fat finishing diets improves animal behavior and rumen health and modifies rumen and duodenum epithelium gene expression in holstein bulls. *Animals*, 12:1972.
- Paniagua M, Crespo J, Arisa A, Devanta M, 2019. Citrus aurantium flavonoid extract improves concentrate efficiency, animal behavior, and reduces rumen inflammation of Holstein bulls fed high-concentrate diets. *Anim Feed Sci Technol*, 258:114304.
- Rodrigues PHM, 2016. Control and manipulation of ruminal fermentation, in: *Rumenology*, Eds: Millen DD, de Beni Arrigoni M, Pacheco RDL, Springer International Publishing, Switzerland, pp:157-188.
- Sallam SMA, Abdelgaleil SAM 2010. Effect of different levels of citrus essential oil and its active component on rumen microbial fermentation and methane production in vitro (abstract). *Cuban J Agr Sci*, 44:4
- Sarthak, Madan J, Kumar S, Sindhu S, 2024. Effect of citrus based plant extracts on in-vitro rumen fermentation parameters. *Haryana Vet*, 63(SI):26-31.
- Sauer FD, Fellner V, Kinsman R, Kramer JKG, Jackson HA, Lee AJ, Chen S, 1998. Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet get access arrow. *J Anim Sci*, 76:906-914.
- Tayengwa T, Mapiye C, 2018. Citrus and winery wastes: promising dietary supplements for sustainable ruminant animal nutrition, health, production, and meat quality. *Sustainability*, 10:3718.
- Tortopoğlu İ, 1980. Akdeniz bölgesinde turuncgöl konsantresi üretimi ve sorunları. *Gıda*, 5:47-49.
- Ülger İ, Beyzi SB, Kaliber M, Konca Y, 2020. Chemical, nutritive, fermentation profile and gas production of

- citrus pulp silages, alone or combined with maize silage. *South Afr J Anim Sci*, 50:161-169.
- Weatherburn MW, 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia, *Anal Chem*, 39:971-974.
- Xue D, Chen H, Luo X. 2021. Methane Emissions Regulated by Microbial Community Response to the Addition of Monensin and Fumarate in Different Substrates. *Appl Sci*, 11, 6282. <https://doi.org/10.3390/app11146282>
- Yazar E, 2024. Kemoterapötikler, in: *Veteriner İlaç Rehberi Tedavi El Kitabı*, Ed: Yazar E, Nobel yayın evi, İstanbul, Türkiye, ss:83-243.
- Yu S, Li L, Zhao H, Zhang S, Tu Y, Liu M, Zhao Y, Jiang L, 2023. Dietary citrus flavonoid extract improves lactational performance through modulating rumen microbiome and metabolites in dairy cows (abstract). *Food Funct*, 14:94-111.
- Yu S, Zhao Y, Li L, Zhao H, Liu M, Jiang L, 2024. Flavonoids from citrus peel display potential synergistic effects on inhibiting rumen methanogenesis and ammoniogenesis: A microbiome perspective. *Environ Sci Pollut Res Int*, 31:21208-21223.

