



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**KOYUNLARDA ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKTININ
IN VITRO VE *IN VIVO* BESİN MADDE
SİNDİRİLEBİLİRLİĞİ İLE RUMEN
FERMENTASYONU, BAZI KAN PARAMETRELERİ
VE ANTİOKSİDAN KAPASİTE ÜZERİNE ETKİSİ**

Doktora Tezi

Pınar ÖZDEMİR

Zootečni Anabilim Dalı

İzmir

2021

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**KOYUNLARDA ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKTININ
IN VITRO VE *IN VIVO* BESİN MADDE
SİNDİRİLEBİLİRLİĞİ İLE RUMEN
FERMENTASYONU, BAZI KAN PARAMETRELERİ
VE ANTİOKSİDAN KAPASİTE ÜZERİNE ETKİSİ**

Pınar ÖZDEMİR

Danışman: Prof. Dr. Hatice BASMACIOĞLU MALAYOĞLU

Zootečni Anabilim Dalı
Yemler ve Hayvan Besleme Doktora Programı

İzmir
2021

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Koyunlarda Zeytin Yaprağı Ekstraktının *In Vitro* ve *In Vivo* Besin Madde Sindirilebilirliği ile Rumen Fermentasyonu, Bazı Kan Parametreleri ve Antioksidan Kapasite Üzerine Etkisi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

15/06/2021

Pınar ÖZDEMİR

ÖZET**KOYUNLARDA ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKTININ *IN VITRO*
VE *IN VIVO* BESİN MADDE SİNDİRİLEBİLİRLİĞİ İLE RUMEN
FERMENTASYONU, BAZI KAN PARAMETRELERİ VE
ANTIOKSİDAN KAPASİTE ÜZERİNE ETKİSİ**

ÖZDEMİR, Pınar

Doktora Tezi, Zootečni Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice BASMACIOĞLU MALAYOĞLU

Nisan 2021, 132 sayfa

Bu çalışmada; zeytin yaprağı ekstraktının koyunlarda *in vitro* ve *in vivo* besin madde sindirilebilirliği ile rumen fermentasyonu, bazı kan parametreleri ve antioksidan kapasite üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada zeytin yaprağı ekstraktının oleuropein ve toplam fenolik madde içeriği, *in vitro* antioksidan (DPPH ve TEAC yöntemine göre) ve seçilen test mikroorganizmaları (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* ve *Staphylococcus aureus*) üzerinde antimikrobiyal aktivitesi saptanmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktının (oleuropein içeriği baz alınarak) 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 ppm oleuropein içerecek şekilde farklı dozlarının yonca kuru otu, arpa ve ayçiçeği küspesinin (ATK) *in vitro* besin madde sindirilebilirliği üzerine etkisi belirlenmiştir. *In vitro* denemeden elde edilen bulgulara göre 200 ppm (OLE200) ve 400 ppm (OLE400) oleuropein dozları seçilerek klasik sindirim denemesi yürütülmüştür. *In vivo* denemenin sonunda yemlemeden önce ve yemlemeden 2, 4, 6 ve 8 saat sonra alınan rumen sıvılarında pH ölçülmüş ve rumen metabolitleri (asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit, toplam uçucu yağ asitleri (TUYA), amonyak azotu (NH₃-N) ve protozoa sayısı) saptanmıştır. Yemlemeden önce ve yemlemeden 2 ve 4 saat sonra alınan kan örneklerinde bazı biyokimyasal, oksidan ve antioksidan parametreler belirlenmiştir.

Oleuropein içeriği 220.30 mg/g ve toplam fenol içeriği 177.28 mg GAE/g olarak saptanan zeytin yaprağı ekstraktının *in vitro* antioksidan aktivitesi ise DDPH ve TEAC yöntemine göre sırasıyla %84.89 ve 12.13 g/100 g olarak saptanmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktı tüm test mikroorganizmaları üzerinde olmakla birlikte *Staphylococcus aureus* üzerinde 0.375 mg/mL MİK değerı ve 29 mm inhibisyon zon çapı ile en yüksek, *Enterococcus faecalis* üzerinde 1.5 mg/mL MİK değerı ve 8.5 mm inhibisyon zon çapı ile en düşük antimikrobiyal aktiviteyi göstermiştir. Artan dozlarda zeytin yaprağı ekstraktının yonca kuru otu, arpa ve ATK'nin *in vitro* besin madde sindirilebilirliği üzerine etkisi önemli düzeyde olmakla birlikte doza bağlı olarak ortalamalar arasında dalgalanmaların olduğu görölmüştür. *In vivo* denemede muamelenin kuru madde, organik madde, ham selüloz, nötral deterjan lifi (NDF) ve asit deterjan lifi (ADF) üzerine etkisi önemsiz, ham protein ve ham yağ sindirilebilirliği üzerine etkisi ise önemli düzeyde saptanmıştır. Ham protein sindirilebilirliği OLE200 ve OLE400 gruplarında, ham yağ sindirilebilirliği ise sadece OLE400 grubunda kontrole göre önemli düzeyde düşmüştür. Rumen sıvısı propiyonik asit ve TUYA düzeyi OLE200 grubunda düşerken AA/PA ise her iki oleuropein dozu ile artmıştır. Rumen sıvısı NH₃-N düzeyi OLE200 grubunda OLE400 grubuna göre daha düşük saptanmakla birlikte rumen sıvısı pH'sı ve protozoa sayısı muameleden etkilenmemiştir. Kan glikoz düzeyi OLE400 grubunda OLE200 grubuna göre, toplam oksidan seviye (TOS) ve toplam glutasyon (GSH) düzeyi sadece OLE400 grubunda; trigliserit, toplam antioksidan seviye (TAS) ve malondialdehit (MDA) düzeyi ise her iki muamele grubunda kontrole göre artmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada zeytin yaprağı ekstraktının (200 ppm ve 400 ppm oleuropein) *in vivo* besin madde sindirilebilirliği (ham protein ve ham yağ), rumen sıvısı UYA (propiyonik asit ve bütirik asit) ve TUYA düzeyi, AA/PA, biyokimyasal (trigliserit) ve oksidan (MDA ve TOS) parametreler üzerinde etkisi olumsuzdur. İleri ki *in vivo* çalışmalarda 200 ppm oleuropein dozunun altındaki dozların etkisi araştırılmalıdır.

Anahtar sözcükler: Zeytin yaprağı ekstraktı, oleuropein, koyun, rumen fermentasyonu, sindirilebilirlik, kan parametreleri.

ABSTRACT**EFFECTS OF OLIVE LEAF EXTRACTS ON *IN VITRO* AND *IN VIVO* NUTRIENT DIGESTIBILITY, RUMEN FERMENTATION, SOME BLOOD PARAMETERS AND ANTIOXIDANT CAPACITY IN SHEEP**

OZDEMIR, Pınar

PhD in Department of Animal Science

Supervisor: Prof. Dr. Hatice BASMACIOGLU MALAYOGLU

April 2021, 132 pages

In this study; the effects of olive leaf extract on *in vitro* and *in vivo* nutrient digestibility, rumen fermentation, some blood parameters and antioxidant capacity in sheep were investigated. Oleuropein and total phenol content, *in vitro* antioxidant (according to DPPH and TEAC method) and selected on all test microorganism (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus*) antimicrobial activity of olive leaf extract were determined in the study. The effects of different doses of olive leaf extract (based on oleuropein content) containing 100, 150, 200, 250, 300, 350 and 400 ppm oleuropein, on *in vitro* nutrient digestibility of alfalfa hay, barley and sunflower meal (SFM) were identified. A classical digestion trial was conducted with oleuropein doses selected of 200 ppm (OLE200) and 400 ppm (OLE400) based on findings from the *in vitro* study. At the end of the *in vivo* study, pH and rumen metabolites (acetic acid, propionic acid, butyric acid, total volatile fatty acids (TVFA), ammonia nitrogen (NH₃-N) and protozoa counts) were measured in rumen fluid samples taken just before feeding and at 2, 4, 6 and 8 hours after feeding. Some biochemical, oxidant and antioxidant parameters were also determined in blood samples taken just before feeding and at 2 and 4 hours after feeding.

Olive leaf extract with an oleuropein content of 220.30 mg/g and total phenolic content of 177.28 mg GAE/g was found to have antioxidant activity to

determined as 84.89% (DPPH) and 12.13 g/100 g (TEAC). Olive leaf extract showed antimicrobial activity on all test microorganisms which the highest antimicrobial activity on *Staphylococcus aureus* with 0.375 mg/mL MIC value and 29 mm inhibition zone diameter, but the lowest on *Enterococcus faecalis* with 1.5 mg/mL MIC value and 8.5 mm inhibition zone diameter. The effects of increasing doses of olive leaf extract on *in vitro* nutrient digestibility of alfalfa hay, barley and SFM were significant, while fluctuations were observed among the means for the doses. In the *in vivo* study, the effect of the treatment on dry matter, organic matter, crude fiber, neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) were found to be insignificant, crude protein and crude fat digestibility were found to be significant. The crude protein digestibility decreased significantly in the OLE200 and OLE400 groups, while crude fat digestibility only in the OLE400 group compared to the control. The level of propionic acid and TVFA in the rumen fluid samples was found to decreased in the OLE200 group, whereas the AA/PA ratio increased with the addition of both doses of oleuropein. Although the levels of $\text{NH}_3\text{-N}$ was lower in OLE200 group compared to OLE400 group, pH value of rumen fluid and protozoa counts was not affected by the treatment. Blood glucose levels were increased in OLE400 groups compared to the OLE200, total oxidant status (TOS) and total glutathione (GSH) levels were found to be increased only in the OLE400 group; triglyceride, total antioxidant status (TAS) and malondialdehyde (MDA) levels were increased in both treatment groups compared to the control.

As a result, the olive leaf extract (200 ppm and 400 ppm oleuropein) effect was negative on *in vivo* nutrient digestibility (crude protein and crude fat), rumen fluid VFA (propionic acid and butyric acid) and TVFA levels, AA/PA, biochemical (triglyceride), oxidant (MDA and TOS) in this study. The effects of doses below 200 ppm oleuropein should be investigated further *in vivo* studies.

Keywords: Olive leaf extract, oleuropein, sheep, rumen fermentation, nutrient digestibility, blood parameters.

ÖNSÖZ

Bu çalışma da zeytin yaprağı ekstraktının koyunlarda *in vitro* ve *in vivo* besin madde sindirilebilirliği ile rumen fermentasyonu, bazı kan parametreleri ve antioksidan kapasite üzerine etkileri araştırılarak ruminantlarda yem katkısı olarak kullanılma potansiyeli araştırılmıştır. Proje (TAGEM/HAYSÜD/14/A07/P01/005) Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenmiş ve Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü bünyesinde yürütülmüştür.

Dünyada hızlı nüfus artışı ve artan gelirle birlikte hayvansal ürünlere olan ihtiyaç artmakta bu amaçla da hayvanlardan kısa sürede daha fazla verim alma konusunda çalışmalar sürmektedir. Bu amaçla çeşitli antibiyotikler ve sentetik antioksidanlar kullanılmıştır. Son yıllarda tüketicilerin doğal ve insan sağlığına zarar vermeyen ürünleri tercih etmesiyle doğal alternatif yem katkı maddelerinin kullanımı gündeme gelmiştir. Bunlardan biri de antioksidan ve antimikrobiyal özelliğe sahip olan zeytin yapraklarıdır. Ülkemizin zeytin ağaçları bakımından zengin olduğu düşünüldüğünde yan ürün olan yapraklarının hayvan besleme açısından doğal bitkisel yem katkı maddesi olma potansiyeli tez konusunu belirlemede etkili olmuştur. Ayrıca diğer doğal bitkisel ekstraktlarla yapılan çalışmalar olmakla birlikte Türkiye ekonomisi ve sürdürülebilirlik açısından bu konuda yapılan çalışmaların sayısı oldukça sınırlıdır. Zeytin yaprağı gibi diğer bazı agro-endüstriyel yan ürünlerinin antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri dikkate alındığında ruminant beslemede alternatif yem katkı maddeleri olarak kullanılabilirliği önem arz etmektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar gerek uygulamaya ve gerekse ileriki dönemde bu konuda ruminantlar ile yapılan çalışmalara önemli bir kaynak oluşturacaktır.

İZMİR

17/06/2021

Pınar ÖZDEMİR

İÇİNDEKİLERSayfa

İÇ KAPAK	ii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xx
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Rumen	4
2.2 Ruminal Fermentasyon	8
2.2.1 Karbonhidrat metabolizması.....	9
2.2.2 Protein metabolizması	11

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.2.3 Yağ metabolizması	12
2.3 Fitokimyasallar	13
2.3.1 Zeytin üretimi.....	25
2.3.2 Zeytin yaprağı ve kimyasal bileşimi	26
2.3.3 Zeytin yaprağı ekstraktı ve fenolik madde içeriği.....	27
2.3.4 Zeytin yaprağı ve ekstraktının antimikrobiyal etkisi.....	30
2.3.5 Zeytin yaprağı ve ekstraktının antioksidan etkisi.....	32
2.3.6 Ruminant beslemede zeytin yaprağı ve ekstraktının kullanımına yönelik çalışmalar	35
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	38
3.1 Materyal.....	38
3.1.1 Hayvan materyali	38
3.1.2 Yem materyali.....	39
3.1.3 Zeytin yaprağı ekstraktı	41
3.2 Yöntem	41
3.2.1 Zeytin yaprağı ekstraktının oleuropein ve toplam fenolik madde içeriği ile antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi	41

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.2 <i>In vitro</i> ve <i>in vivo</i> denemede kullanılan yemlerin ham besin madde analizleri.....	45
3.2.3 <i>In vitro</i> besin madde sindirilebilirliği.....	46
3.2.4 <i>In vivo</i> besin madde sindirilebilirliği	49
3.2.5 Rumen metabolitlerinin belirlenmesi.....	51
3.2.6 Biyokimyasal, oksidan ve antioksidan parametreler	52
3.2.7 İstatistiksel analizler.....	57
4. BULGULAR	58
4.1 Zeytin Yaprığı Ekstraktının Oleuropein ve Toplam Fenolik Madde İçeriği ile Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitesi	58
4.2 <i>In Vitro</i> Besin Madde Sindirilebilirliği	61
4.3 <i>In Vivo</i> Besin Madde Sindirilebilirliği.....	68
4.4 Rumen Metabolitleri	70
4.5 Biyokimyasal, Oksidan ve Antioksidan Parametreler	76
5. TARTIŞMA.....	85
5.1 Zeytin Yaprığı Ekstraktının Oleuropein ve Toplam Fenolik Madde İçeriği ile Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitesi	85

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
5.2 <i>In Vitro</i> Besin Madde Sindirilebilirliği	87
5.3 <i>In Vivo</i> Besin Madde Sindirilebilirliği	90
5.4 Rumen Metabolitleri	91
5.5 Biyokimyasal, Oksidan ve Antioksidan Parametreler.....	94
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	98
KAYNAKLAR DİZİNİ	102
TEŞEKKÜR	131
ÖZGEÇMİŞ.....	132
EKLER	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Ruminantlarda karbonhidrat sindirimi	9
2.2. Hekzos ve pentozların yıkımı	11
2.3. Ruminantlarda protein metabolizması.....	12
2.4. Ruminantlarda fitokimyasalların etki mekanizmaları	16
2.5. Hidrolize olabilen tanen ve kondanse tanenin kimyasal yapısı	17
2.6. Streoidal ve triterpenoid saponinlerin kimyasal yapısı	18
2.7. Ülkemizde zeytin ağacı sayısı ve üretim miktarlarının bölgelere göre dağılımı	26
3.1. Hayvan denemelerinin yürütüldüğü bireysel bölmeler	38
3.2. Sindirim denemesinin yürütüldüğü sindirim kafesleri	39
3.3. Zeytin yaprağı ekstraktı+oleuropein standardına ait kromatogram	42
3.4. Galik asit standart eğrisi	43
3.5. Troloks standart eğrisi	44
3.6. Rumen sıvısı alımı ve termosu aktarılması	46
3.7. Denemede kullanılan inkübatörler	47
3.8. F57 torbası, inkübasyon kavanozu ve çözünmeye dayanıklı kalem	47

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.9. <i>In vitro</i> besin madde sindirilebilirliği inkübasyon aşaması	48
3.10. Klasik sindirim denemesi gübre toplama.....	50
3.11. Kan örneklerinin alınması.....	53
3.12. Biyokimyasal, oksidan ve antioksidan parametrelerin ölçümü.....	54
3.13. Otoanalizör (Randox RX Monaco, Crumlin-UK)	54
3.14. ELISA cihazı.....	55
4.1. Disk difüzyon yöntemine göre test mikroorganizmalarının üreme inhibisyon zon çaplarının görüntüsü.....	59
4.2. Farklı konsantrasyonlarda ZYE'nin <i>B. subtilis</i> üzerine etkisi.	61
4.3. Farklı konsantrasyonlarda ZYE'nin <i>E. coli</i> üzerine etkisi.....	61
4.4. Yonca kuru otunun besin madde sindirilebilirliğinin muamele gruplarına göre değişimi	62
4.5. Ayçiçeği tohumu küspesi besin madde sindirilebilirliğinin muamele gruplarına göre değişimi	64
4.6. Arpa besin madde sindirilebilirliğinin muamele gruplarına göre değişimi.....	66
4.7. <i>In vitro</i> denemede pH'nın muamele gruplarında saate göre değişimi.....	68

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.8. Muamele gruplarında saate göre rumen sıvısı UYA ve TUYA düzeyleri ile AA/PA değişimi.....	73
4.9. Muamele gruplarında saate göre rumen sıvısı NH ₃ -N düzeyi, pH'sı ve protozoa sayısının değişimi.....	75
4.10. Muamele gruplarında saate göre biyokimyasal parametrelerin değişimi	79
4.11. Muamele gruplarında saate göre oksidan ve antioksidan parametrelerin değişimi	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Bazı rumen bakterileri	6
2.2. Rumendeki siliyatların fermente ettikleri maddeler ve son ürünleri	7
2.3. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması.....	14
2.4. Bazı fenolik asitlerin kimyasal yapısı.....	15
2.5. Ruminantlarda fitokimyasalların rumen fermentasyonu, sindirilebilirlik ve kan parametreleri üzerine etkileri	23
2.6. Zeytin yaprağı ve zeytin yaprağı+dalının kimyasal bileşimi, %.....	27
2.7. Zeytin yaprağı ekstraktında bulunan fenolik bileşikler ve miktarları.....	28
2.8. Zeytin yaprağı ekstraktında bulunan bazı fenolik bileşiklerin kimyasal yapısı	29
3.1. <i>In vitro</i> denemede kullanılan yemlerin besin madde içerikleri, % KM.....	39
3.2. <i>In vivo</i> denemede kullanılan kesif yemin yapısı ve kullanılan yemlerin (kesif, yonca kuru otu ve arpa samanı) besin madde içerikleri	40
3.3. Oleuropein analizi için HPLC sistemi çalışma koşulları	41
3.4. HPLC sistemi gradient çalışma koşulları.....	42
3.5. Tampon çözeltilerinin (A ve B) hazırlanması	48

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.6. Uçucu yağ asitleri analizi için HPLC sistemi çalışma koşulları	51
4.1. Zeytin yaprağı ekstraktının oleuropein ve toplam fenolik madde içeriği ile antioksidan aktivitesi	58
4.2. Disk difüzyon yöntemine göre test mikroorganizmalarının üreme inhibisyon zon çapları.....	59
4.3. Zeytin yaprağı ekstraktının MİK değerleri (mg/mL)	60
4.4. Zeytin yaprağı ekstraktının artan dozlarda ilavesinin yonca kuru otunun <i>in vitro</i> KM, NDF ve OM sindirilebilirliği üzerine etkisi (%).....	62
4.5. Zeytin yaprağı ekstraktının artan dozlarda ilavesinin ayçiçeği tohumu küspesinin <i>in vitro</i> KM, HP ve OM sindirilebilirliği üzerine etkisi (%).....	64
4.6. Zeytin yaprağı ekstraktının artan dozlarda ilavesinin arpanın <i>in vitro</i> KM ve OM sindirilebilirliği üzerine etkisi (%)	66
4.7. <i>In vitro</i> denemede ZYE'nin artan dozlarda ilavesinin inkübasyon süresince belirlenen pH değeri üzerine etkisi	67
4.8. Zeytin yaprağı ekstraktının <i>in vivo</i> besin madde sindirilebilirliği üzerine etkisi, %	69
4.9. Zeytin yaprağı ekstraktının rumen sıvısı UYA ve TUYA düzeyi ile AA/PA üzerine etkisi.....	70

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)ÇizelgeSayfa

- 4.10. Zeytin yaprağı ekstraktının rumen sıvısı $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyi, pH'sı ve protozoa sayısı üzerine etkisi 74
- 4.11. Zeytin yaprağı ekstraktının biyokimyasal parametreler üzerine etkisi..... 76
- 4.12. Zeytin yaprağı ekstraktının oksidan ve antioksidan parametreler üzerine etkisi 80

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
g:	Gram
kg:	Kilogram
Mcal:	Megakalori
mL:	Mililitre
µl:	Mikrolitre
nm:	Nanometre
ppm:	mg çözünen / kg veya litre çözelti
mg:	Miligram
dL:	Desilitre
L:	Litre
mmol:	Milimol
dk:	Dakika
V, kW:	Vat, kilovat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
OLE:	Oleuropein
NDF:	Nötral deterjan lifi
ADF:	Asit deterjan lifi
ADL:	Asit deterjan lignin
KM:	Kuru madde
HP:	Ham protein
BUN:	Kan üre azotu
TAS:	Toplam antioksidan seviye
TOS:	Toplam oksidan seviye
MDA:	Malondialdehit
GSH:	Glutatyon
GPx:	Glutatyon peroksidaz
CAT:	Katalaz
SOD:	Süperoksit dismutaz

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
UYA:	Uçucu yağ asitleri
TUYA :	Toplam uçucu yağ asitleri
AA/PA:	Asetik asit/Propiyonik asit
HPLC:	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
DPPH:	2.2-difenil-1-pikrilhidrazi hidrat
TEAC:	Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite
NH ₃ -N:	Amonyak azotu
MİK:	Minimum inhibe edici konsantrasyon

1. GİRİŞ

Gelişmekte olan ülkelerde nüfus artışı ve artan gelirlerle birlikte tüketici talepleri doğrultusunda hayvancılığın ve hayvansal ürünlerin önemi gün geçtikçe artmaktadır. Artan talebin karşılanması için üretim artışı çevresel ve ekonomik sorunları beraberinde getirmiştir. Bu sorunların çözümünde hayvancılığın sürdürülebilir bir yaklaşımla yapılması önemlidir. Sürdürülebilirliği etkileyen en önemli unsurlardan biri yem maliyetidir. Ruminantlar rumenlerinde bulunan mikroorganizmaların fermentatif faaliyetleri sonucu insanlar tarafından değerlendirilemeyen düşük kaliteli selüloz içeriği yüksek ucuz tarımsal yan ürünleri tüketerek sürdürülebilir hayvancılık açısından önemlilik arz eder. Ayrıca bu ürünleri tüketerek hem yaşamlarını sürdürebilmekte hem de et, süt, yün ve deri gibi ekonomik değeri yüksek ürünlere dönüştürebilmektedirler (Öztürk, 2007). Ruminantlardan optimum verim almak için rumen ortamının rumen fermentasyonu ve mikrobiyal protein sentezi verimliliği açısından optimum manipülasyonu gerekmektedir. Bu amaçla düşük dozda antibiyotikler ve sentetik yem katkı maddeleri kullanılarak patojenik mikroorganizmaların kontrol altına alınmasına çalışılmış, mikrobiyel gelişim ve rumen fermentasyonunda iyileşmeler sağlanmıştır (McIntosh et al., 2003; Yalçın vd., 2011). Ancak antibiyotiklere karşı direnç kazanan mikroorganizmaların artması ve bu maddelerin hayvanların vücudunda hemen metabolize edilememesi ve insan sağlığını olumsuz yönde etkilemesi bu ürünlerin yerini alabilecek alternatif yem katkı maddelerinin (prebiyotikler, probiyotikler, enzimler, organik asitler, fitokimyasallar vb.) hayvan beslemede kullanılabilirliğini gündeme getirmiştir (Tuncer, 2007). Fitokimyasallar kapsamında bitkilerin, bitki uçucu yağların, bitki ekstraktlarının ve sekonder metabolitlerinin (fenolik bileşikler, tanenler, saponinler, karotenoidler, kumarinler, tokoferoller, terpenler, izotiyosiyanatlar ve terpenoidler, alkaloidler, flavonoidler) kullanıldığı görülmektedir. Söz konusu bu ürünlerin sadece antimikrobiyal etkilerinin olmadığı aynı zamanda antioksidan, antiinflamatuvar antifungal, antidiyabetik, antikanser ve antihipertansif etkilerinin de (Kaçar, 2008; Venturi et al., 2015; Demir ve Akpınar, 2020) olduğu birçok çalışma ile ortaya konmuştur. Sürdürülebilir hayvancılığın çevresel boyutu açısından da hayvan beslemede alternatif doğal yem katkı maddeleri olarak

fitokimyasalların kullanımı ile çevre kirliliğinin önemli düzeyde azaltılması mümkündür (Varel and Miller, 2001).

Hayvancılık sektöründe güvenilebilir ve sürdürülebilir yeni kaynakların kullanımı son derece önemlidir. Hayvancılıkta verimliliği artırmak ve sürekliliğini sağlamak, mevcut kaynakların en verimli şekilde değerlendirilmesi ile mümkündür. Tarımsal üretim ve bitkisel ürünlerin endüstriyel değerlendirilmesi sonucunda açığa çıkan çeşitli yan ürünler hayvan beslemede kullanılması ile sürdürülebilir hayvansal üretime önemli katkı sağlanabilir. Özellikle bu ürünlerin çevreye atıldığında yaydığı sera gazı miktarının oldukça yüksek olduğu düşünüldüğünde hayvan beslemede değerlendirilmesi verimli üretim ve daha az atık açısından değerlidir. Böylece ekonomik açıdan uygulanabilir, çevre açısından güvenli ve sosyal açıdan kabul edilebilir bir hayvansal üretim gerçekleştirilmiş olacaktır. Akdeniz ülkelerinin yıllardır sağlıklı beslenmesinde önemli rol oynayan zeytinin toplanması ve işlenmesi sırasında açığa çıkan yan ürünler bu açıdan önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Zeytin ağacı (*Olea europaea* L.) Yukarı Mezopotamya ve Güneybatı Asya kökenli olmakla birlikte yetiştirme alanı Türkiye ve Suriye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin bir bölümünü kapsamaktadır. Bu bölgeden zeytin yetiştiriciliği sırayla Anadolu'ya, Ege Denizi adalarına, Yunanistan, İtalya ve İspanya'ya, Mısır'a, Tunus ve Fas'a yayılmıştır (Ergülen vd., 2002). Zeytin ağacından ana ürün olarak zeytin ve zeytinyağı elde edilirken zeytinin toplanması ve zeytinyağı üretimi sırasında zeytin keki (prina), karasu, ince dallar ve zeytin yaprakları gibi yüksek miktarlarda çeşitli yan ürünler ortaya çıkar. Zeytin ağacından zeytinlerin çırpılarak toplanması, zeytin ağacı dallarının budanması ve yağa işlenmesi sırasında (toplam zeytin ağırlığının yaklaşık %10'u) oldukça yüksek miktarda zeytin yaprağı ortaya çıkar. Yüksek fenolik madde içeriğine sahip zeytin yaprağı tarih boyunca çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı gibi günümüzde tıp, kozmetik ve gıda sanayisi gibi farklı alanlarda kullanan zeytin yaprağına ilgi giderek artmıştır (Silva et al., 2006; Erbay ve İçier, 2008; Boudhrioua et al., 2009; De Castro and Capote, 2010; Tsimidou and Papoti, 2010). Zeytin yaprağı içerdiği bir çok fenolik bileşik (fenolik asitler sekoroididler, basit fenoller, flavanoidler ve terpenoidler) ile güçlü antimikrobiyal ve antioksidan özelliğe sahiptir (Silva et al., 2006; Sudjana et al., 2009). Özellikle zeytin yaprağının doğrudan veya ekstrakt olarak insan sağlığı açısından besin

takviyesi olarak kullanımı ticari potansiyelini güçlü kılmıştır (Papoti and Tsimidou., 2009; Suarez et al., 2010).

Bazı bitkilerin, bitki uçucu yağlarının, ekstraktlarının ve bileşenlerinin rumen fermentasyonu üzerine olan etkilerinin araştırıldığı *in vitro* (Agarwal et al., 2009; Giuburuncă et al., 2014; Kurniawati et al., 2018) ve *in vivo* (Chaves et al., 2008; Aazami et al., 2013; Khateri et al., 2017) çalışmalar bulunmakla birlikte söz konusu ürünlerin etki mekanizmaları, rumen fermentasyonu ile *in vitro* ve *in vivo* besin maddeleri kullanım etkinliğini iyileştirmek için optimum kullanım düzeyleri ile ilgili bilgiler sınırlıdır (Eryavuz vd., 2015; Ünal-Baruh ve Kocabağlı, 2017). Ayrıca agro-endüstriyel yan ürünlerin ruminantlarda etkilerini inceleyen *in vitro* (Öztürk vd., 2012) ve *in vivo* çalışmalar (Romero-Huelva and Molina-Alcaide, 2013; Moate et al., 2014) sınırlı olmakla birlikte zeytin yaprağı ekstraktının (ZYE) ruminantlarda *in vivo* besin madde sindirilebilirliği ve rumen fermentasyonu üzerine etkisini araştıran çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, zeytin yaprağı ekstraktının farklı dozlarının koyunlarda *in vitro* ve *in vivo* besin madde sindirilebilirliği ile rumen fermentasyonu, bazı kan parametreleri ve antioksidan kapasite üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ruminantlarda fitokimyasalların etkilerinin araştırılması yönünde yapılan çalışmaların sınırlı sayıda olması nedeniyle bu çalışmadan elde edilen sonuçların literatüre önemli katkı sağlayacağı ve elde edilecek çıktıların ileriki çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Rumen

Monogastrik hayvanlardan farklı olarak, ruminantların mideleri dört bölümden oluşur: abomasum, rumen, retikulum ve omasum. Bunlardan en önemlisi ve gelişmiş olanı rumen, retikulorumenin büyük kısmı olup zengin mikroorganizma içeriği ile ruminant beslenmesinde önemli rol oynar. Koyun ve sığırlarda rumen sindirim sistemi hacminin %64-71'ini ve toplam vücut hacminin %9-13'ünü temsil eder. Koyun ve keçide rumen hacmi 13-23 L, retikulum 1-2 L, omasum 0.3-0.9 L ve abomasum 1.75-3.3 L'dir (Van Soest, 1994).

Sığırlarda rumen duvarının iç yüzü yaklaşık 5 mm uzunluğunda ve 3 mm genişliğinde düzleştirilmiş papilla adı verilen küçük parmak benzeri çok katlı yassı olan çıkıntılarla kaplıdır. Retikulum, rumen ile omasum arasında bulunur. Mukozasında glandula bulunmayan retikulum altıgen bir bal peteği deseni şeklinde üzeri küçük papillalarla kaplıdır. Retikulumdaki papillaların sayıları az ve boyları kısadır. Altıgenler sığırlarda yaklaşık 2-5 cm genişliğindedir. Retikulorumen duvarının artan yüzey alanı sayesinde uçucu yağ asitlerinin (UYA) emilimi kolaylaşır. Retikulumdan omasuma açılan delik küçüktür. Küre biçiminde şekli olan omasum muskular tabaka ile doludur. Omasum duvarları boyunca uzanan ve büyük plaka benzeri kıvrımları olan laminaların içi selüloz içeriği yüksek yemlerin sindirimini sağlayan kısa papillalar ile doludur. Omasumdan abomasuma geçiş büyük ve oval bir delikten gerçekleşir. Abomasuma aktarılan içerik burada sindirime uğratılır.

Rumen hareketleri primer ve sekonder hareketler olmak üzere 2 şekildedir:

1. Primer hareketler: Bu hareketler primer kontraksiyon dalgası ya da ruminasyon olarak adlandırılabilir. Retikulum şiddetli kasılma ile hareketi başlatır ve normal hacminin yarısı kadar küçülerek içerisindeki tüm ürünleri rumene aktararak gevşer. Rumene tüm ürünler aktarıldıktan sonra retikulum ikinci kez daha şiddetli kasılırken aynı zamanda rumenin ön duvarında da bir kasılma gerçekleşir. Dorsal ve ventraldeki iç çıkıntılar sayesinde

kasılmalar yayılarak retikulumdan gelen rumen içeriğinin büyük bir kısmının aktarılmasını sağlar. Rumen içeriği bu kasılıp gevşemeler ile önce retikulumdan kranial keseye ve buradan dorsal keseye geçer. Güçlü kasılmalar devam ederken rumen içeriği tekrar kranial keseye ve retikuluma ya da ventral keseye geçer. Böylece döngü tekrarlanarak içerik ventral, dorsal ve kranial keselerden sonra retikuluma döner. Hayvan dinlenirken gerçekleşen tüm bu olaylar 30-50 dk sürer.

2. Sekonder hareketler: Yalnızca rumende oluşan hareketlerdir. Daha çok geğirme (gaz çıkarma) ile ilgilidir. Midenin sadece bir parçasının katıldığı sekonder hareketler sonucu oluşan ikinci derecedeki kasılmalar arka ventral kesede başlar dalgalar halinde arka dorsal kese, ön dorsal kese ve ön ventral keseye ulaştıktan sonra tekrar arka ventral keseye geri döner, geğirme ile gaz çıkışı gerçekleşir. Bu hareketin gerçekleştiği süre değişkenlik göstermekle birlikte ventral kesedeki kasılmanın gücüne bağlıdır.

Rumende yaklaşık %65 karbondioksit (CO_2), %24 metan (CH_4), %7 nitrojen (N_2), %0.2 hidrojen (H_2) ve %0.01 hidrojen sülfür (H_2S) bulunmaktadır. Oksijen (O_2) ise birçok bakteri türünün çoğalmasını önleyecek düzeyde çok düşük düzeydedir. Rumen sıcaklığı 38-42 °C ve rumen pH'sı 6.2-6.8 arasındadır (Muğlalı, 2013). Bu pH aralığı, tükürük üretimine, kısa zincirli yağ asitlerinin üretilmesi ve emilimine, besin alımının türü ve seviyesi ile ruminal epitelyum yoluyla bikarbonatlar ve fosfatların değişimine bağlı olarak değişkenlik gösterir (Aschenbach et al., 2011; Krause and Oetzel, 2006). Dolayısıyla bu faktörler retikulorumen ortamındaki pH düzeyini ve tamponlama kapasitesini belirler. Rumende üç grup mikroorganizma topluluğu gelişebilmektedir (Wright and Klieve, 2011). Bunlar; bakteriler (10^{10} – 10^{11} /g), protozoalar (10^4 – 10^6 /g), maya ve mantarlardır (10^3 – 10^6 /g). En çok kullandıkları besin maddesi ve ürettikleri son ürünlere göre sınıflandırılan bakteri türlerinden en yaygın olanları selülitik, hemiselülitik, pektinolitik, amilolitik, üreolitik, metanojenik, dekstrinolitik, proteolitik, amonyak üreten ve lipolitik olanlardır (Çizelge 2.1). Rumen bakterileri ya doğrudan besin maddelerini ya da bunların hidrolizi sonucu açığa çıkan parçalanma ürünlerini metabolize ederler (Bölükbaşı, 1989).

Çizelge 2.1. Bazı rumen bakterileri

Selülitik bakteriler	<i>Bacteriodes succinogenes</i> <i>Ruminococcus flavefaciens</i> <i>Ruminococcus albus</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
Hemiselülitik bakteriler	<i>Bacteriodes ruminicola</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Ruminococcus sp.</i>
Pektinolitik bakteriler	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Bacteriodes ruminicola</i> <i>Streptococcus bovis</i> <i>Lachnospira multiparus</i> <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> <i>Treponema bryantii</i>
Amilolitik bakteriler	<i>Bacteriodes amylophilus</i> <i>Streptococcus bovis</i> <i>Succinimonas amyolytica</i> <i>Bacteriodes ruminicola</i>
Üreolitik bakteriler	<i>Succinovibrio dextrinosolvens</i> <i>Seimonas sp.</i> <i>Bacteriodes ruminicola</i> <i>Ruminococcus bromii</i> <i>Butyrivibrio sp.</i> <i>Treponema sp.</i>
Metanojenik bakteriler	<i>Metanobrevibacter ruminantium</i> <i>Metanobacterium formicicum</i> <i>Metanobacterium mobile</i>
Dekstrinolitik bakteriler	<i>Treponema bryantii</i> <i>Lactobacillus vitulinus</i> <i>Lactobacillus ruminus</i>
Proteolitik bakteriler	<i>Bacteriodes amylophilus</i> <i>Bacteriodes ruminicola</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Streptococcus bovis</i>
Amonyak üreten bakteriler	<i>Bacteriodes ruminicola</i> <i>Megasphaera elsdenii</i> <i>Seimonas ruminantium</i>
Lipolitik bakteriler	<i>Anaerovibrio lipolytica</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Treponema bryantii</i> <i>Eubacterium sp.</i> <i>Fusocillus sp.</i> <i>Micrococcus sp.</i>

Protozoa populasyonunun hacim itibariyle büyük çoğunluğunu siliyat protozoalar oluşturur. Siliyat protozoaların sayıları bakterilerden çok az olmasına rağmen hacimleri (%48.6 bakteri, %51.4 protozoa) yaklaşık bakteriler kadardır (Jouany and Ushida, 1999). Rumendeki siliyatların fermente ettikleri maddeler ve son ürünleri Çizelge 2.2’de verilmiştir (Görgülü, 2004).

Çizelge 2.2. Rumendeki siliyatların fermente ettikleri maddeler ve son ürünleri

Siliyatlar	Fermente edilen maddeler	Son ürünler
İzotirişler <i>Isotricha intestinalis</i> <i>Isotricha prostoma</i>	Nişasta, sukroz, glikoz, pektin Nişasta, Sukroz, glikoz, pektin	Asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit, laktik asit, H ₂ , lipidler
Dazitirişler <i>Dasytricha ruminantum</i>	Nişasta, maltoz, sellobiyoz, glikoz	Asetik asit, bütirik asit, laktik asit, H ₂ , CO ₂
Entodeniümler <i>Entodonium bursa</i> <i>Entodonium caudatum</i> <i>Entodonium furca bilobum</i> <i>Entodonium simplex</i>	Nişasta, hemiselüloz Nişasta, sellobiyoz, glikoz, maltoz, Sukroz Nişasta	--- Asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit, laktik asit, H ₂ , lipidler, CO ₂ , lipidler
Diplodiniümler <i>Diplodinium polyplastron</i> <i>Diplodinium eudiplodinium</i> <i>Diplodinium diplodinium</i> <i>Diplodinium diploplastron</i> <i>Diplodinium ostracodinium</i> <i>Diplodinium eremoplastron</i>	Selüloz, glikoz, nişasta, sükroz Selüloz, hemiselüloz, nişasta Selüloz, hemiselüloz, nişasta Selüloz, hemiselüloz, nişasta Selüloz, hemiselüloz, nişasta Selüloz, hemiselüloz, nişasta Selüloz, hemiselüloz, nişasta	Asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit, laktik asit, H ₂ , CO ₂ ----- ----- -----
Epidinium ecaudatum caudatum	Selüloz, hemiselüloz, nişasta, sükroz, maltoz	Asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit, laktik asit, H ₂ , format, lipidler
Ophryoscolex caudatus	Selüloz, hemiselüloz, nişasta	Asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit, laktik asit, H ₂

Dazitirişler nişastayı kullanamazlar ama maltoz dahil olmak üzere birçok şekeri kullanabilirler. İzotirişler ise maltozu kullanamazken birçok şekeri ve nişastayı kullanabilirler. Rasyonda çözünebilir şeker oranı yüksek ise izotirişlerin rumendeki sayısı artar. Çünkü izotirişler çözünebilir karbonhidratları kullanma eğilimindedirler. Protozoalar karbonhidratları fermente ederek asetik, bütirik ve laktik asit, CO₂ ve H₂ üretirler. Proteolitik özelliğe sahip olan protozoalar gelişimleri için bakterilere muhtaçtır. Bakterileri aminoasit kaynağı ve nükleik asit ön maddesi olarak kullanırlar. Protozoalar aynı zamanda lipid bileşenlerinin sindiriminde de önemlidirler (Bird, 1991). Mikrobiyal sentezde azalma ve rumen içeriğindeki yemlerin protein parçalanabilirliğindeki artış yemden yararlanma ile ilişkilidir. Rasyonun kalitesi ve yemleme sıklığı ile rumen protozoa tipleri ve sayıları arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır (Bölükbaşı, 1989).

Bakterilere oranla sayıları az olan maya ve mantarlar aerobik organizmalardır. Rumendeki O₂'i tüketip CO₂'i üreterek anaerobik ortamın

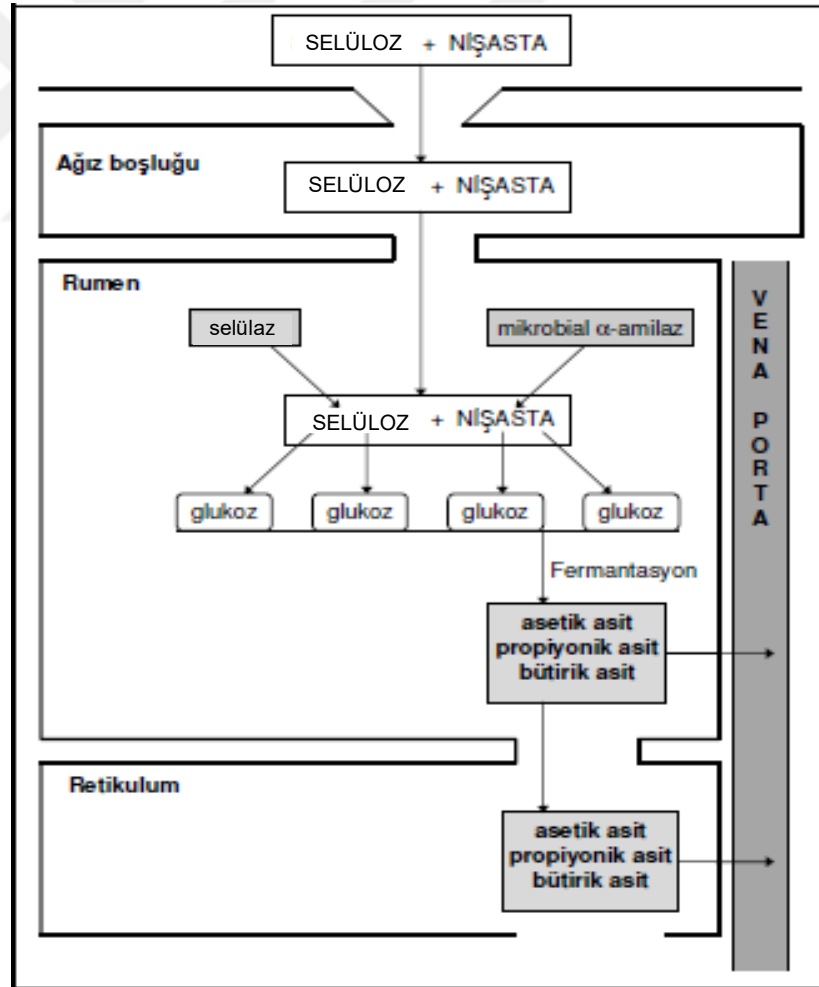
hazırlanmasına yardımcı olurlar. Tanımlanmış maya türleri *Aneoroplasma bactoclasticum* ve *Aneoroplasma abactoclasticum*'dur.

2.2 Ruminal Fermentasyon

Ruminantlarda yemlerin sindirimi, mekanik sindirimle ağızda başlayarak midedeki asit ve ince bağırsakta safranin etkisiyle kimyasal sindirime maruz kalarak mikroorganizmaların enzimatik faaliyetleri sonucu mikrobiyal sindirim ile son bulur. Rumende sindirimi etkileyen faktörlerin başında tüketilen yem gelir. Ruminantlar alınan besinlere uygun bir rumen ortamı oluşturma eğilimindedirler. Diğer faktörler arasında rumen sıvısının pH'sı, mikroorganizmaların tip ve miktarları ile yemin rumende kalış süresi yer almaktadır. Tüketilen yem rumen içeriğini önemli düzeyde etkiler. Nitekim aynı yemlerle beslenen ruminantlarda oluşan rumen sıvıları arasında farklılıklar bulunmaktadır. Proteinler ve suda kolay çözünen karbonhidratlar rumende mikroorganizmalar tarafından bakteriyel yıkıma uğrayan ilk besin maddeleridir. Selüloz yemin alınmasından 6 saat sonra sindirilmeye başlanır ve fermentasyon sonucunda yüksek miktarda CO₂ ve aynı zamanda da CH₄ gazı üretilir. Rumen mikroorganizmaları ile ruminantlar arasında simbiyotik bir ilişki bulunmaktadır. Nitekim yemlerle alınan protein rumendeki mikroorganizmalar tarafından öncelikle peptidlere ve aminoasitlere daha sonra da amonyağa (NH₃) fermente edilir. Fermentasyon sırasında açığa çıkan veya NH₃'tan sentezlenen amino asitler mikroorganizmalar tarafından kendi hücre proteinlerinin sentezinde kullanılır. (Aschenbach et al., 2011). Yemlerin yapısında bulunan lif, nişasta ve protein ise rumen mikroorganizmaları tarafından parçalanarak enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere UYA ve mikrobiyel proteine dönüştürülürler. Hayvanın enerji ihtiyacının yaklaşık %80'ini UYA'lar karşılar. Mikrobiyal protein ruminantlar için önemli bir protein kaynağı olmasına rağmen rumende sentezlenen mikrobiyal protein miktarı her besleme koşulu altında aynı değildir. Rumeni terk eden mikrobiyal protein ince bağırsağa giren proteinin %50-90'ını oluşturur. Ruminal mikrobiyal popülasyonların büyümesini ve aktivitesini etkileyen başlıca faktörler sıcaklık, pH, tamponlama kapasitesi, ozmotik basınç ve redoks potansiyelidir. Bu faktörler çevre koşullarına göre belirlenir (Wahrmund et al., 2012).

2.2.1 Karbonhidrat metabolizması

Ruminant rasyonlarını ağırlıklı olarak bitkisel kaynaklı yemler oluşturur ve bu yemlerin besin madde içeriğinin yaklaşık %75'i karbonhidrattır. Yemlerle alınan karbonhidratlar yapısal karbonhidratlar (selüloz ve hemiselüloz) ve yapısal olmayan karbonhidratlar (nişasta, pektinler, fruktozanlar ve ksilanlar) olmak üzere ikiye ayrılır. Ruminantlarda pankreatik amilaz üretimi düşük olduğundan yemlerle alınan nişasta içerikli besinler herhangi bir yıkıma uğramadan rumene ulaşarak ön midede bulunan mikroorganizmaların salgıladığı enzimlerle (amilaz, selülaz, hemiselülaz, sellobiyaz, maltaz, izomaltodekstrinaz, ksilanaz, ksilobiyaz, β -glukozidaz, pektin esteraz vd.) fermente edilirler. Fermentasyon sonucu UYA (asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit) açığa çıkar. Ruminantlarda karbonhidrat sindirimi Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Ruminantlarda karbonhidrat sindirimi.

Karbonhidratlar rumende mikrobiyal aktivite sonucunda;

Selüloz → glikoza

Hemiselüloz → ksiloza

Pektin → galakturonik aside

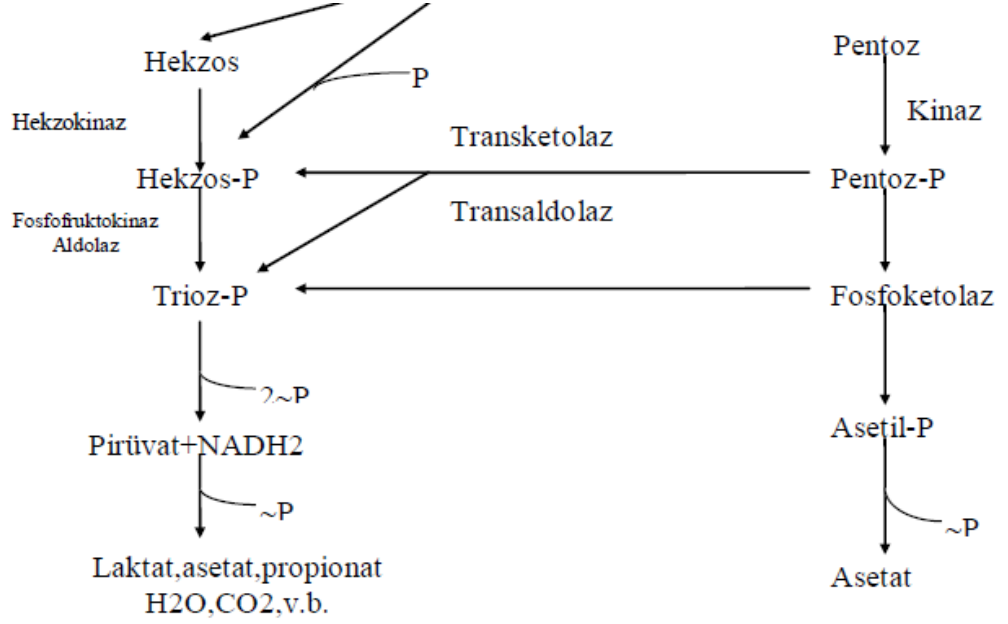
Basit şekerler → pirüvata

Pirüvat → Asetik asit, propiyonik asit veya bütirik asite dönüştürülür.

Karbonhidratların mikrobiyal sindiriminin başlıca son ürünlerini asetik asit (%65), propiyonik asit (%20) ve bütirik asit (%10) oluşturur. Ayrıca düşük miktarda laktik asit, formik asit, izobütirik asit, valerik asit elde edilir. Rumende oluşan UYA'nın %78'i rumen ve retikulumdan, %19'u omasumdan, %5'lik kısmı ise ince bağırsaktan emilir. Emilim rumen duvarından pasif difüzyonla olduğu gibi kalın ve körbağırsaklarda da gerçekleşmektedir. Emilen UYA portal ven aracılığı ile karaciğere getirilir. Propiyonik ve bütirik asitin önemli kısmı karaciğerde kalır ve kandaki UYA'nın yaklaşık %90'ını asetik asit oluşturur. Glikoneogenez yoluyla propiyonik asit glikoza ve glikojene; asetik ve bütirik asit ise Asetil CoA'ya dönüştürülür. Bu iki uçucu yağ asidi bundan sonra ya krebs siklusuna girer ya da yağ asidi sentezi için kullanılır.

Karbonhidrat metabolizmasının kaynağı olan glikoz hücreye aktif transport ile girer ve bunun için gerekli enerji ATP'nin parçalanmasından sağlanır. Mikroorganizmaların yaşam ve gelişim için kullandıkları ATP'nin esas kaynağı karbonhidratların fermentasyonu sonucu UYA'dır. Rumende hekzosların anaerobik fermentasyonunda ana yol Embden-Meyerhof yoludur. Burada basit şekerler pirüvata parçalanır ve glikozdaki enerji hücrelerde kullanılabilecek enerjiye dönüşür. Hekzos ve pentozların yıkımı Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

Monosakkaritler

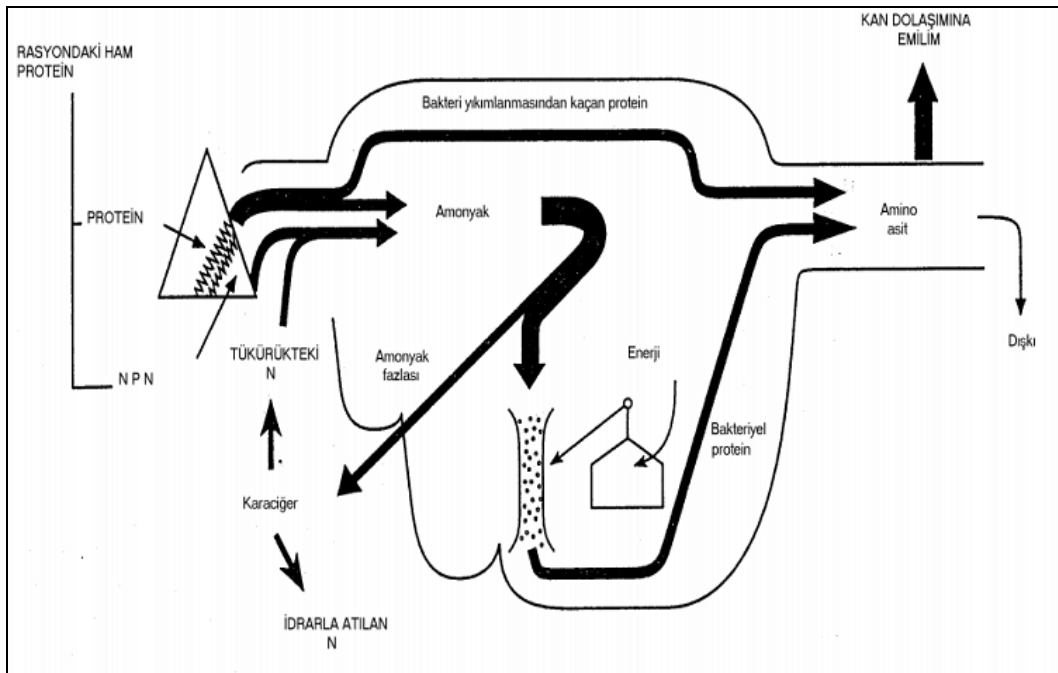


Şekil 2.2. Hekzos ve pentozların yıkımı.

2.2.2 Protein metabolizması

Ruminant rasyonlarında azot kaynakları olarak protein tabiatında ve protein tabiatında olmayan (NPN) azotlu maddeler bulunur. Tükürük ve plazmadan rumen duvarı aracılığıyla rumene difüzyonla ulaşan endojen üre azotu rumen mikrorganizmaları tarafından salgılanan parçalayıcı ve sentezleyici enzim sistemleri sayesinde yeniden kullanılır.

Rumende gerçek protein ve NPN'lerin sindirimi proteinazlarla başlatılır. Salgılanan endo ve ekzo peptidazlar ile proteinler polipeptit, peptit ve aminoasitlere kadar parçalanır. Oluşan aminoasit ve peptitlerin bir kısmı daha ileri fermentasyona uğrayarak NH_3 , UYA ve CO_2 'e dönüşür. Hem gerçek protein ve NPN'lerin ruminantların ön midesinde parçalanması sonucu oluşan NH_3 'ın bir kısmı mikroorganizmaların büyüme ve çoğalmasında kullanılır. Rumende parçalanmayan protein (yem ve mikrobiyal protein) abomasum ve ince bağırsağa taşınır ve aminoasitlere parçalanarak ince bağırsaktan emilir. Ruminantlarda protein metabolizması Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Ruminantlarda protein metabolizması.

Proteinlerin parçalanma hızı rumendeki mikrobiyal protein sentezinden daha hızlı olursa rumen sıvısındaki NH_3 miktarı artarak optimum konsantrasyona ulaşır. Amonyanın bir kısmı mikrobiyal protein sentezinde kullanılırken bir kısmı da rumen duvarından emilerek karaciğere taşınır ve burada üreye çevirilir. Karaciğerde oluşan ürenin bir kısmı idrarla dışarı atılırken bir kısmı salya ve rumen duvarından tekrar rumene geri döner. Rumene geri dönen üre mikroorganizmalar için iyi bir nitrojen kaynağıdır. Bu olaya ‘Rumino Hepatik Azot Dolaşımı’ denir. Dolaşımdaki NH_3 ’ın bir kısmı ise esansiyel olmayan amino asitlerin sentezinde kullanılır.

2.2.3 Yağ metabolizması

Ruminantların rasyonlarında bulunan yağların büyük bir kısmı doymamış yağ asitleri bakımından zengindir. Mono ve di galaktogliseridleri kaba yemler içerirken trigliseridleri kesif yemler içerir. Yağ metabolizmasında lipoliz, biyohidrojenasyon ve mikrobiyal lipit sentezi olmak üzere üç ana biyokimyasal olay gerçekleşir. Rasyondaki trigliseridler rumende lipaz enzimi ile galaktolipidler, fosfolipidler, monogliseridler, gliserol ve yağ asitlerine hidrolize olurlar ve sadece küçük parçacıklar doğrudan ince bağırsağa geçerler. Hidroliz

sonucunda galaktoz ve gliserol UYA'ya dönüşür. Biyohidrojenasyonda ilk aşama izomerasyondur. Bu aşamada doymamış yağ asitlerindeki cis-12 bağı trans-11 isomerine dönüştürülür. Normal şartlarda hidrojenasyon işlemi sonunda yaklaşık %80 düzeyinde stearik asit ve %12 düzeyinde trans oleik asit oluşur. Rumende bakteriyel kuru maddenin yaklaşık %10-15'ini oluşturan lipitler endojen veya yemdeki uzun zincirli yağ asitleri gibi eksojen kaynaklı olabilir. Anaerobik yolla sentezlenen yağ asitlerinin %15-20'sini tekli doymamış yağ asitleri oluşturur. Selüloz fermentasyonu sonucu elde edilen UYA'lar emildikten sonra karaciğere ulaşırlar. Propiyonik asit daha çok karbonhidrat metabolizmasında kullanılırken asetik asit ve bütirik asit yağ asitlerinin sentezinde kullanılır.

Yemlerle alınan enerji ve proteinin daha iyi değerlendirilmesi için rumen şartlarının optimum manipülasyonu gereklidir. Bu amaçla hayvan besleme alanında probiyotikler, prebiyotikler, enzimler, fitokimyasallar, mayalar gibi çeşitli yem katkı maddelerinden yararlanılmıştır (Sarıpınar ve Sulu, 2005; Tricarico et al., 2008; Nocek et al., 2011). Fitokimyasalların ruminantlarda kullanılabilirliği üzerine çalışmalar (Kantautaitė et al., 2006; Valero et al., 2014; Çayıroğlu, 2015; Valenzuela-Grijalva et al., 2017) her geçen gün daha da önem kazanmaktadır.

2.3 Fitokimyasallar

Fitokimyasallar, bitkilerde doğal olarak bulunan kimyasal yapı ve biyoaktivite açısından büyük çeşitliliğe sahip bileşikler grubudur. Biyolojik aktif maddeler olan fitokimyasallar bitkilerin doğal savunma mekanizmaları olarak üretilirler ve çevresel strese adapte olup bitkilerin kendilerine has renk, koku ve tatların oluşmasında etkilidirler. Bitkiler binlerce fitokimyasal madde içermekle birlikte insan sağlığı açısından da bu bileşikler önemli role sahiptir. Tıp alanında yapılan çalışmalarda fitokimyasalların antioksidan özelliği sayesinde oksidasif hasara maruz kalmış hücrelerin büyümesini engelledikleri, enzimsel aktivitelerini kontrol ettikleri, kan lipid düzeyini dengeledikleri, DNA hasarını önlediği, kanseri önlemede etkili olduğu bildirilmiştir (Dündar, 2001). Söz konusu ürünler antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri, sindirim uyarıcı ve buna bağlı iştah açıcı özellikleri sayesinde hayvan besleme alanında da büyük önem taşımaktadır (Ünal ve Kocabağlı, 2014). Son yıllarda, rumen fermentasyonunu modifiye etme

potansiyelleri üzerinde durulan fitokimyasallar (bitki sekonder metabolitleri), antibiyotiklerin alternatifi olarak değerlendirilmektedir. En yaygın bilinen fitokimyasallar arasında fenolik asitler, tokoferoller, karotenoidler, alkaloidler, flavonoidler ve tanenlerin de içinde bulunduğu fenolik bileşikler, saponinler ve uçucu yağlar (Liu et al., 2004; Patra and Saxena, 2009) yer alır.

Fenolik bileşikler flavonoidler (flavonoller, flavonlar, flavanonlar, antosiyanidinler ve izoflavonoidler), fenolik asitler, stilbenler gibi alt gruplardan oluşurlar (Çizelge 2.3). Fenolik bileşikler arasında en yaygın bulunan grup fenolik asitler olup kumarinler, lignanlar, kinonlar ve stilbenler ise daha az yaygın olanlarıdır.

Çizelge 2.3. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

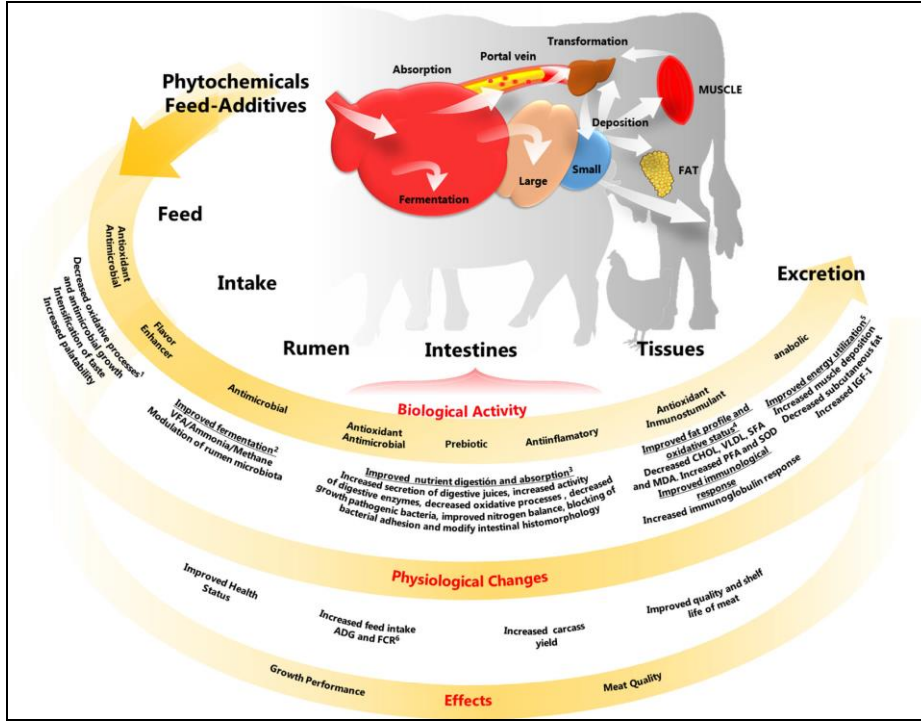
Karbon Atomu Sayısı	Temel İskelet	Sınıf	Bileşik
6	C6	Basit fenoller	Benzokinon, kateşol, hidrokinnon, 2,6-dimetoksi benzokinon
7	C6-C1	Fenolik asitler	p-hidroksi benzoik asit, salisilik asit
8	C6-C2	Asetofenonlar, fenilasetik asitler	3-asetil-6-metoksi benzaldehit, p-hidroksi fenilasetik asit
9	C6-C3	Hidroksisinnamik asitler, fenil propenler, kumarinler, izokumarinler, kromonlar	Kafeik asit, ferulik asit, mirisetin, eugenol, umbelliferon, askuletin, bergenin, eugenin.
10	C6-C4	Naftakinonlar	Juglon, plumbagin
13	C6-C1-C6	Ksantonlar	Mangiferin
14	C6-C2-C6	Stilbenler, antrakinnonlar	Lunularik asit, emodin
15	C6-C3-C6	Flavonoidler, izoflavonoidler, antosiyaninler, flavanonlar	Kersetin, siyanidin, genistein
18	(C6-C3) ₂	Lignanlar, neolignanlar	Pinoresinol, eusiderin
30	(C6-C3-C6) ₂	Biflavonoidler	Amentoflavon

Fenolik asitler hidroksisinnamik asitler (ferulik asit, kafeik asit, kumarik asit, klorojenik asit ve sinapik asit vb.) ve hidroksibenzoik asitler (gallik asit, p-hidroksibenzoik asit, protokateşik asit, vanilik asit vb.) olarak sınıflandırılırlar. Bazı fenolik asitlerin kimyasal yapısı Çizelge 2.4’de verilmiştir. Hidroksisinnamik asitler C6-C3 fenilpropan yapısında olup hidroksibenzoik asitler C6-C1 fenilmetan yapısındadırlar (Kaçar, 2008).

Çizelge 2.4. Bazı fenolik asitlerin kimyasal yapısı

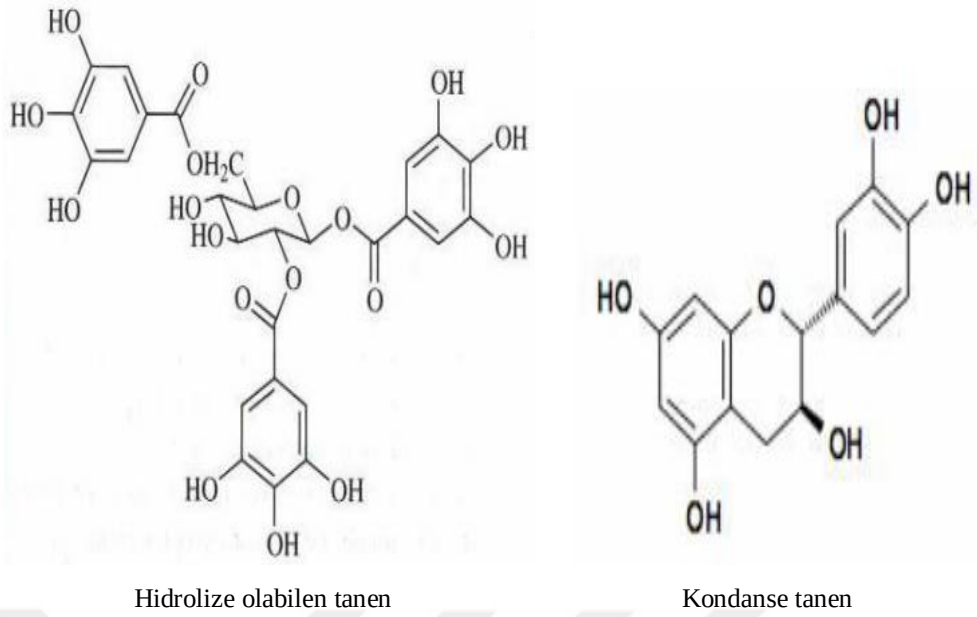
Fenolik madde	Kimyasal yapı
Ferulik asit	
Kafeik asit	
p-kumarik asit	
Klorojenik asit	
Sinapik asit	
Gallik asit	
p-hidroksibenzoik asit	
Protokateşik asit	
Vanilik asit	

Ruminal fermentasyonu değiştirme ve hayvan verimliliğini artırma potansiyeline sahip olan fitokimyasalların etkileri; UYA düzeyini arttırırken NH_3 ve CH_4 üretimini azaltması ve böylece besin madde sindirilebilirliğini artırması, hayvan sağlığını iyileştirmesi, karkas randımanını artırması, et kalitesini iyileştirmesi ve etin raf ömrünü  zatması şeklinde (şekil 2.4, Valenzuela-Grijalva et al., 2017). Bitki sekonder metabolitlerin rumen fermentasyonu ve yem sindirilebilirliği üzerindeki etkileri; doza, antimikrobiyal spektruma ve aktif metabolitlerinin miktarına göre farklılık gösterir (Demirtaş vd., 2018).



şekil 2.4. Ruminantlarda fitokimyasalların etki mekanizmaları.

Bitki sekonder metabolitlerinden tanenler doğada her yerde (ağaçlarda, çalılıklarda, otsu baklagillerde vb.) ve ruminantlar tarafından t ketlenen yemlerde değişken konsantrasyonlarda bulunurlar. Tanenler hidrolize olabilen tanenler ve kondanse tanenler (proantosiyanidinler) olmak üzere ikiye ayrılırlar (Frutos et al., 2002). Kondanse tanenler (KT), bazı bitki türlerinde bulunan bitki sekonder metabolitleridir. Bu bitki  r nleri, C-C bağlılarıyla bağlanmış flavan-3-ol (kateşin) veya flavan-3,4-diol (proantosiyanidin) birimlerinin polimerleridir. Hidrolize olabilen ve kondanse tanenin kimyasal yapısı şekil 2.5’de verilmiştir.

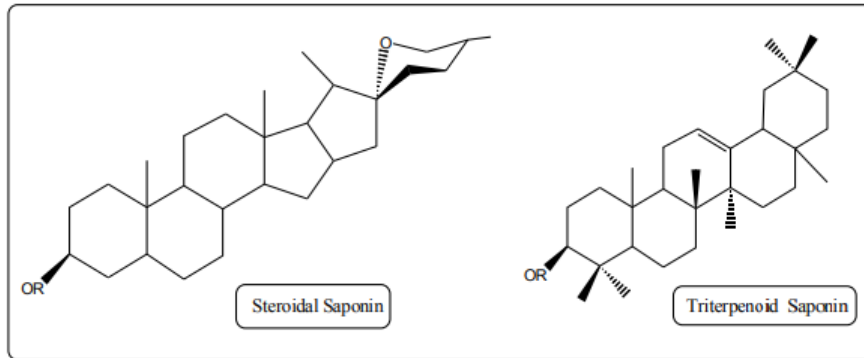


Şekil 2.5. Hidrolize olabilen tanen ve kondanse tanenin kimyasal yapısı.

Kondanse tanenler, proteinler ve polisakaritler (nişasta, selüloz, hemiselüloz gibi), nükleik asitler, aminoasitler ve sindirim enzimleriyle kompleksler oluştururlar (Kumar and Vaithiyanathan, 1990; Leinmuller et al., 1991). Ruminatlarda tanenlerin etkileri tüketilen miktara, türlerine ve kimyasal yapılarına, tüketen hayvanın türüne ve fizyolojik durumuna bağlı olarak değişir (Waghorn, 2008). Düşük ve orta konsantrasyonlarda KT, rumende protein parçalanabilirliğini düşürüp emilim için ince bağırsağa ulaşan protein miktarını artırarak verimi olumlu yönde etkiler (Wang et al., 1996). Ancak, yüksek konsantrasyonda KT, yem tüketiminde isteksizlik yaratır, proteinin ve diğer besin maddelerinin sindirilme derecesini düşürür, mikrobiyal aktiviteyi ve endojen sindirim enzim aktivitelerini inhibe ederek performansı olumsuz yönde etkiler (Waghorn, 2008). Tanenler metiyonin ve sistin gibi amino asitlerin emilimini de azaltmaktadır. Bu olumsuz etkilerin başlıca nedeni tanenlerin proteinleri bağlayarak kullanılabilirliğini azaltmaları, polisakkarid, nükleik asit ve mineral gibi birçok molekülle metabolizmadaki etkileşimidir. Ayrıca tanenlerin tükürükte bulunan glukoproteinle bileşik oluşturmamasından dolayı ruminant hayvanlarda tanen içeren yemlerin tüketilmesiyle yemin lezzetinin ve tüketiminin azaldığı bildirilmektedir (Kamalak vd., 2005). Olumsuz etkilerinin yanı sıra süt verimini iyileştirmek, şişmeyi önlemek ve özellikle parazit yükünü azaltmak gibi sağlık üzerindeki olumlu etkileri de bildirilmiştir (Min et al., 2003; Crozier et al., 2009).

Ruminantların türe bağlı olarak KT'ye karşı duyarlılıkları farklılık göstermektedir. Silanikove et al. (1996) tarafından keçilerin koyunlara göre daha duyarlı olduğu, keçilerin aynı koşullar altında daha fazla tanen bakımından zengin ağaç yaprağı tükettikleri bildirilmiştir. Nitekim Prichard et al., (1988) tarafından koyunlarda %11 oranında akasya yaprakları ile beslemenin yem tüketimini %40-50 oranında düşürdüğü bildirilmiştir.

Fitokimyasallar grubunda yer alan saponinler birçok bitkide bulunabilen doğal bileşikler olup hem suda hem de yağda çözünür bileşenler içerdikleri için deterjan veya yüzey aktif madde özelliklerine sahiptir. Steroid veya triterpenoid yapıda lipofilik bir çekirdek ile bir veya daha fazla sayıda karbonhidrat yan zincirine sahip glikozid olan saponinler (Şekil 2.6) bitkilerde kök, yumru, ağaç kabuğu, yaprak, tohum ve meyve gibi farklı kısımlarda bulunurlar (Wina et al., 2005).



Şekil 2.6. Steroidal ve triterpenoid saponinlerin kimyasal yapısı.

Saponin içeriği yüksek olan *Yucca schidigera* (%4.4 steroidal saponin) ve *Quillaja saponaria* (%10 triterpenoid saponin) gibi bitkilerin bu amaçla ticari kullanım alanı söz konusudur (Guo et al., 2000; Cheeke, 2001). Yapılan çalışmalarla saponinlerin; eritrositler, mantarlar ve protozoalar dahil ökaryotik hücrelerin spesifik membran bozulmalarını sağlayarak ruminal fermentasyonu düzenleme ve besin madde sindirilebilirliğini artırmada etkili olduğu ortaya konmuştur (Görgülü vd., 2004; Patra and Saxena, 2010). *In vitro* (Lila et al., 2003; Hu et al., 2005) ve *in vivo* (Hussain and Cheeke, 1995; Yuan et al., 2007)

Çalışmalarda saponinlerin rumen pH'sını ve NH₃-N düzeyini düşürdüğü bildirilmiştir.

Rumende bulunan protozoalar çözünebilir karbonhidratları kullanarak hızlı ruminal azot kaybına neden olurlar ve fazla amonyak idrarla atılır. Saponinlerin veya saponin içeren bitkilerin antiprotozoal etkisi Wina et al. (2005) tarafından yapılan *in vitro* bir çalışma ile ortaya konmuş ve bu etki saponinlerin protozoaların hücre membranlarındaki kolesterol ile kompleks oluşturarak protozoayı öldürme veya hasar vermesi şeklinde açıklanmıştır. Yapılan *in vitro* çalışmalarda saponinin protozoaları inhibe ettiği ancak *in vivo* çalışmalarda birkaç gün beslemeden sonra bu etkinin görülmediği bildirilmiş ve bunun nedeni de saponinlerin antiprotozoal aktivitesinin geçici olmasına ve/veya rumendeki mikrobiyal popülasyonun saponine adaptasyonu şeklinde açıklanmıştır (Wang et al., 1998; Wallace et al., 2002; Ivan et al., 2004). Bununla birlikte, saponinlerin ruminantlarda yem tüketimini düşürdüğü (Wu et al., 1994; Lovett et al., 2006) veya arttırdığı (Abreu et al., 2004; Holtshausen et al., 2009) veya herhangi bir etkiye neden olmadığı (Hess et al., 2004; Singer et al., 2008) gibi bildirişlerde bulunmaktadır.

Fitokimyasallar kapsamında yer alan uçucu yağlar (esansiyel yağlar), tıbbi ve aromatik bitkilerden genellikle su buharı destilasyonu veya farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen oda sıcaklığında genellikle sıvı formda ve kolayca kristalleşebilme özelliğine sahip, çoğunlukla renksiz veya açık sarı renkli yağmsı karışımlardır. Uçucu yağların kimyasal kompozisyonları, yapıları ve biyolojik özelliklerine göre değişiklik göstermekle birlikte uygun dozlarda kullanıldığında insan ve hayvanlar üzerine olumsuz etkisinin bulunmadığı ileri sürülmektedir (Bilal vd., 2008; Frankić et al., 2009). Uçucu yağlar, terpenoidler (monoterpenoidler ve sesquiterpenoidler) ve fenilpropanoidler olmak üzere 2 grupta ele alınırlar ve terpenoidler bitki aktif bileşenlerinin en geniş grubunu oluşturur (Patra and Saxena, 2010). Uçucu yağlar yapısındaki hidroksil grup içeren fenolik bileşikler ile güçlü antimikrobiyal (Benchaa et al., 2008; Basmacıoğlu-Malayoğlu vd., 2011a) ve antioksidan aktiviteye (Basmacıoğlu-Malayoğlu vd., 2011b) sahiptir. Bu özellikleri ile hayvanların sindirim sistemlerindeki patojen mikroorganizmaları baskılayarak sindirim ve emilimi

artıran yararlı mikroorganizma sayısında artış sağlarlar (Turan vd., 2012). Ayrıca uçucu yağlar hidrofobik ve lipofilik yapıları sayesinde iyonofor grubu antibiyotiklere benzer etki mekanizmaları ile gram pozitif bakterilerin hücre duvarlarına kolaylıkla girip hücre zarında yapısal değişikliklere neden olarak membranın içi ile dışı arasındaki iyon dengesini bozarlar (Griffin et al., 2004).

Ruminant yemlerine ilave edilen uçucu yağların *in vivo* koşullarda yemlerin kuru madde (KM), organik madde (OM), ham protein (HP), ham selüloz (HS), asit deterjan lifi (ADF), nötral deterjan lifi (NDF) ve nişasta sindirilebilirliği üzerine etkisi olmadığı bildirilmiştir (Santos et al., 2010; Tager and Krause, 2011). Yapılan çalışmalar incelendiğinde; uçucu yağların kullanılan doza bağlı olarak sindirilebilirliği ya etkilemediği (Sallam et al., 2009; Wang et al., 2009) ya da düşürdüğü (Busquet et al., 2005; Patra et al., 2006; Agarwal et al., 2009) görülmektedir. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda TUYA düzeyi ve asetik asit propiyonik asit oranı (AA/PA) kullanılan uçucu yağın türüne ve doza bağlı olarak farklılık göstermiştir [(Busquet et al., 2005 (*in vitro*, 1.4 mg/L sinnamaldehit); Chaves et al., 2008 (*in vivo*, 2g/kg karvakrol ve sinnamaldehit); Kamel et al., 2008 (*in vitro*, 0.5, 5 ve 10 mg/L allisin); Tatsuoka et al., 2008 (*in vitro*, 10 mg/ml uçucu yağ karışımı); Kumar et al., 2009 (*in vitro*, 0.33, 0.66, 1.0, 1.33 ve 1.66 µl/ml okaliptüs uçucu yağı)]. Aynı şekilde uçucu yağların rumen pH'sı, rumen sıvısı NH₃-N düzeyi ve protozoa sayısı üzerine etkilerinin kullanılan bitki türü ve doza bağlı olarak değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir. Nitekim Mohamadi et al. (2017), koyun rasyonlarına 110 mg/gün nane uçucu yağı ilavesinin rumen pH'sını, NH₃-N düzeyini, protozoa sayısını ve biyokimyasal kan parametrelerini (glikoz, total protein ve trigliserid) etkilemediğini; Spanghero et al. (2008), uçucu yağ karışımının (oregano, sinnamon, timol, portakal kabuğu) düşük rumen pH değerlerinde asetik asit düzeyini ve buna bağlı olarak AA/PA düşürdüğünü bildirmişlerdir. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda uçucu yağların olumlu etkilerinin mikrobiyal popülasyondaki değişimler veya bireysel mikrobiyal türlerin uçucu yağlara adaptasyonu nedeniyle zamanla azaldığı saptanmıştır (Benchaar et al., 2008; Patra and Saxena, 2009). Benzer şekilde Cardozo et al., (2004), uçucu yağların ruminal mikrobiyal fermentasyon üzerine kısa süreli etkiye sahip olduklarını ve rumen mikroorganizmalarının 6. günden sonra kullanılan uçucu yağlara adapte olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Bitki ekstraktları ve bitki sekonder metabolitlerinin uygulanan dozlarının rumen fermentasyonu ve besin madde sindirilebilirliği üzerine etkisi önemlidir. Fitokimyasalların ruminal fermentasyon üzerine etkilerinin araştırıldığı *in vitro* çalışmalarda uygulanan dozların genellikle 5-500 mg/L veya 5-500 mg/gün arasında olduğu görülmektedir (Evans and Martin, 2000; Broudiscou et al., 2000; Castillejos et al., 2006; Castillejos et al., 2008; Chaves et al., 2008). Nitekim Castillejos et al. (2007) *in vitro* çalışmalarında 5 mg/L, 50 mg/L ve 500 mg/L ticari uçucu yağ karışımının (Blend of essential oils, Crina®) NH₃-N düzeyini değiştirmediğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar ticari uçucu yağ karışımını düşük dozda da (1.5 mg/L) denemişler ve *in vitro* toplam UYA düzeyini artırırken NH₃-N düzeyini değiştirmediğini saptamışlardır (Castillejos et al., 2005). Yapılan başka bir *in vitro* çalışmada kaba:kesif yem (51:49) karışımına tarçın (400 mg/L), karanfil (200 mg/L), portakal (200 mg/L), kekik (200 mg/L) uçucu yağları ile karvakrol (400 mg/L), sinnamaldehit (400 mg/L), öjenol (800 mg/L) ve timol (400 mg/L) ilavesinin NH₃-N düzeyini değiştirmedeği saptanarak benzer bir sonuç elde edilmiştir (Benchaar et al., 2007).

Hayvansal gıda üretimindeki artışa bağlı olarak ruminant hayvanlar tarafından üretilen enterik CH₄ üretimi önemli miktarda artmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermektedir ki küresel ısınma ve iklim değişikliği üzerinde etkili olan en önemli faktörlerden biri CH₄ üretimidir. Ruminant hayvanlardan kaynaklanan CH₄ emisyonları ise toplam küresel sera gazı emisyonlarında önemli paya sahiptir. Hayvan sayılarında öngörülen artışla doğru orantılı olarak CH₄ emisyonunun artması durumunda, hayvansal üretimden kaynaklanan küresel CH₄ emisyonunun 2030 yılına kadar %60 oranında artması beklenmektedir. Türkiye tarımı içerisinde hayvancılık kaynaklı CH₄ salınımı ise yaklaşık %48 ve gübre yönetimi kaynaklı CH₄ salımı ise %11.2'dir (TÜİK, 2018). Yapılan çalışmalarda fitokimyasalların toplam rumen metanojenik kapasitesini değiştirmeden metanojenik arkeaların çeşitliliğinin dağılımına etki ederek bazılarının protozoaların, bazılarının ise metanojenlerin miktarını ya da her ikisinin miktarını azalttığı bildirilmiştir (Broudiscou et al., 2000; Busquet et al., 2006; Castillejos et al., 2006; Bodas et al., 2012). Ruminantlarda fitokimyasalların CH₄ üretimine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Broudiscou et al., 2000) yüksek oranda flavonoid içeren 13 bitki ekstraktından *Lavandula officinalis* ile *Solidago*

virgaurea ekstraktlarının rumen fermentasyonunu arttırırken *Equisetum arvense* ve *Salvia officinalis*'in CH₄ üretimini inhibe edici özelliği olduğu bildirilmiştir. Ruminantlarda *in vitro* CH₄ üretimine trans sinamik, kafeik, p-kumarik asit ve kateşin hidrat gibi fitokimyasalların etkisi araştırılmış ve çalışma sonucunda kafeik ve p-kumarik asitlerin rumen fermentasyon parametrelerini olumsuz etkilemeksizin anti-protozoal aktiviteleri ile CH₄ üretimini azalttığı sonucuna varılmıştır (Giuburuncă et al., 2014). Fitokimyasalların bu olumlu etkilerinin yanısıra rumen parametreleri üzerine olumsuz etkileri de bulunmaktadır. Nitekim 3000 mg/L ve 5000 mg/L düzeyinde karvakrol, karvon, öjenol, timol ve vanilinin NH₃-N ve TUYA düzeyini azalttığı bildirilmiştir (Busquet et al., 2006; Castillejos et al., 2006).

Ruminantlarda fitokimyasalların rumen fermentasyonu, sindirilebilirlik ve kan parametreleri üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar Çizelge 2.5'de verilmiştir.

Çizelge 2.5. Ruminantlarda fitokimyasalların rumen fermentasyonu, sindirilebilirlik ve kan parametreleri üzerine etkileri

Fitokimyasal	Doz	Tür	Etkileri	Referans
Kondanse tanen (<i>Ficus benghalensis</i> , <i>Artocarpus heterophyllus</i> ve <i>Azadirachta indica</i> yaprakları)	%4	Koyun	TUYA, asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit ile rumen sıvısı NH ₃ -N düzeyi üzerine rasyona ilave edilen tanen içeren tropik ağaç yapraklarının etkisi önemli değildir. Protozoa sayısı ve enterik CH ₄ emisyonu muamele gruplarında önemli düzeyde düşmüştür.	Malik et al., 2017
<i>Yucca schidigera</i>	500 mg/kg/g ve 1500 mg/kg/g (her üç günde bir)	Erkek toklu	Rumen pH'sı ve protozoa sayısının etkilenmediği, rumen sıvısı NH ₃ -N düzeyinin azaldığı ve kan MDA düzeyinin düştüğü bildirilmiştir.	Eryavuz vd., 2015
Saponin	100 ve 200 mg/kg KM	Koyun	Besin madde sindirilebilirliği, rumen sıvısı NH ₃ -N düzeyi ve pH'sı ile serum glikoz, trigliserit ve BUN düzeyleri her iki doz saponin ilavesiyle etkilenmemiştir.	Aazami et al., 2013
Çay tohumu saponin ekstraktı Çay tohumu	%0.4 %2.6	Keçi	Beslemeden 21 gün sonra her iki muamele grubunda HY sindirilme derecesinin önemli düzeyde düştüğü, KM, HP, NDF ve ADF sindirilme derecesinin etkilenmediği, serum kolesterol düzeyinin çay tohumu saponin ekstraktı ilavesiyle düştüğü ortaya konmuştur.	Kumar et al., 2017
Ropadiar (Oregano ekstraktı) Saponin (<i>Yucca schidigera</i> ekstraktı)	250 mg/gün 170 mg/gün	Koyun	Yem tüketimi, besin madde sindirilebilirliği ve rumen pH'sının muameleden etkilenmediği, rumen sıvısı NH ₃ -N düzeyinin her iki ekstrakt ilavesiyle düştüğü, UYA düzeyinin arttığı bildirilmiştir.	Wang et al., 2009
Kekik uçucu yağı	1 ve 2 mL/kuzu/gün	Kuzu	Farklı dozlarda kekik uçucu yağı kullanımının canlı ağırlık artışı, günlük canlı ağırlık artışı, günlük yem tüketimi ve yemden yararlanma oranını etkilemediği, MDA, GSH, CAT, seruloplazmin, albümin, total protein ve globulin düzeyleri üzerinde muamelenin etkisinin olmadığı, SOD ve GPx düzeylerinin ise arttığı bildirilmiştir.	Durna-Aydın vd. 2020

Çizelge 2.5. Ruminantlarda fitokimyasalların rumen fermentasyonu, sindirilebilirlik ve kan parametreleri üzerine etkileri (devam)

Fitokimyasal	Doz	Tür	Etkileri	Referans
Nane uçucu yağı	110 mg/gün	Koyun	Nane uçucu yağının besi performansı, bazı kan parametreleri (glikoz, total protein ve trigliserit), rumen sıvısı $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyi, pH'sı ve protoza sayısı üzerine etkisinin olmadığı bildirilmiştir.	Mohamadi et al., 2017
Kekik uçucu yağı	250 ve 500 ppm	Kuzu	Denemenin 28. gününde yemlemeden önce ve yemlemeden 3 ve 6 saat sonra alınan rumen sıvılarında asetik asit, propiyonik asit ile rumen sıvısı pH ve $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeylerinin muameleden etkilenmediği bildirilmiştir.	Ünal-Baruh ve Kocabağlı, 2017
Timol ve Karvakrol	100 mg/kg 300 mg/kg	Koyun	Timol ve karvakrolun tek ve birlikte ilavesinin besi performansı, asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit düzeyini, protozoa sayısı ve kan parametrelerini (üre ve glikoz) etkilemediği, TUYA, rumen sıvısı pH'sı ve $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeylerini artırdığı bildirilmiştir.	Biricik vd., 2016
Kekik ve Tarçın uçucu yağı	5 g/gün	Buzağı	Kekik ve tarçın uçucu yağ ilavesiyle performans, TUYA, rumen sıvısı pH'sı ve $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyleri kontrol ile benzerlik gösterirken, asetik asit düzeyi düşmüş, propiyonik asit ve bütirik asit düzeyleri artmıştır. Kan parametreleri (glikoz, üre, trigliserit ve kolesterol) muameleden etkilenmemiştir.	Vakili et al., 2013
Eugenol	400, 800, 1600 mg/gün	Sığır	Artan dozlarda ilave edilen eugenolün, propiyonik asit, bütirik asit düzeyini, protozoa sayısı ve kan parametrelerini (trigliserit, üre ve glikoz), rumen sıvısı pH'sı ve $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeylerini etkilemediği, asetik asit düzeyini düşürdüğü belirlenmiştir.	Yang et al., 2010

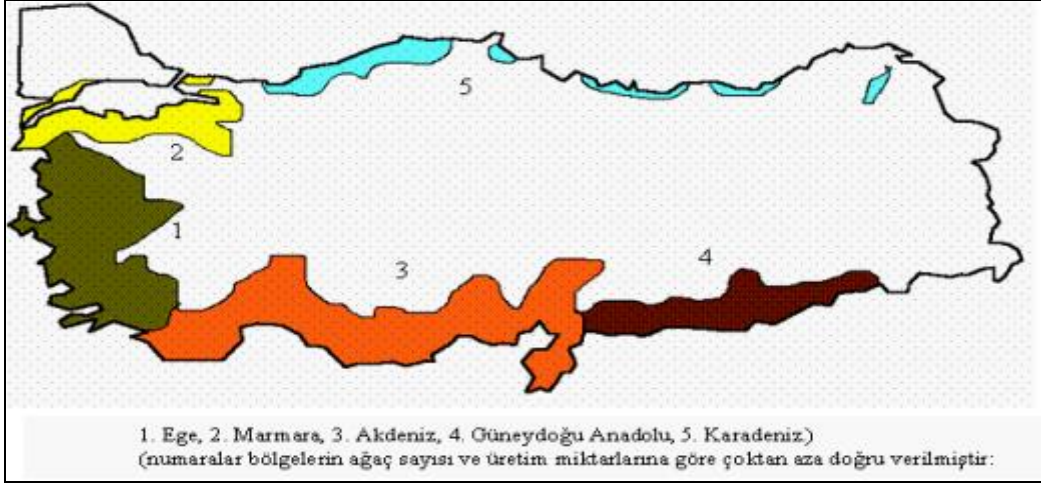
Son yıllarda fitokimyasallar içinde yüksek fenolik bileşik içeriğine sahip olan zeytin yaprağı ve zeytin yaprağı ekstraktının antimikrobiyal ve antioksidan potansiyellerinin farklı alanlarda ortaya konduğu *in vitro* çalışmalar (Ibarra and Sniderman, 2008; Talhaoui et al., 2015; Xie et al., 2015) bulunmaktadır. Ancak hayvan beslemede özellikle kanatlı hayvanlarda bunların farklı amaçlarla kullanımının araştırılmasına yönelik çalışmaların sayısı fazla olmakla birlikte ruminantlarda bu çalışmaların sayısı sınırlı düzeydedir. Dolayısıyla ruminantların beslenmesinde zeytin yaprağı ve zeytin yaprağı ekstraktının farklı amaçlarla kullanımına (performans, besin madde sindirilebilirliği, rumen fermentasyonu ve kan parametreleri) yönelik çalışmaların sayısının artırılması önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında, zeytin ve zeytin işleme yan ürünü zeytin yaprağından elde edilen ekstrakt ile çalışılmıştır. Dolayısıyla zeytin üretimi, zeytin yaprağı ve kimyasal bileşimi ile ZYE ve fenolik madde içeriği alt bölümlerde detaylı olarak verilmiştir.

2.3.1 Zeytin üretimi

Olea cinsinin bir türü olan zeytin (*Olea europaea* L.) Oleacea familyasına aittir. İlk üretim yeri Yukarı Mezopotamya ve Güney Asya'dır (Anonim, 2018). Akdeniz uygarlığının sembolü olan zeytin ağacı dünyada yaklaşık 40 ülkede yetiştirilmekle birlikte dünya zeytin ağacı varlığı %98 düzeyinde Akdeniz'de yer almaktadır. Dünyada toplam 10.6 milyon hektar alanda yaklaşık 900 milyon adet zeytin ağacı bulunmaktadır. Zeytin üretimi 2019 yılı itibariyle dünyada toplam 19.47 milyon tondur. En büyük zeytin üretici ülkeler arasında İspanya (%30.7), İtalya (%12.3), Fas (%9.8), Türkiye (%8.0), Yunanistan (%6.3), Mısır (%5.6), Portekiz (%5.1), Tunus (%4.5), Cezayir (%4.4) ve Suriye'nin (%4.3) yer aldığı bildirilmektedir (FAO, 2019).

Ülkemizde Aydın, İzmir, Manisa, Bursa, Çanakkale, Muğla, Balıkesir, Gaziantep ve Mersin önemli zeytin üretimi yapan illerdir. En yüksek üretim Ege Bölgesinde olmakla birlikte bunu sırasıyla Marmara, Akdeniz, Güneydoğu ve Karadeniz Bölgeleri izlemektedir (Şekil 2.7). Türkiye'de üretilen zeytinin %76'sı yağlık ve %24'ü sofralığa ayrılmaktadır.



Şekil 2.7. Ülkemizde zeytin ağacı sayısı ve üretim miktarlarının bölgelere göre dağılımı.

TÜİK verilerine göre, 2000 li yılların başında zeytin ağacı varlığımız 100 milyon adet iken 2019 yılında 850 bin hektar alanda mevcut 180 bin adettir. Mevcut zeytin ağacının 153.168 adedi meyve veren yaşta (%85), geri kalan 27.717 bin adedi (%15) meyve vermeyen yaştadır ve toplam 1.5 milyon ton zeytin üretilmektedir (TÜİK, 2019).

2.3.2 Zeytin yaprağı ve kimyasal bileşimi

Zeytin toplanması ve zeytinyağı üretim aşamasında çeşitli yan ürünler elde edilir. Bunlardan biri zeytin yaprakları olup zeytinin toplanması ve yağının çıkarılmasından önceki temizleme ve harmanlama işlemleri sırasında açığa çıkar. Zeytinyağı üretimi sırasında ise zeytin karasuyu ve zeytin çekirdeği+posasından oluşan pirina elde edilir. İşlenen zeytinin toplam ağırlığının %20 oranında zeytinyağı, %30 oranında pirina ve %50'si oranında zeytin karasuyu elde edilir (Niaounakis and Halvadakis, 2006). Zeytinlerin toplanması sırasında ağaçların budama tipine ve ağacın yaşına göre her ağaçtan yaklaşık 25 kg zeytin yaprağı elde edilir. Diğer bir bildirişle zeytinin işlenmesi işlenmesi sırasında toplanan harmanlanmış zeytinlerin ağırlıkça yaklaşık %5'ini oluşturur (Delgado-Pertíñez et al., 2000). Zeytin yaprağı ve yapraklı zeytin dalının kimyasal bileşimi Çizelge 2.6'da verilmiştir. Yaprakların ve dalların kimyasal bileşimi birçok faktöre (zeytin

ağacı çeşidi, tarımsal iklim koşulları, hasat zamanı ve son olarak uygulanan farklı işleme) bağlıdır (Alibes and Berge, 1983).

Çizelge 2.6. Zeytin yaprağı ve zeytin yaprağı+dalının kimyasal bileşimi, %

Yan ürün	KM	OM	HP	HK	HY	NDF	ADF	ADL
Yeşil yaprak	50-58	95	11-13	15-18	7	47	28	18
Kuru yaprak (açık havada kurutma)	95	95	7-11	13-23	5	40-45	28-35	18
Yaprak+dal (%8.8 yaprak)	87	92	7.7	19	-	48	34	19
Yaprak+dal (%11.4 yaprak)	93	92	8.7	19	-	-	-	-
Yaprak+dal (%15 yaprak)	74	95	6.7	30	-	56	44	19
Yaprak+dal (%22.6 yaprak)	93	92	7.8	21	-	51	35	18

2.3.3 Zeytin yaprağı ekstraktı ve fenolik madde içeriği

Farklı ürünlerden biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda sokselet (soxhelet) ekstraksiyonu, yüksek hidrostatik basınç, vurgulu elektrik alan, mikrodalga, süperkritik akışkan ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyon sistemleri ve ultrason gibi çeşitli teknikler ile desteklenmiş yöntemler kullanılmaktadır. Zeytin yaprağı ekstraktının (ZYE) elde edilmesinde en yaygın kullanılan yöntem solvent ekstraksiyonudur. Solvent olarak hekzan, metanol/su ve etanol/su karışımı ekstraksiyon çözeltileri farklı oranlarda kullanılmaktadır (Türköz vd., 2008). Zeytin yaprağı ekstraktının aktif bileşikleri zeytin üretiminin yapıldığı toprak ve bölge, hasat dönemi, orijin, kullanılan ekstraksiyon yöntemi ve solvent çeşidine bağlı olarak değişir (Afaneh et al., 2015; Blasi et al., 2016; Nicolì et al., 2019). Son yıllarda ZYE'nin sağlık üzerindeki olumlu etkilerinden (antihipertansif, hipokolesterolemik, kardiyoprotektif vb.) dolayı ticari üretimi yapılarak besinsel destek olarak kullanımı yaygınlaşmıştır (Vogel et al., 2015).

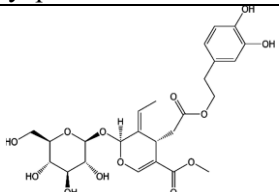
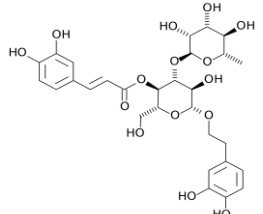
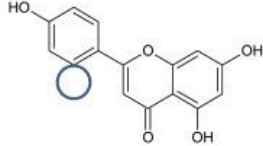
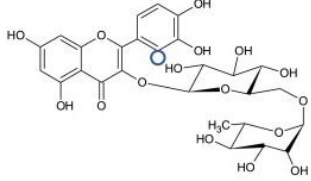
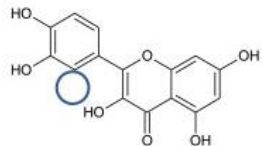
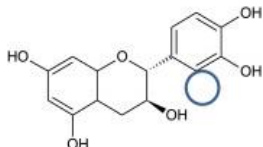
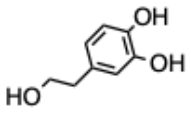
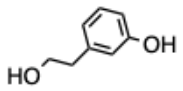
Zeytin yaprağı ekstraktı flavonoidler (flavonlar, flavanonlar, flavonoller ve flavan3-ol), basit fenoller (hiroksitirozol, tirozol, hidroksitirozol, vanilin, vanilik asit ve kafeik asit) ve sekoiridoidler gibi birçok fenolik bileşik içerir (Tripoli et al., 2005). Flavonoidler aglikon formda (quersetin, apigenin, luteolin, diosmetin) veya glikosile formda (quersetin-7-O-rutinoside, luteolin-7-O-rutinoside, luteolin-7-O-

glukozid, luteolin-5-O-glukozid) bulunabilirler (Talhaoui et al., 2015). Zeytin yaprağı ekstraktında bulunan fenolik bileşikler ve miktarları Çizelge 2.7, bu bileşiklerin kimyasal yapıları ise Çizelge 2.8’de verilmiştir.

Çizelge 2.7. Zeytin yaprağı ekstraktında bulunan fenolik bileşikler ve miktarları

Fenolik Bileşikler		Miktar (mg/kg)	Referans
Sekoiridoidler	Oleuropein aglikon	14800	Quirantes-Piné et al., 2013
	Oleuropein glukozid	6600	
	Demetileuropein	2300	
	Oleuropein	6970-441000	
	Verbaskosid	29000	
Flavonoidler	Flavonlar		Herrero et al., 2011 Quirantes-Piné et al., 2013
	Luteolin glukozid	507-10500	
	Apigenin	1-480	
	Diosmetin	1-37	
	Flavanoller		
	Rutin	3500	
	Quersetin	1-129	
Basit Fenoller	Flavan-3-ol		Talhaoui et al., 2015 Lee et al., 2009 Brahmi et al., 2013 Herrero et al., 2011
	Kateşin	40	
	Tirosol	90-660	
	Hidroksitirosol	30.8-1140	
	Vanilin	1.3-8.2	
	Vanilik asit	12.8-110.1	
	Kaffeik asit	1-60	

Çizelge 2.8. Zeytin yaprağı ekstraktında bulunan bazı fenolik bileşiklerin kimyasal yapısı

Fenolik bileşik	Kimyasal yapı
Oleuropein	
Verbaskosid	
Apigenin	
Rutin	
Kuersetin	
Kateşin	
Hidroksitirosol	
Tirosol	

Oleuropein, genel olarak zeytinin meyvesinde, yağında ve işlenmesi sırasında ortaya çıkan yan ürünlerde bulunan fenolik bileşiktir. Olgunlaşmamış zeytinde 140 mg/g KM düzeyine kadar çıkarken yaprakta 60-90 mg/g KM arasında değişim gösterir (Le Tutour and Guedon, 1992). Oleuropein 1908 yılında ilk olarak Bourquelot and Ventilesco tarafından bulunmuş ancak 1960 yılında tanımlanabilmiştir (Panizzi et al., 1960). Oleuropein, *Oleaceae*, *Gentianaceae*, *Cornaleae* ve diğer pek çok bitkide bol miktarda bulunan sekoiridoidlere aittir. İridoidler ve sekoiridoidler genellikle glikozidik olarak bağlanan ve çeşitli indol alkaloidlerin öncüleri olarak terpenlerin sekonder metabolizmasından üretilen bileşiklerdir. Oleuropein 2-(3,4-dihidroksifenil) etanolün (hidroksitirosol) bir esteridir ve *Oleaceae*'nin sekoiridoid glikozitlerinde ortak olan oleosidik iskelete sahiptir (Soler-Rivas et al., 2000). Oleuropein endojen veya eksojen α -glikozidaz enzimi ile kolayca glikoz ve oleuropein aglikona dönüştürülür. Daha sonraki bileşiğin esterolizi ile elde edilen ürün yüksek katma değerli bir fenol molekülü olan hidroksitirosoldür (Briante et al., 2002). Oleuropein antimikrobiyal (Tripoli et al., 2005), antioksidan (Visioli et al., 2002), antiinflamatuvar (Visioli and Galli, 1998), anti-aterojenik (Carluccio et al., 2003) ve antiviral (Fredrickson and Group, 2000) olmak üzere çeşitli özelliklere sahiptir.

Sürdürülebilirlik kapsamında çevresel, sosyal, ekonomik ve sağlık açısından değerlendirildiğinde zeytin yaprağı ve ekstraktı ilaç, gıda, kozmetik, hayvan besleme gibi farklı alanlarda doğal antioksidan ve antimikrobiyal ajan olarak oldukça önem taşımaktadır (Basmacıoğlu-Malayoğlu ve Aktaş, 2011). Alt bölümlerde zeytin yaprağı ve ekstraktının sırasıyla antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri ve bu konuda yapılan çalışmalar özet olarak verilmiştir.

2.3.4 Zeytin yaprağı ve ekstraktının antimikrobiyal etkisi

Bir bitkinin antimikrobiyal aktivitesi bitkinin sentezlediği sekonder metabolitler ile ilişkilidir. Bitkilerin yapısında bulunan sekonder metabolitlerin yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olması son yıllarda araştırmacıların ilgisini çekerek bu alanda yapılan çalışmaların sayısı gittikçe artış göstermiştir. Özellikle yapılan *in vitro* çalışmalarda zeytin yaprağının yapısında bulunan fenolik bileşenlerin antibakteriyel, antiviral ve antifungal etkileri ortaya konmuştur

(Fredrickson and Group, 2000; Aytül, 2010; Lee and Lee, 2010). Oleuropein ve parçalanma ürünlerinin çeşitli bakteriler; *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fragi*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus cereus*, *Moraxella catarrhalis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumonie*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus carnosus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae* ve küfler üzerinde inhibe edici etkisinin olduğu ortaya konmuştur (Juven and Heniz, 1970; Tassou and Nychas, 1995; Aziz et al., 1998; Bisignano et al., 1999; Furneri et al., 2002). Fenolik bileşiklerden hidroksitirosolün solunum ve bağırsak enfeksiyonlarına neden olan gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı *in vitro* etkili olduğu (Ibarra and Sniderman, 2008), oleuropein, 4-hidroksibenzoik asit, vanilik asit ve p-kumarik asitin de antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Soler-Rivas et al., 2000). Zeytin yaprağı ekstraktının gram negatif (*E. coli* ATCC25922, *P. aeruginosa* ATCC10145, *K. pneumonia*, *Enterobacter cloacae* ATCC13047) ve gram pozitif bakteriler (*S. aureus* ATCC6538; *S. aureus* ATCC25923; *B. stearothermophilus* ATCC 11778) üzerinde antimikrobiyal aktivitesinin araştırıldığı *in vitro* bir çalışmada (Nora et al., 2012) en yüksek aktiviteyi *S. aureus* ile *E. coli*, en düşük aktiviteyi ise *P.aeruginosa* ve *B. stearothermophilus* üzerinde gösterdiği saptanmıştır. Yapılan bir başka çalışmada ise oleuropeinin gram pozitif bakterilerden *S. aureus* üzerine antimikrobiyal etkisinin, gram negatif bakterilerden *E. coli* üzerine olan etkisinden daha yüksek olduğu tespit edilmiş ve bu durum hücre yapılarındaki farklılıklarla ilişkilendirilmiştir (Sanchez et al., 2007). Zeytin yapraklarından elde edilen ticari bir ekstraktın çeşitli mikroorganizmalara (n=122) karşı etkinliğinin agar ve mikro dilüsyon yöntemleri ile araştırıldığı başka bir çalışmada ZYE'nin *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı inhibe edici özelliği olduğu (%0.31-0.78 v/v MİK) bildirilmiştir (Sudjana et al., 2009).

Zeytin yaprağı ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi ekstraksiyon sırasında kullanılan solvent çeşidine göre farklılık gösterebilir. Nitekim metanol ile ekstrakte edilen zeytin yaprağının 125-250 µg/L aralığında minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) değeri ile *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Streptococcus pyogenes*'e karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği (Hassan Ali et al., 2011), su ile ekstrakte edilen zeytin yaprağının ise *P.*

aeruginosa üzerinde %0.13, *K. pneumoniae* üzerinde %0.3, *E.coli* üzerinde %0.3 ve *S. aureus* üzerinde %0.6 düzeyinde bakterisidal etki gösterdiği (Markin et al., 2003) bildirilmiştir.

Korukluoğlu vd. (2006), zeytin yaprağının farklı solventler (su, aseton, etanol ve etil asetat) ile elde edilen ekstraktının altı farklı maya (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Candida oleophila*, *Metschnikowia fructicola* ve *Kloeckera apiculata*) üzerinde antifungal aktivitesini disk difüzyon, MİK ve minimum fungusidal konsantrasyon (MFC) yöntemleriyle araştırmışlardır. Çalışma sonucunda su ekstraksiyonu hariç diğer ekstraktların çalışılan mayalara karşı 10-28 µg/mL arasında MİK değerleri, 20-48 µg/mL arasında MFC değerleri ve 1.5-9.3 mm inhibisyon zon çapı ile çeşitli derecelerde antifungal etkiler gösterdiği, mayalar arasında *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763'nin en dirençli maya olduğu ve ZYE'nin gıda sanayinde doğal koruyucu olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Korukluoğlu vd., 2006).

Antimikrobiyal aktiviteye sahip fenolik bileşikler arasında sinerjik bir etki söz konusudur. Nitekim bir çalışmada oleuropein ve kafeik asitin tek olarak bazı bakterilere karşı gösterdikleri antimikrobiyal aktivitenin bu fenolik bileşikleri içeren zeytin yaprağı ekstraktından (oleuropein, rutin, vanilin ve kafeik asit içeren) daha düşük olduğu saptanmıştır (Lee and Lee, 2010).

2.3.5 Zeytin yaprağı ve ekstraktının antioksidan etkisi

Serbest radikal oluşumu aerobik hücrelerin doğal metabolizması ile ilişkilidir. Hücre büyümesine özgü oksijen tüketimi bir dizi oksijenin serbest radikal üretmesine neden olur. Reaktif oksijen türlerinden süperoksit radikali (O_2^-) oksijen molekülüne bir elektron eklenmesi ile oluşur. Bu sırada O_2 'nin iki elektron alarak indirgenmesi ile hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur. Üçüncü elektronun eklenmesi ile yüksek derecede reaktif hidroksil radikali ($OH^\cdot$) ve dördüncü elektronun eklenmesi ile su (H_2O) oluşur. Bu radikal gruplar biyolojik sistemler ile sitotoksik özellik gösterebilir (Visioli et al., 1998). Serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortamdan temizlenme hızı arasındaki oksidatif dengenin bozulması oksidatif stres olarak adlandırılır. Başka bir deyişle

oksidatif stres prooksidan/antioksidan dengesinde prooksidanlar lehine meydana gelen bozulmadır. Primer olarak enzimler (SOD, CAT ve GPx vb.) ve sekonder olarak antioksidan vitaminler, GSH ve birçok makro ve mikro moleküller tarafından serbest radikallerin hücrelerde oluşturduğu oksidatif hasar azaltılarak hücrelerde rekatif oksijen türlerinin (ROS) düşük seviyede tutulması sağlanır. Dokuların hasar görmesine sebep olan bu zararlı ürünlerin etkilerini ortadan kaldırmak veya en aza indirmek için antioksidanların belirli seviyede tutulması gerekmektedir (Ajaikumar et al., 2005). Antioksidan savunmanın ilk adımı olan SOD enzimi serbest radikallere karşı (özellikle de süperoksit anyonuna karşı) savunmada süpürücü etki göstermektedir ve süperoksit radikallerinin oksijene ve hidrojen peroksit bozunmasını katalize eder (Younus, 2018). Katalaz enzimi, hidrojen peroksitlerin birikmesini önleyen ve hidrojen peroksitin H_2O ve O_2 dönüşümünü katalizleyen savunma mekanizmasının ikinci adımını oluşturur, GPx ise hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin temizlenmesinde görevlidir (Younus, 2018). Herhangi bir enzim değerindeki artış metabolik süreçler sırasında arttırılmış bir substrat üretimi ile bağlantılı olabilir. Bu nedenle hem SOD hem de CAT aktivitesi savunma sisteminin nasıl işlediği ve oksidatif stresin durumu hakkında bilgi verir. Bir antioksidan düşük konsantrasyonlarda bulunduğu oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya inhibe eden bir madde olarak tanımlanabilir. Canlı organizmalarda antioksidan eksikliği oksidatif strese neden olur. Antioksidan bileşiklerin biyomoleküllerin serbest radikal redoks reaksiyonlarından korunması için gerekli olduğu bulunmuştur (Pourezza, 2013). Antioksidanların serbest radikallerin varlığının birincil göstergesi olarak kabul edilen lipid peroksidasyonu önemli ölçüde azalttığı bilinmektedir (Silva et al., 2006). Doğal ve sentetik olmak üzere iki temel antioksidan kategorisi vardır, ikincisinin kanserojenlik de dahil olmak üzere uzun vadeli toksikolojik etkilere neden olduğu bulunmuştur. Söz konusu olumsuz etkilerinden dolayı bilinçli tüketicilerin doğal ve güvenilir ürünleri tercih etmeleri sentetik antioksidanlar yerine doğal bitkisel ürünlerin kullanımını gündeme getirmiştir (Basmacioğlu-Malayoğlu vd., 2008). Zeytin ve zeytin işleme yan ürünleri içerdiği karotenoidler, tokoferoller ve fenolik bileşikler ile doğal antioksidanlar açısından zengin bir kaynak oluştururlar. Antioksidanlar olarak polifenollerin, ROS ve nitrojen (RNS) türleri ile hücre antioksidanları arasında oluşan konsantrasyon dengesizliğinin sonucu olarak hücresel seviyelerde oksidatif hasarı ve stresi önleyebileceği veya

en aza indirebileceği bildirilmiştir (Amarowicz et al., 2004). Yüksek fenolik madde içeriğine sahip zeytin yaprağının çok güçlü radikal temizleme aktivitesine sahip olduğu ve bu özelliği ile de gıdalarda doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceğini bildirin bildirişler bulunmaktadır (Farag et al., 2003; DeJong and Lanari, 2009; Stockhammer et al., 2009).

Fenolik bileşiklerin birçoğu ayrı ayrı değerlendirildiğinde; antioksidan etkilerinin yapılarındaki redoks özellikleri veren fonksiyonel grupların karakteristiği, miktarı ve hidroksil konumu ile ilişkili olduğu görülmüştür (Goulas et al., 2010). Bununla birlikte bazı çalışmalar fenolik bileşiklerin birlikte olduklarında antioksidan kapasite üzerinde tek etkilerine göre birçok fenolik maddeyi içeren zeytin yaprağı ekstraktında olduğu gibi sinerjik etki göstererek daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Lee and Lee, 2010; Xie et al., 2015). Yapılan çalışmalar incelendiğinde; metanol ile ekstrakte edilen zeytin yaprağının toplam fenolik madde içeriği farklı çalışmalarda 12.7 mg GAE/g (Ferreira et al., 2007), 24.1 mg GAE/g (Abaza et al., 2011) ve 131.7 mg GAE/g (Lins et al., 2018) saptanarak farklı sonuçlarla karşılaşılmıştır. Bir başka çalışmada, zeytin yaprağı ekstraktının antioksidan aktivitesinin hidroksitirosol ile benzer olduğu ve diğer fenolik bileşiklerin (sırasıyla diosmetin, kafeik asit, verbaskosid, oleuropein, luteolin-7-glukosid, vanillik asid, diosmetin-7- glukosid, apigenin-7-glukosid, tirosol, vanillin) tek olarak ZYE'den daha düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğu ortaya konmuştur (Benavente-Garcia et al., 2000).

Zeytin yaprağının ana aktif bileşeni oleuropein, serbest radikallerin etkisini engelleyerek ve toplayıcı etki gösterip serbest radikalleri daha zayıf moleküllere dönüştürerek antioksidan aktivite gösterir. Serbest radikallerin etkisini demir ve bakır gibi metal iyonlarıyla bağ oluşturarak birçok inflamatuvar enzimlerin aktivitelerini baskılayarak engellediği; toplayıcı etkisini ise hidroksil gruplarında bulunan serbest radikalleri nötürlemesi ve bunların olumsuz etkilerini engelleyerek gerçekleştirdiği bildirilmektedir (Visioli et al., 2002; Tripoli et al., 2005). Nitekim oleuropein ve hidroksitirosolün doğal antioksidan olan vitamin E ve sentetik antioksidan olan butil hidroksi tolueen'den (BHT) daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Aruoma et al., 1998). Zeytin yaprağı ekstraktının antioksidan aktivitesi hasat dönemi ve zeytin çeşidine göre farklılık

gösterir. Nitekim farklı dönemlerde hasat edilen zeytin yapraklarından elde edilen ekstraktın 2.2-difenil-1-pikrilhidrazi hidrat (DPPH) radikal süpürme kapasite yöntemi ve trolox eşdeğeri antioksidan aktivite (TEAC) yöntemi olmak üzere iki farklı yöntemle göre antioksidan aktivitesinin araştırıldığı çalışmada; yaprakların gelişmeyi tamamladıkları mart ayında en yüksek, aralık ayında ise en düşük aktivite belirlenmiştir (Blasi et al., 2016) .

Yüksek antimikrobiyal ve antioksidan özelliğe sahip zeytin yaprağının hayvan sağlığı açısından kan basıncını düşürdüğü (Samuelsson, 1951), koroner arterlerde kan akışını arttırdığı ve bağırsak kas spazmlarını önlediği bildirilmiştir (Zarzuelo et al., 1991). Zeytin yaprağı veya ekstraktının kanatlı kümes hayvanlarının beslenmesinde kullanım potansiyelinin araştırıldığı çalışmalar da literatürde mevcuttur. Nitekim yumurtacı tavuklarda kan kolesterolünü düşürücü (Çayan ve Erener, 2015) ve etlik piliçlerde bağırsak florası (Yavaş, 2013) ve yine etlik piliçlerde bağırsak florası ile birlikte performans üzerinde olumlu etkileri (Erener vd., 2020) saptanmıştır.

Çalışmanın konusu ve çalışılan tür gereği sadece ruminantlarla ilgili literatür bilgileri daha kapsamlı olarak alt bölümde verilmiştir.

2.3.6 Ruminant beslemede zeytin yaprağı ve ekstraktının kullanımına yönelik çalışmalar

Bitki ekstraktlarının ruminantların beslenmesinde kullanımı ve rumen fermentasyonu üzerine olan etkileri konusunda son yıllarda çalışmalar yapılmakla birlikte ZYE'nin ruminant beslemede rumen fermentasyonu ve besin madde sindirilebilirliği üzerine etkilerinin araştırıldığı *in vivo* çalışmalara rastlanılmamıştır. Yapılan *in vitro* bir çalışmada (Öztürk vd., 2012) günlük 15 ve 150 mg ZYE'nin kaba:kesif yem (50:50) içerikli rasyona ilavesinin *in vitro* rumen fermentasyonu üzerine etkisi rumen simulasyon tekniği (RUSITEC) ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda ZYE'nin her iki dozunun da TUYA ve propiyonik asit düzeyini artırdığı, yüksek dozun bütirik asit düzeyi ve toplam protozoa sayısını ise azalttığı ortaya konmuştur. Araştırmacılar tarafından ZYE'nin yarı-sürekli rumen simulasyon kültür sisteminde bazı fermentasyon parametreleri üzerinde olumlu etkileri olduğu

dolayısıyla rumendeki fermentasyon verimliliğini artırabileceği bildirilmiştir (Öztürk vd., 2012).

Bu bölümde zeytin yaprağının doğrudan yem kaynağı olarak kullanıldığı çalışmalara da yer verilmiştir.

Zeytin yaprağının kurutulduktan sonra ruminantlar için düşük kaliteli yem kaynağı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Amici et al., 1991). Zeytin yaprağının *ad libitum* olarak kuzu besisinde kullanıldığı bir çalışmada (Munoz et al., 1983) kontrol (arpa ve yonca kuru otu içeren), arpa+balık unu+zeytin yaprağı ve sadece protein kaynağı olarak ürenin kullanılması şeklinde 3 farklı muamele grubu oluşturulmuştur. Çalışmada, zeytin yaprağı tüketen kuzuların besi sonu günlük canlı ağırlık artışının (77 g/gün) kontrol grubundan (154 g/gün) düşük, üre ilaveli yemi tüketen gruptan (40 g/gün) ise yüksek olduğu saptanmıştır. Kaba yem kaynağı olarak kurutulmuş zeytin yaprağı ve dalının birlikte kullanıldığı başka bir çalışmada ise kuzularda canlı ağırlık, canlı ağırlık artışı ve yem tüketimi üzerine söz konusu yan ürünün olumsuz etkisi saptanmamış ve kuzularda yaşama payı gereksinmesinin karşılanmasında kaba yem kaynağı olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur (Khorchani et al., 1997). Fayed et al. (2009) kurutulmuş zeytin yaprağı+dalının besin değerinin arttırılarak kaliteli kaba yem kaynağı olarak kullanım potansiyeli araştırmaya yönelik yürüttükleri çalışmalarında, %4 üre ve *T. viridae* mantarı+S. *cerevisiae* mayası ile muamelenin kuzularda besi performansı (yem tüketimi, yemden yararlanma, canlı ağırlık ve günlük canlı ağırlık artışı) bakımından önemli düzeyde farklılığa neden olmadığını ortaya koymuşlardır. Aynı çalışmada her gruptan 3 hayvan alınarak yürütülen sindirim denemesinde, KM, OM, HP ve HY sindirilme dereceleri, NH₃-N ve kan parametre düzeylerinde (total protein, albümin, globulin, üre, kreatinin) muamele gruplarında kontrole göre artış saptanmıştır. Zeytin yaprağının besi performansı üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmaların yanı sıra süt verimi ve kalitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Nitekim Fegeros et al. (1995) yonca ve amonyak ile muamele edilmiş zeytin yaprağı ile besledikleri laktasyondaki koyunların süt verimlerini sırasıyla 1043 g/gün ve 1021 g/gün saptamışlardır. Zeytin yaprağı ilavesiyle sütteki yağ asitlerinden oleik ve linolenik asit içeriğinin yonca ile beslenenlere göre yüksek olduğu ortaya konmuştur. Aynı çalışmada taze

ve amonyak ile muamele edilmiş zeytin yapraklarının besin madde sindirilebilirlikleri araştırılarak HP, HS, NDF ve ADF sindirilebilirliğinin amonyak muamelesi ile arttığı, HY sindirilebilirliğinin ise düştüğü belirlenmiştir (Fegeros et al., 1995). Başka bir çalışmada (Tsiplakou and Zervas, 2008) zeytin yaprağı ile beslenen koyun ve keçilerden elde edilen sütlerin yağ ve protein içeriği ile süt veriminin değişmediği, ancak sütteki yağ asitleri düzeylerinin zeytin yaprağı kullanımından etkilendiği saptanmıştır.

Zeytin yaprağına %2 polietilen glikol (PEG) veya arpa+soya (%25) ilavesinin koyunlarda (kaba yem kaynağı) rumen parçalanabilirliği, rumen fermentasyon ve protozoa popülasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada (Yáñez Ruiz et al., 2004a) zeytin yaprağının *in situ* ruminal KM ve HP parçalanabilirliği, rumen sıvısı TUYA düzeyi ve rumen protozoalarından Entodiniomorphida sayısı zeytin yaprağına arpa+soya ilaveli grupta artmış, Holotricha sayısı yok denecek kadar azalmıştır. Zeytin yaprağının rumen mikroorganizmalarının aktivitesini olumsuz etkilediği, kolay parçalanabilen karbonhidrat ve protein kaynaklarının birlikte kullanılması ile bu olumsuz etkinin önlenileceği bildirilmiştir (Yáñez Ruiz et al., 2004a). Diğer bir yan ürün olan iki aşamalı kurutulmuş zeytin keki ve zeytin kekine %2 PEG ilavesinin koyunlarda rumen fermentasyonu ve protozoa popülasyonu üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada (Yáñez Ruiz et al., 2004b) PEG ilavesi ile rumen pH'sı düşmüş, rumen sıvısı $\text{NH}_3\text{-N}$ ve TUYA düzeyi artmış, rumen protozoalarından *Entodiniomorphida* sayısı artarken *Holotricha* sayısı değişmemiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Hayvan materyali

In vitro denemede rumen sıvısının temini için ortalama ağırlıkları 74 ± 0.5 kg olan 4 baş ergin Akkaraman koç hayvan materyali olarak kullanılmıştır. *In vivo* çalışmanın hayvan materyalini aynı ırkta ortalama ağırlıkları 75 ± 0.5 kg olan 3 baş ergin koç oluşturmuştur. Çalışma Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Merkez Eğitim Müdürlüğü'nde yürütülmüştür. *In vitro* denemede hayvanlar 3x6m ebatlarında bireysel bölmelerde barındırılmıştır. Bireysel bölmelerde sürekli önlerinde temiz su ve yemlikler bulundurulmuştur (Şekil 3.1). *In vivo* denemede hayvanların bireysel bölmeye ve uygulanacak besleme rejimine adaptasyonu için 10 günlük alıştırmaya dönemi uygulanmıştır. Daha sonra hayvanlar 10 gün boyunca gübre toplamak amacıyla sindirim kafeslerinde barındırılmışlar ve önlerinde sürekli temiz su ve yemlik bulundurulmuştur (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Hayvan denemelerinin yürütüldüğü bireysel bölmeler (özgün).



Şekil 3.2. Sindirim denemesinin yürütüldüğü sindirim kafesleri (özgün).

3.1.2 Yem materyali

3.1.2.1 In vitro deneme

Yem materyali olarak Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü'nden temin edilen yonca kuru otu, arpa ve ayçiçeği küspesi kullanılmıştır. Yemler kullanılmadan önce 1 mm'lik elekten geçecek şekilde öğütülmüştür. Arpa, yonca kuru otu ve ayçiçeği tohumu küspesi besin madde içeriği Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *In vitro* denemede kullanılan yemlerin besin madde içerikleri, % KM

Besin madde kompozisyonu	Arpa	Yonca kuru otu	Ayçiçeği tohumu küspesi
KM	89.51	89.03	88.72
HK	2.56	9.39	5.88
HP	11.91	19.49	34.25
HY	2.08	1.66	0.51
HS	5.98	21.95	28.04
NDF	27.27	33.97	41.51
ADF	8.26	28.85	32.95
ADL	0.59	5.85	9.49
Azotsuz öz madde*	66.98	36.54	20.04

* Azotsuz öz madde = KM-(HK+HP+HY+HS)

3.1.2.2 In vivo deneme

Yem materyalini %60 kaba yem (yonca kuru otu ve arpa samanı) ve %40 kesif yem oluşturmıştır. Denemede kullanılan kesif yem Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü'nün yem hazırlama ünitesinde hazırlanmıştır. Yemler sabah 08.30 ve öğleden sonra 16.30'da olmak üzere iki öğün şeklinde hayvanlara yaşama payının 1.3 katı olacak şekilde (1.69 kg KM, 3.24 Mcal ME/gün) verilmiştir (NRC, 2007). Kontrol ve muamele gruplarının kesif yem hammadde kompozisyonları aynı olup gruplardaki farklılığı; çalışmada etkisinin araştırıldığı ZYE'nin *in vitro* çalışma sonuçları değerlendirilerek seçilen 2 farklı dozu oluşturmıştır. *In vivo* denemede kullanılan kesif yemin yapısı ve kullanılan tüm yemlerin (kesif, yonca kuru otu ve arpa samanı) besin madde içerikleri Çizelge 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. *In vivo* denemede kullanılan kesif yemin yapısı ve kullanılan yemlerin (kesif, yonca kuru otu ve arpa samanı) besin madde içerikleri

Kesif yemin yapısı, %			
Arpa	68.40		
Buğday kepeği	20.00		
ATK	9.00		
Mermer tozu	2.00		
Vit-min premix*	0.10		
Tuz	0.50		
Besin madde içeriği, % KM	Kesif yem	Yonca kuru otu	Arpa samanı
KM	92.26	89.03	95.77
HK	5.44	9.39	7.05
HP	14.07	19.49	3.45
HY	1.63	1.66	0.55
HS	8.67	21.95	42.97
NDF	50.74	33.97	76.86
ADF	18.42	28.85	52.27
ADL	6.35	5.85	3.03
Metabolik enerji, Mcal/kg KM	2.85	2.21	1.33

*Her kg yemde: 15.000.000 IU Vitamin A (E672), 3.000.000 IU Vitamin D₃ (E671), 30.000 mg Vitamin E (3a700), 5.000 mg Vitamin B₁, 100.000 mg Niasin (3a314-3a315), 10.000 mg Bakır (Cu; Sülfat; E4), 50.000 mg Demir (Fe; Sülfat; E1), 50.000 mg Mangan (Mn; oksit; E5), 150 mg Kobalt (Co; Monokarbonat; 3b304), 800 mg İyot (I; Kalsiyum İyodat; E2), 50.000 mg Çinko (Zn; Oksit; E6), 150 mg Selenyum (Se; Sodyum Selenit; E8).

3.1.3 Zeytin yaprağı ekstraktı

Denemede etanol ile ekstrakte edilmiş (Ek 1) ticari bir yurtdışı firmasından (Nutra Green Biotechnology Co., Ltd., Çin) temin edilen ZYE kullanılmıştır. Deneme başlangıcında ZYE'nin oleuropein içeriği saptanmış ve içermiş olduğu oleuropein düzeyi üzerinden *in vitro* (100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 ppm oleuropein) ve *in vivo* (200 ve 400 ppm oleuropein) denemede farklı dozlarda ZYE kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Zeytin yaprağı ekstraktının oleuropein ve toplam fenolik madde içeriği ile antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi

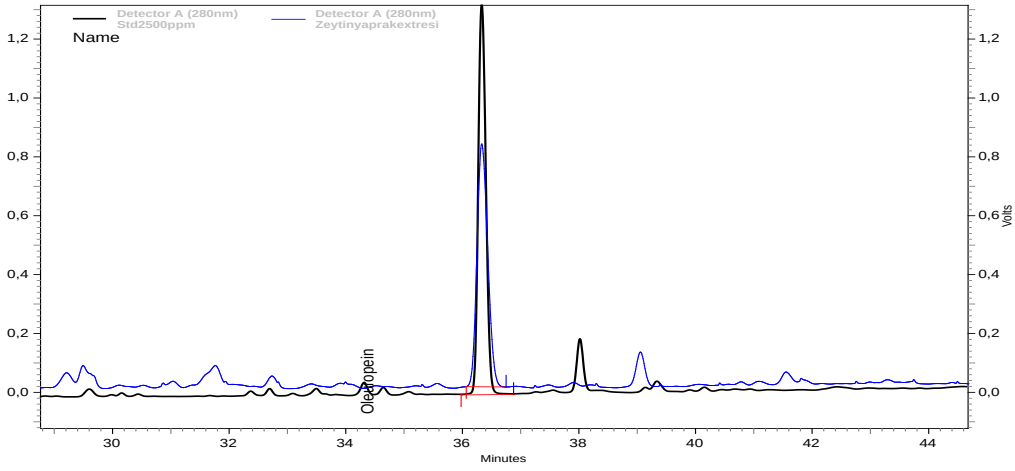
Zeytin yaprağı ekstraktının oleuropein içeriği Malik and Bradford (2006) tarafından bildirilen yönteme göre yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı ile Tübitak Marmara Araştırma Merkezi'nde belirlenmiştir. Bu amaçla 250 mg ZYE tartılıp, 10 mL %80'lik methanol ile 2 kez ekstrakte edilmiş, 30 saniye (sn) karıştırıldıktan sonra santrifuj edilip sıvı kısmı ayrılmıştır. Ayrılan sıvı kısım %80'lik methanol ile 25 mL'ye tamamlanmış ve 0.20 µm'lik filtreden süzöldükten sonra cihaza enjekte edilmiştir. Oleuropein analizi için HPLC sistemi çalışma koşulları Çizelge 3.3, gradient çalışma koşulları Çizelge 3.4 ve ZYE+oleuropein standardına ait kromatogram Şekil 3.3' de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Oleuropein analizi için HPLC sistemi çalışma koşulları

Kolon:	ACE (250 mm x 4.6 mm; 5 µm; C18)
Dedektör:	UV Visible
Mobil faz:	A=%100 asetonitril, B=%0.02 trifluoroasetikasit içeren su
Dalga boyu:	280 nm
Kolon sıcaklığı:	35 °C
Enjeksiyon hacmi:	20 µl
Retention time:	35-36 dk

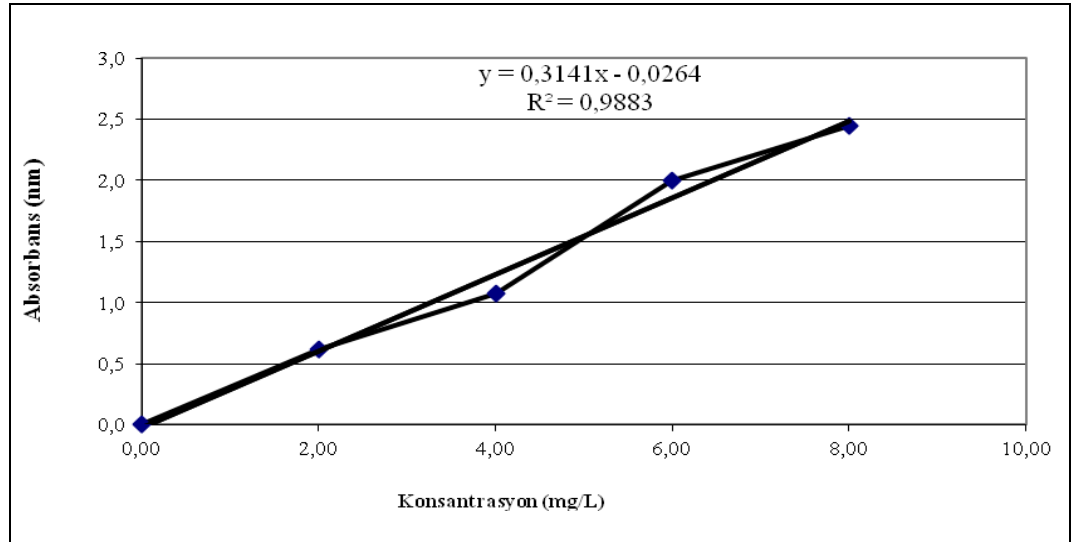
Çizelge 3.4. HPLC sistemi gradient çalışma koşulları

Süre (dk)	A (%)	B (%)	Akış hızı
0	5	95	1 mL/dk
10	10	90	1 mL/dk
24	30	70	1 mL/dk
35	40	60	1 mL/dk
45	80	20	1 mL/dk
50	5	95	1 mL/dk



Şekil 3.3. Zeytin yaprağı ekstraktı+oleuropein standardına ait kromotogram.

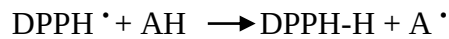
Zeytin yaprağı ekstraktının toplam fenolik madde içeriği Folin-Ciocalteu yöntemine (Vinson et al., 1995) göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu yöntemle göre 70 mg ZYE 10 mL metanol ile çözündürülmüş ve daha sonra bu çözünen kısımdan 0.5 mL alınarak başka bir tüpte üzerine 2 mL seyreltilmiş folin reaktifi (Merck) ve 1 mL Na_2CO_3 (%7'lik) ilave edilerek vorteksle karıştırılmıştır. Karanlıkta 30 dk bekletildikten sonra 750 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Amersdam 2100 UV spektrofotometre, UK) ölçümler yapılmıştır. Toplam fenolik madde içeriği gallik asit standardı kullanılarak g kuru örnekte mg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilmiştir. Gallik asit standart eğrisi Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.4. Gallik asit standart eğrisi.

Zeytin yaprağı ekstraktının antioksidan aktivitesi DPPH radikali süpürme aktivitesi ve troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) yöntemi olmak üzere iki farklı yöntemle belirlenmiştir.

Amarowicz et al. (2004)'ün uyguladığı yöntemle göre belirlenen DPPH radikal süpürme aktivite tayinin esası; antioksidan aktivite gösteren maddelerin kararlı yapıda ve mor renkli DPPH radikali süpürme etkilerinin ölçülmesine dayanmaktadır. DPPH radikali antioksidan bir madde (AH) ile reaksiyona girdiğinde AH tarafından indirgenen okside edici bir radikal gibi davranmaktadır. Koyu mor renkli bir radikal olan olan DPPH ortamda antioksidan bulunduğunda, antioksidan tarafından indirgenip rengi açılarak DPPH indirgenmiş molekülüne dönüşür ve absorbans (A) değişkenlik gösterir.



Bu amaçla ZYE 4 mL metanol (Merck) içerisinde çözündürüldükten sonra metanol ile hazırlanan 1 mM DPPH metanolik çözeltisinden (Sigma-Aldrich D9132) üzerine 0.5 mL ilave edilmiştir. Elde edilen içerik 15 sn karıştırıldıktan sonra 30 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Çözeltinin absorbansı 517 nm'de metanole karşı spektrofotometrik olarak okunmuş ve Radikal Süpürme Aktivitesi (RSA) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

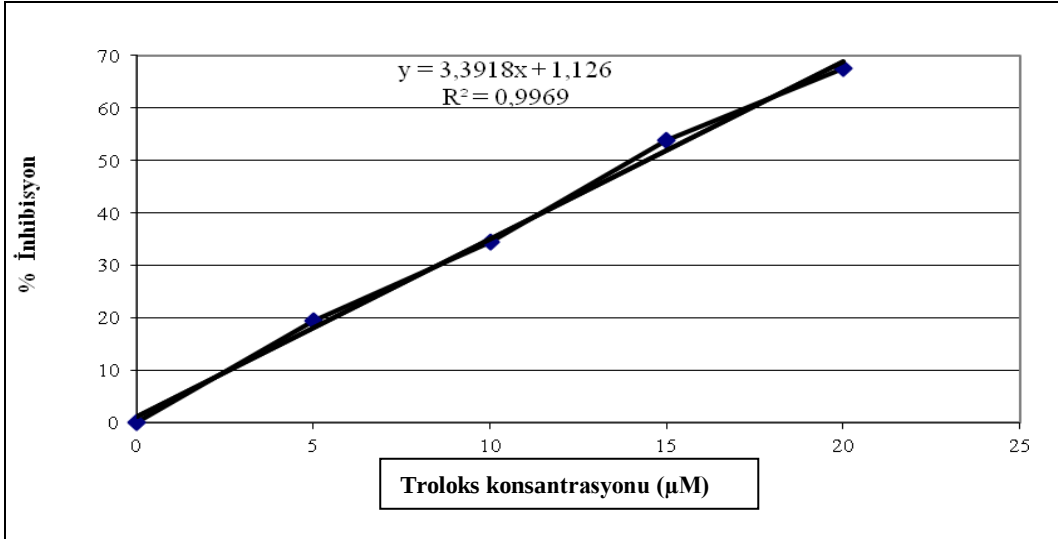
$$\%RSA = 100 \times (1 - A_E/A_D)$$

RSA: radikal süpürme aktivitesi

A_E : ekstrakt ilave edilmiş çözeltinin absorbansı

A_D : metanolik DPPH çözeltisinin absorbansı

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için kullanılan TEAC yöntemi Re et al. (1999)'a göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'in persülfatla oksidasyonu, $ABTS^{\bullet+}$ radikali oluşturulmuştur. Bunun için 7 mM amonyum ABTS tuzu (Sigma) suda çözündürülmüş ve 2.45 mM potasyum persülfatla (Merck) muamele edilerek 16 saat karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletilmiştir. ABST çözeltisi 734 nm'de 0.70 ± 0.02 absorbans değeri verecek şekilde etanol ile seyreltilmiştir. Etanol ile çözündürülen ZYE, ABST çözeltisi ile reaksiyona sokularak absorbansları 1. ve 6. dk sonunda 734 nm'de spektrofotometrik olarak köre karşı belirlenmiştir. Troloks standartları son konsantrasyonlar 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M olacak şekilde hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar g/100g olarak verilmiştir. Troloks standart eğrisi Şekil 3.5'de verilmiştir.



Şekil 3.5. Troloks standart eğrisi.

Zeytin yaprağı ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi Çankırı Karatekin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda belirlenmiştir. Ekstraktın gram negatif bakterilerden *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ile gram pozitif bakterilerden *Bacillus subtilis* (ATCC6633) *Enterococcus faecalis* (ATCC 291212), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) ve *Staphylococcus aureus* (klinik izolat) bakterileri üzerine antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon (CLSI-M02-A11) ve agar dilüsyon yöntemleriyle (CLSI-M07-A9) saptanmıştır (Wayne, 2012a,b).

Disk difüzyon yönteminde, bulanıklığı McFarland 0.5 (10^8 kob/mL)'e ayarlanmış bakteri süspansiyonlarından Mueller-Hinton agar (Merck-Cat No. 105437) yüzeyine yayma ekim yapılmıştır. Daha sonra 100 mg/mL ve 25 mg/mL içerecek şekilde hazırlanan ZYE'den, 20 µl (sırasıyla 2 mg/disk ve 0.5mg/disk) boş antibiyogram disklerine emdirilmiş ve 30 °C'de kurutulmuş diskler steril pens yardımıyla agar yüzeyine yerleştirilmiştir. Ayrıca Gentamisin (30 µg/disk, Bioanalyse-Cat No. ASD04301) referans antibiyotik olarak kullanılmıştır. Besiyerleri 37 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra 7 mm'den daha büyük olan inhibisyon zonları kaydedilmiştir.

Agar dilüsyon yönteminde, içerisinde 3 mg/mL ile 0.375 mg/mL konsantrasyonlarında ekstrakt olacak şekilde Mueller Hinton agar besiyerleri hazırlanmıştır. Her petriye 10^{-4} sulandırma oranında hazırlanmış bakterilerden 10 µl yayılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bakteri üremesinin olmadığı en son sulandırma oranı MİK olarak belirlenmiştir. Araştırmada Gentamisin 10 µg/mL ile 0.3 µg/mL aralığında sulandırılarak referans antibiyotik olarak kullanılmıştır.

3.2.2 *In vitro* ve *in vivo* denemede kullanılan yemlerin ham besin madde analizleri

Denemelerde kullanılan yemlerin, sindirilebilirlik denemeleri sonrası kalan yem ve toplanan gübrelerin ham besin madde miktarları (KM, OM, HP ve HY) AOAC (1995)'de belirtilen yöntemlere göre belirlenmiştir. Yemlerin ham selüloz, NDF, ADF ve ADL içerikleri Van Soest vd. (1991)'e göre Ankom Fiber

Analizatörü (ANKOM²⁰⁰ Fiber Analyzer, Ankom Teknoloji, Fairport, NY) kullanılarak saptanmıştır.

3.2.3 *In vitro* besin madde sindirilebilirliği

Zeytin yaprağı ekstraktının *in vitro* besin madde sindirilebilirliğinin belirlenmesi amacıyla ANKOM Daisy (DaisyII 200/220 inkübatör, Newyork-USA) *in vitro* fermentasyon sistemi kullanılmıştır (Damiran et al., 2008). Bu amaçla ortalama ağırlıkları 75 ± 0.5 kg olan 4 adet Akkaraman koçtan rumen sondası ile ağız yolundan rumene girilerek sıvı alınmış ve sıvı CO₂ gazı eşliğinde termosla konularak (Şekil 3.6) çalışılmak üzere kısa sürede laboratuvara getirilmiştir.



Şekil 3.6. Rumen sıvısı alımı ve termosla aktarılması (özgün).

Denemede; 0 ppm (Kontrol), 100 ppm (OLE100), 150 ppm (OLE150), 200 ppm (OLE200), 250 ppm (OLE250), 300 ppm (OLE300), 350 ppm (OLE350) ve 400 ppm (OLE400) oleuropein olacak şekilde farklı dozlarda ZYE'nin seçilen deneme yemlerinin (yonca kuru otu, ayçiçeği tohumu küspesi ve arpa) besin madde sindirilebilirliği üzerine etkisini belirlemek için inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir.

Buna göre 1 mm'lik elekten geçirilerek öğütülmüş yemler Ankom F57 torbalarına tartılarak rumen ortam sıcaklığı ve hareketlerinin basitçe simüle edildiği inkübatörlerde (Şekil 3.7) inkübe edilmiştir. Bu özel torbalar 50 mmx55

mm ebatlarında, polyester/polietilen karışımından yapılmış ve 25 μm 'den büyük partiküllerin geçemeyeceği porlardan oluşmuş azot içermeyen özelliktedir. (Şekil 3.8). Öncelikle torbaların üzerleri çözünmeye dayanıklı kalem (Şekil 3.8) ile numaralandırılarak daraları (W1) alınmış ve daha sonra da içlerine ilgili yem materyalinden (yaklaşık 0.5 g) tartılarak (W2) ağızları ısı damgalama (heat sealer) cihazı ile kapatılmıştır.

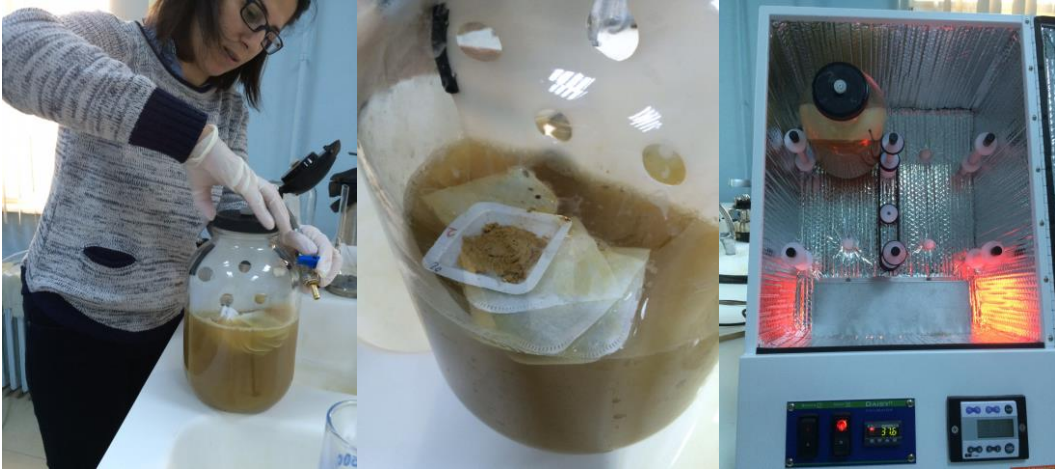


Şekil 3.7. Denemede kullanılan inkübatörler (özgün).



Şekil 3.8. F57 torbası, inkübasyon kavanozu ve çözünmeye dayanıklı kalem (özgün).

Çalışmada her bir inkübatörde yer alan 4 kavanozdan 3'ü muamele ve 1'i kontrol grubu için kullanılmıştır. İnkübasyon süresi ATK ve arpa için 24 saat, yonca kuru otu için ise lifli yapısından dolayı 48 saat olarak uygulanmıştır. Kavanozların içindeki delikli bölme inkübasyon sırasında torbaların inkübasyon sıvısı ile homojen şekilde muamelesini sağlamıştır. Rumen sıvısı alındıktan sonra çok bekletilmeden CO₂ gazı eşliğinde inkübasyon sıvısı (1600 mL tampon çözelti karışımı+400 mL rumen sıvısı), 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm ve 400 ppm oleuropein karşılığı dozlarda ZYE ve F57 torbaları (içerisine yem tartılmış) kavanozlara konmuştur (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. *In vitro* besin madde sindirilebilirliği inkübasyon aşaması (özgün).

Çizelge 3.5'te belirtilen miktarlarda hazırlanan A ve B tampon çözeltileri son ortam pH'sı 39 °C de 6.8 olacak şekilde 1:5 (B:A) oranında karıştırılarak tampon çözelti karışımı hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5. Tampon çözeltilerinin (A ve B) hazırlanması

Tampon Çözeltisi A	g/L
KH ₂ PO ₄	10
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
NaCl	0.5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.1
Tampon Çözeltisi B	
Na ₂ CO ₃	15
Na ₂ S.9H ₂ O	1

İnkübasyon öncesi ile inkübasyonun 24. ve 48. saatinde *in vitro* ortam pH'sı ölçülmüştür. İnkübasyon sonunda torbalar kavanozlardan alındıktan sonra çeşme suyu altında berrak su gelene kadar tutulmuş ve 105 °C'de kurutulduktan sonra ağırlıkları belirlenerek besin madde analizleri (KM, OM, HP ve NDF) yapılmıştır (W3). Çalışma 4 paralel ve 4 tekerrür olarak yürütülmüştür. ANKOM *in vitro* gerçek besin madde sindirilebilirlikleri (IVGS) aşağıdaki formül uygulanarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{IVGS} = 100 - [(W3 - (W1 \times C1)) \times 100 / W2]$$

W1: F57 torbalarının darası

W2: Torbaya konan yem miktarı (başlangıç) veya yemin besin madde miktarı (NDF, OM ve HP)

W3: İnkübasyon sonunda torbada kalan yem veya kalan yemin besin madde miktarı (NDF, OM ve HP)

C1: Kör ağırlığı (inkübasyondan çıkartılıp etüvde kurutulduktan sonraki boş torba ağırlığı)

3.2.4 *In vivo* besin madde sindirilebilirliği

Kesif yeme ilave edilen ZYE'nin *in vivo* besin madde sindirilebilirliği klasik sindirim denemesi (dışkı toplama yöntemi) ile belirlenmiştir. Denemede 3 adet sindirim kafesi ve polyester çadır kumaşından 40x60 cm ebatlarında gübre toplama torbaları kullanılmıştır. *In vivo* denemede ZYE *in vitro* deneme sonuçlarına göre belirlenen iki oleuropein dozu (200 ve 400 ppm) üzerinden kesif yeme ilave edilmiştir.

In vitro çalışmadan elde edilen sonuçlar *in vivo* çalışmaya aktarılırken hayvanların rumen sıvısı miktarı esas alınmıştır. Rumen sıvısı miktarını belirlemek için önce rumen hacmi ($0.51 \times \text{kgW}^{0.75}$) hesaplanmış (Al Rahmoun, 1985) ve rumen hacminin %70'inin rumen sıvısı olduğu bildirimi (Silanikove et al., 2001) dikkate alınarak rumen sıvısı miktarı belirlenmiştir. Buna göre

çalışmada kullanılan koçların ortalama 13 L rumen hacmine ve 9 L rumen sıvısına sahip olduğu bulunmuştur. Rumen sıvısı miktarı esas alınarak 200 ppm ve 400 ppm OLE içerecek şekilde ZYE kesif yeme karıştırılarak hayvanların yemi tüketmesi sağlanmıştır. Denemenin her dönemi (3 dönem) on gün alıştırma ve on gün deneme dönemi olmak üzere toplam yirmi günde tamamlanmıştır.

Deneme döneminde gübreler her gün sabahleyin yemlemeden önce aynı saatte torbalarından alınmış ve her hayvanın gübresi ayrı ayrı tartılarak günlük dışkı miktarı belirlenmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Klasik sindirim denemesi gübre toplama (özgün).

Toplanan gübrelerden %10'u ayrılarak, Bratzler and Swift'in (1959) bildirdiği yönteme göre 45°C de 72 saat etüvde ve daha sonra 24 saat oda sıcaklığında bırakılarak kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Her gübre toplama döneminin sonunda toplanan gübre örnekleri hayvanlara göre sınıflandırılmış ve her hayvana ait örnekler homojen şekilde karıştırılarak, her dönem ve hayvan için tek bir örnek elde edilmiştir. Örnekler 1 mm elekten geçecek şekilde öğütülmüş ve analizlere kadar hava almayan numune kaplarında saklanmıştır. Gübrede HP analizi yaş numunelerde, diğer besin madde analizleri kurutulmuş numunelerde yapılmış ve aşağıdaki formül kullanılarak sindirilebilirlik hesaplanmıştır (Bulgurlu ve Ergül, 1978).

Sindirilebilirlik (%) = (Tüketilen besin maddesi - Gübredeki besin maddesi)/
Tüketilen besin maddesi

3.2.5 Rumen metabolitlerinin belirlenmesi

In vivo denemede her dönemin sonunda sabah yemlemesinden önce (0. saat) ve yemlemeden 2, 4, 6, 8 saat sonra rumen sondası ile özefagustan girilerek rumenin ventral kesesinden rumen sıvısı alınmıştır. Rumen sıvısı almadan önce rumen içeriğinin karışması amacıyla hayvanların rumen bölgesine masaj yapılmıştır. Rumen sıvısı alındıktan kısa bir süre sonra içerik pH'sı dijital pH metre (Hanna HI98127) ile belirlenmiştir. Kısa sürede laboratuvara getirilen rumen sıvıları vakit kaybetmeden UYA ve NH₃-N düzeyi ile protozoa sayısının belirlenmesi amacıyla analize hazırlanmıştır. Rumen sıvısı UYA düzeyi Tjardes et al. (2000)'nin bildirdiği yöntemle göre HPLC cihazında (Agilent 1100) belirlenmiştir. Bu amaçla 5 mL rumen sıvısı 12 normal (N) H₂SO₄ ile sabitlendikten sonra 26000 g'de 30 dk boyunca santrifüj edilmiş üst kısımdan 1 mL alınarak 1.5ml'lik viallere konulmuş ve HPLC cihazına yerleştirilmiştir. Uçucu yağ asitleri analizi için HPLC sistemi çalışma koşulları Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Uçucu yağ asitleri analizi için HPLC sistemi çalışma koşulları

Kolon:	Aminex HPX-87H (300 mm x 7.8 mm; C18)
Dedektör:	UV Visible
Mobil faz:	A=%100, 0.005M H ₂ SO ₄
Dalga boyu:	210 nm
Akış hızı:	0.6 mL/dk
Kolon sıcaklığı:	41 °C
Enjeksiyon hacmi:	10 µl
Retention time:	30 dk

Analiz için 9 mL rumen sıvısı içerisinde 1/1 oranında sulandırılmış HCl (1 mL) bulunan tüplere konularak derin dondurucuda (-18°C) saklanan rumen

sıvısı NH₃-N düzeyi Kjeldahl yönteminden yararlanarak Blümmel et al. (1997)' in bildirdiği yöntemle göre saptanmıştır. Bu amaçla rumen sıvısı örnekleri santrifüj tüplerine alınarak 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra üstte kalan berrak kısımdan 5 mL alınarak %40'lık NaOH çözeltisi ile distile edilmiştir. Daha sonra N/70'lik H₂SO₄ ile titre edilerek rengin maviden kırmızıya döndüğü nokta kayıt edilmiş ve titrasyona son verilmiştir. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$\text{NH}_3\text{-N (mg/dL): } F \times 0.2 \times 1000 / B$$

F: titrasyonda harcanan asit miktarı (mL)-kör deneme için harcanan asit miktarı (mL)

B: kullanılan rumen sıvısı miktarı (mL)

Rumen sıvısında protozoon sayımı Fuchs-Rosenthal lam ve ışık mikroskobu kullanılarak Ogimoto and Imai (1981)'nin bildirdiği yöntemle göre Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde yapılmıştır. Bu amaçla 1 mL rumen sıvısı alınarak üzerine 9 mL MFS çözeltisi (Bileşimi: 100 mL formaldehit çözeltisi (%30'luk), 900 mL distile su, 0.6 g metilgreen ve 8 g NaCl) konulmuş ve daha sonra örnekler çalkalanarak Fuchs- Rosenthal lam üzerine damlatılmış (16 x 16 kareli, 0.0625 mm² alanlı, 0.200 mm derinlikte) ve mikroskoba yerleştirildikten sonra sayım yapılmıştır.

3.2.6 Biyokimyasal, oksidan ve antioksidan parametreler

In vivo denemenin her dönemi sonunda yemlemeden önce, yemlemeden 2 ve 4 saat sonra yeteri kadar kan örneği vena jugularisten jelli ve EDTA'lı tüplere alınarak (Şekil 3.11) kan alma işlemi tamamlanıncaya kadar buz çantasında bekletilmiştir.



Şekil 3.11. Kan örneklerinin alınması.

Analiz öncesi işlemler için tüm kan örnekleri kısa sürede laboratuvara getirilmiştir. Kan örnekleri 3000 rpm ve 4 °C 10 dk santrifüj edildikten sonra serum kısmı ayrılarak analiz edilinceye kadar -40 °C’de dondurucuda saklanmıştır. Santrifüj sonrası örneklerde alttaki eritrosit üç kez soğuk izotonik tuzlu su ile (%0.9’luk NaCl) yıkanmıştır. Her bir yıkama işlemi 3000 rpm’de 10 dk santrifüjlemenin ardından üst fazın atılmasıyla tamamlanmıştır. Yıkama işleminden sonra 2 mL soğuk bidistile su ilavesiyle hemolizat hazırlanmış ve analizlere kadar -80 °C’de saklanmıştır.

Kan serum örneklerinde kan üre azotu (BUN), kolesterol, trigliserid, total protein, glikoz, albumin Randox (Randox Laboratories Ltd., United Kingdom) ticari kitler, toplam antioksidan seviye (TAS) ve toplam oksidan seviye (TOS) ise Rel Assay Diagnostic (Rel Assay Kit Diagnostics, Türkiye) ticari kitler kullanılarak otoanalizör (Randox RX Monaco, Crumlin-UK) (Şekil 3.12, Şekil 3.13) ile belirlenmiştir. Serum TAS düzeyi mmol Trolox Equiv/L, TOS düzeyi $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.12. Biyokimyasal, oksidan ve antioksidan parametrelerin ölçümü (özgün).



Şekil 3.13. Otoanalizör (Randox RX Monacco, Crumlin-UK) (özgün).

Oksidan (MDA) ve antioksidan parametreler (GPx, SOD, CAT ve toplam GSH) ise ticari kit kullanılarak mikrolaka okuyucu (ELISA) cihazı (Şekil 3.14) ile belirlenmiştir.



Şekil 3.14. ELISA cihazı (özgün).

Malondialdehit analizi ticari kit (MDA assay kit, Sigma, MAK085) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Lipid peroksidasyon ürünlerinden MDA tayini, tiyobarbitürik asidin (TBA) MDA ile reaksiyona girerek 532 nm dalga boyunda ölçülebilen renkli bir bileşik vermesi ilkesine dayanır. Bu amaçla 10 µl eritrosit 500 µl 42 mM H₂SO₄ ile karıştırılmış üzerine 125 µl fosfotungstik asit solüsyonu ilave edilerek vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyon sonrası 13,000 x g 3 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant ve standartlar (200 µl) mikrotüplere alınmış ve daha sonra üzerlerine 600 µl TBA eklenerek 95°C’de 60 dk inkübe edilmiştir. Tüplerin içindeki reaksiyon karışımları buz üzerinde 10 dk bırakılarak oda sıcaklığına getirilmiş ve 200 µl alınarak 96 kuyucuklu plakaya transfer edilmiştir. ELISA cihazı ile 532 nm’de (A₅₃₂) okunan absorbans değerleri standart eğri üzerinden hesaplanarak MDA düzeyi nmol/mL olarak ifade edildi.

Toplam glutatyon (GSH) düzeyi ticari kit (Glutathione Assay Kit, Cayman, 703002, USA) kullanılarak saptanmıştır. Yöntemin esası; hafif alkali ortamda 5,5’-ditiyobis-2-nitrobenzoik asidin (DTNB, Ellman reaktifi) tiyol bileşikleriyle reaksiyonu sonucu her molekül sülfidril grubu başına oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitro benzoik asidin (TNB) 405 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi şeklindedir. Bu amaçla; 50 µl serum veya standart uygun kuyucuklara konulmuş üzerine 150 µl taze hazırlanmış Test Kokteyli [MES tamponu, kofaktör karışımı (NADP ve glikoz-6-fosfat), enzim karışımı (glutatyon redüktaz ve glikoz-6-fosfat dehidrojenaz) ve 5-5’-ditiobis 2 nitrobenzoik asit] ilave edilmiştir.

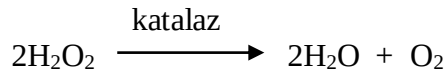
Karanlıkta inkübasyondan sonra absorbans Elisa (Mindray MR 96A, Hamburg-Germany) cihazı ile 405 nm'de ölçülerek oluşturulan standart eğriden toplam GSH konsantrasyonu hesaplanmış ve toplam GSH düzeyi $\mu\text{mol/L}$ olarak ifade edilmiştir.

Glutasyon peroksidaz (GPx) düzeyi ticari kit (Bioxytech GPx-340, OxisResearch, USA) ile saptanmıştır. Kitin hazırlanmasında Paglia and Valentine (1967)'ın bildirdiği yöntem esas alınmıştır. Yöntemin esası; GPx'in kümen hidroperoksitin GSH varlığında indirgenmesini katalizlenmesine ve kümen hidroperoksitin indirgenmesiyle oluşan glutatyonun yükseltgenmiş formunun (GSSG) glutatyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında NADPH'ın NADP^{+} 'ye yükseltgenmesiyle indirgenmesine dayanır. Enzim aktivitesi, 340 nm'deki absorbans değişimi ve seyreltme faktörleri kullanılarak U/L olarak hesaplanmıştır.

Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi ticari kit (Sigma 19160, USA) ile saptanmıştır. Bu amaçla; 20 μl eritrosit, 200 μl R1 reaktifi (tamponla 20 kat seyreltilmiş WST çözeltisi) ve 20 μl R2 reaktifi (seyreltilmiş enzim çözeltisi) kuyulara eklenmiş 37°C'de 20 dk inkübe edildikten sonra absorbans, $\lambda = 450$ nm'de ölçülmüştür. SOD aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\text{SOD (U/mL)} = \{[(\text{AKör 1-AKör 3}) - (\text{AÖrnek-Akör 2})] / (\text{AKör 1-Akör 3})\}$$

Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin saptanması ticari kit (Bovine Catalase, Elisa kit, Cusabio Biotech Co.,LTD) ile gerçekleştirilmiştir. Bu analiz, kantitatif immünolojik test yöntemlerinde sandviç ELISA protokolü kullanır. Yöntemin esası; katalaz, hidrojen peroksidin (H_2O_2) su ve moleküler oksijen vermek üzere bozunmasını katalizlemesine dayanır.



Standartlar ve serumlar, kuyucuklara pipetle konur ve mevcut olan herhangi bir CAT hareketsizleştirilmiş antikor ile bağlanır. Bağlanmamış maddeleri çıkardıktan sonra kuyucuklara CAT için spesifik olan bir biotin konjuge antikor

eklenir. Yıkadıktan sonra avidin konjuge Horseradish Peroksidazı (HRP) kuyulara eklenir. Bağlanmamış avidin-enzim reaktifini çıkarmak için bir yıkamayı takiben bir substrat solüsyonu kuyulara eklenir ve renk başlangıç basamağında bağlı olan CAT miktarı ile orantılı olarak gelişir. Renk gelişimi durdurulur ve rengin yoğunluğu 450 nm’de ölçülür. Curve Expert 1.4 programında standart eğri oluşturularak hesaplama yapılır (U/mL).

3.2.7 İstatistiksel analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS Statistics for Windows, v20 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA, 2011) paket programında ve Genel Doğrusal Model (Genel Linear Model, GLM) ile yapılmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktının *in vitro* ve *in vivo* besin madde sindirilebilirliği üzerine etkisine ait verilerin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) kullanılmıştır. Rumen metabolitleri, biyokimyasal, oksidan ve antioksidan parametreler üzerine etkisine ait verilerin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde Tekrarlı Ölçümlerde İki Yönlü Varyans analizi (Repeated Measures Two Way ANOVA) kullanılmış matematik modeli aşağıda verilmiştir. Anlamalı çıkan grup ortalamalarının karşılaştırılması için Bonferroni çoklu karşılaştırma testinden yararlanılmıştır.

$$y_{ijk} = \mu + D_l + Z_j + (D*Z)_{lj} + e_{ijk}$$

y_{ijk} = İlgilenilen özellik açısından l.doz j. zaman i. koça ait k. ölçüm

μ = ilgilenilen ölçüm açısından popülasyon ortalaması

D_l = Uygulanılan l. dozun etkisi (3 seviye)

Z_j = Uygulanılan j. zamanın etkisi (5 seviye)

$(D*Z)_{lj}$ = l. dozun j. zamanın interaksyon etkisi

e_{ijk} = l.doz j. zaman i. koç ve k. ölçüme ait şansa bağlı hata etkisi

In vitro deneme grupları arasındaki linear, kuadratik ve kübik ilişkiler IBM SPSS Statistics for Windows, v20 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA, 2011) paket programda ortogonal polinom karşılaştırma ile belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Denemeden elde edilen bulgular; ZYE'nin oleuropein ve toplam fenolik madde içeriği ile antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi, *in vitro* ve *in vivo* besin madde sindirilebilirliği, rumen metabolitleri ile biyokimyasal, oksidan ve antioksidan parametreler alt başlıkları altında verilmiştir.

4.1 Zeytin Yapağı Ekstraktının Oleuropein ve Toplam Fenolik Madde İçeriği ile Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitesi

Çizelge 4.1'de ZYE'nin oleuropein ve toplam fenolik madde içeriği ile iki farklı yöntemle göre (DPPH radikali süpürme aktivitesi ve TEAC) belirlenen antioksidan aktivitesi verilmiştir.

Çizelge 4.1. Zeytin yapağı ekstraktının oleuropein ve toplam fenolik madde içeriği ile antioksidan aktivitesi

Oleuropein (mg/g)	Toplam fenolik madde (mg GAE/g)	DPPH (%)	TEAC (g/100g)
220.30	177.28 ± 1.80	84.89 ± 0.80	12.13 ± 1.40

Ortalama±standart hata, n=3

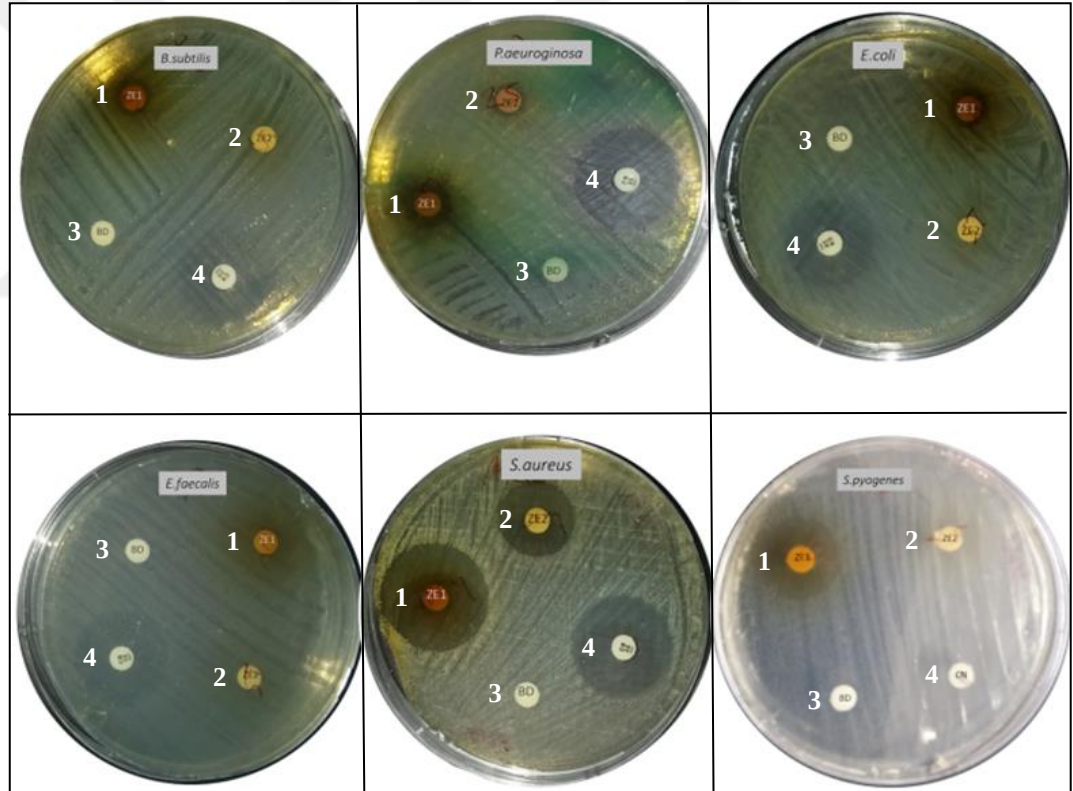
Zeytin yapağı ekstraktının oleuropein içeriği 220.3 mg/g ve toplam fenolik madde içeriği 177.28 mg GAE/g belirlenmiştir. İki farklı yöntemle ZYE'nin antioksidan aktivitesinin belirlendiği bu çalışmada DPPH radikal süpürme kapasitesi %84.89 ve TEAC ise 12.13 g/100 g olarak saptanmıştır.

Zeytin yapağı ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Disk difüzyon yöntemine göre test mikroorganizmaların üreme inhibisyon zon çapları Çizelge 4.2 ve inhibisyon zon çaplarının görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Disk difüzyon yöntemine göre test mikroorganizmalarının üreme inhibisyon zon çapları

Test mikroorganizmaları	İnhibisyon zon çapları (mm)		
	ZYE1	ZYE2	A
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC6633)	10	R	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	14	8	25
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	10	R	23
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 291212)	8.5	R	22
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	29	20	24
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)	21	R	25

ZYE1: 2 mg ZYE/disk
 ZYE2: 0.5 mg ZYE/disk
 A: Gentamisin
 R: Dirençli



Şekil 4.1. Disk difüzyon yöntemine göre test mikroorganizmalarının üreme inhibisyon zon çaplarının görüntüsü. 1: ZYE1 (2 mg ZYE/disk), 2: ZYE2 (0.5 mg ZYE/disk), 3: BD (boş disk), 4: CN (Gentamisin, 30 µg/disk).

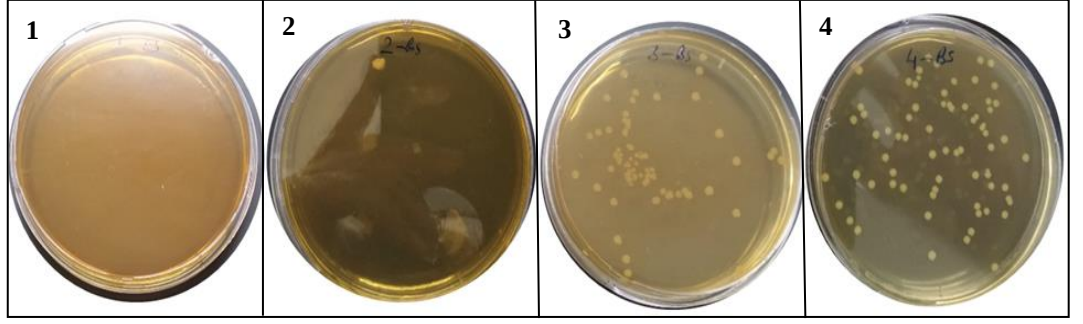
Elde edilen bulgulara göre; düşük dozda (0.5 mg/disk) kullanılan ZYE sırasıyla 8 mm ve 20 mm inhibisyon zon çapıyla *P. aeruginosa* ve *S. aureus* gelişimini inhibe etmiştir. Çalışılan diğer bakteri türlerinin ZYE'nin düşük dozuna karşı dirençli olduğu görülmüş ve daha yüksek doz ZYE'nin etkisi araştırılmıştır. Yüksek doz (2 mg/disk) ZYE'nin tüm test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek antimikrobiyal aktiviteyi 29 mm inhibisyon zon çapı ile *S. aureus* üzerinde göstermiştir. Bu mikrororganizmayı 21 mm inhibisyon zon çapı ile *S. pyogenes* izlemiştir. Yüksek dozda ZYE; *B. subtilis*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı sırasıyla 10, 14 ve 10 mm'lik inhibisyon zonları oluşturmuştur. En düşük antimikrobiyal aktivite 8.5 mm inhibisyon zon çapı ile *E. faecalis* üzerinde belirlenmiştir.

Agar dilüsyon yöntemi ile ZYE'nin farklı konsantrasyonlarda (3, 1.5, 0.75 ve 0.375 mg/mL) test mikroorganizmalar üzerine belirlenen MİK değerleri Çizelge 4.3 ve ZYE'nin farklı konsantrasyonlarının test mikroorganizmaların (*B. subtilis* ve *E. coli*) gelişimi üzerindeki etkilerinin görüntüleri ise Şekil 4.2 ve 4.3'de verilmiştir.

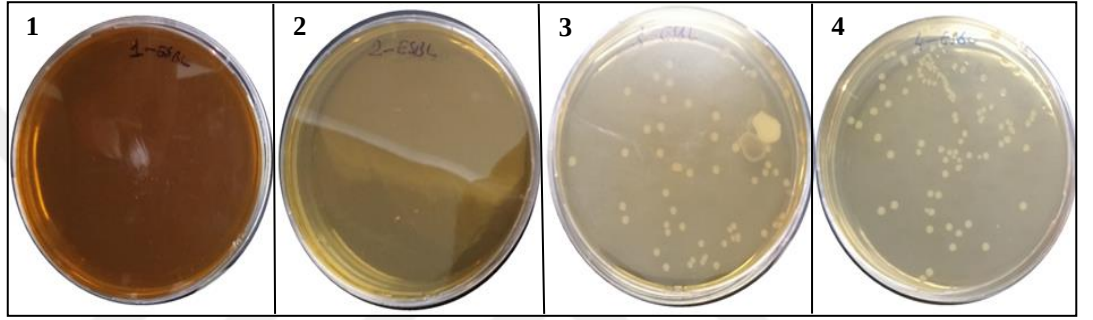
Çizelge 4.3. Zeytin yaprağı ekstraktının MİK değerleri (mg/mL)

Test mikroorganizmaları	Zeytin yaprağı ekstraktı (mg/mL)	A (µg/mL)
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC6633)	1.5	1.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	0.75	1.25
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	0.75	1.25
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 291212)	1.5	1.25
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	0.375	0.625
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)	0.75	0.625

A: Gentamisin



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda ZYE'nin *B. subtilis* üzerine etkisi. 1: 3 mg/mL ZYE, 2: 1.5 mg/mL ZYE, 3: 0.75 mg/mL ZYE, 4: 0.375 mg/mL ZYE.



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda ZYE'nin *E. coli* üzerine etkisi, 1: 3 mg/mL ZYE, 2: 1.5 mg/mL ZYE, 3: 0.75 mg/mL ZYE, 4: 0.375 mg/mL ZYE.

Çizelge 4.3 incelendiğinde; ZYE'nin test mikroorganizmalardan *S. aureus* üzerinde 0.375 mg/mL MİK değeri ile en yüksek antimikrobiyal aktive gösterdiği saptanmıştır. Bu mikroorganizmayı 0.75 mg/mL MİK değeri ile *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *S. pyogenes* mikroorganizmaları izlemiştir. Zeytin yaprağı ekstraktının en düşük antimikrobiyal aktivitesi ise 1.5 mg/mL MİK değeri ile *B. subtilis* ve *E. faecalis* üzerinde belirlenmiştir.

4.2 In Vitro Besin Madde Sindirilebilirliği

In vitro çalışmada ZYE'nin artan dozlarda ilavesinin yonca kuru otu, arpa ve ATK yem hammaddelerinin besin madde sindirilebilirliği üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen bulgular Çizelge 4.4'te, yonca kuru otu besin madde sindirilebilirliğinin muamele gruplarına göre değişimi Şekil 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Zeytin yaprağı ekstraktının artan dozlarda ilavesinin yonca kuru otunun *in vitro* KM, NDF ve OM sindirilebilirliği üzerine etkisi (%)

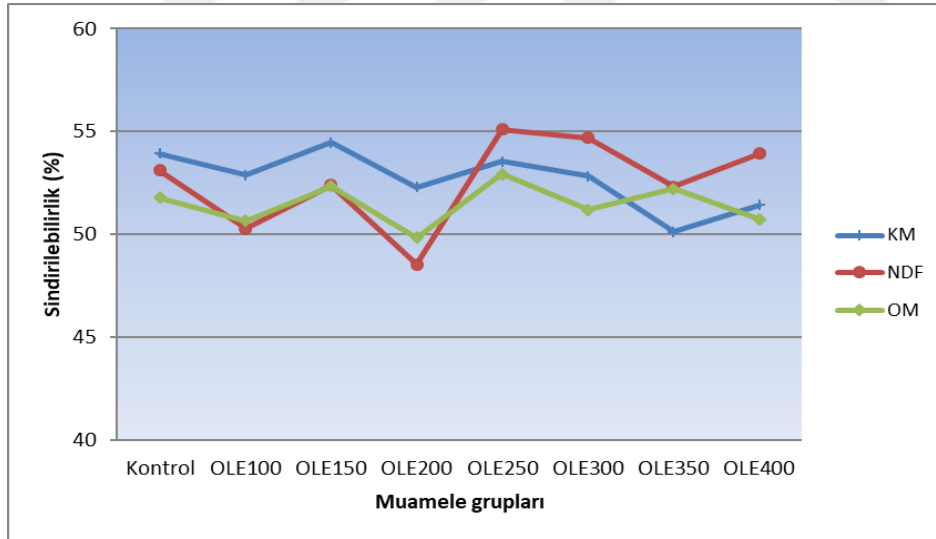
Muamele Grupları	KMS	NDFS	OMS
Kontrol	54.90±0.41 ^a	56.82±0.63 ^a	53.81±0.55 ^a
OLE100	52.70±0.60 ^{cd}	50.33±0.86 ^{cd}	50.43±0.80 ^{cd}
OLE150	54.47±0.58 ^{ab}	52.23±0.92 ^{bc}	52.36±0.77 ^{abc}
OLE200	52.29±0.58 ^{cd}	48.78±0.86 ^d	49.83±0.77 ^d
OLE250	53.55±0.58 ^{abc}	55.09±0.89 ^a	52.92±0.77 ^{ab}
OLE300	52.83±0.58 ^{bcd}	54.71±0.83 ^{ab}	51.20±0.77 ^{bcd}
OLE350	50.12±0.58 ^e	52.32±0.83 ^{bc}	52.22±0.77 ^{abc}
OLE400	51.56±0.60 ^{de}	54.36±0.86 ^{ab}	50.90±0.80 ^{bcd}
<i>P</i> değeri			
Muamele	<0.001	<0.001	<0.001
Lineer	<0.001	0.348	0.037
Kuadratik	<0.001	<0.001	0.029
Kübik	<0.001	<0.001	0.004

Kontrol: Zeytin yaprağı içermeyen, OLE100, OLE150, OLE200, OLE250, OLE300, OLE350 ve OLE400: Zeytin yaprağı ekstraktının sırasıyla 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 ppm düzeyinde oleuropein içerecek şekilde artan dozlarda ilavesiyle oluşturulmuş muamele gruplarıdır.

KMS: Kuru madde sindirilebilirliği; NDFS: Nötral deterjan lif sindirilebilirliği; OMS: Organik madde sindirilebilirliği

Ortalama±standart hata

a-e: Sütunlarda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0.05$).



Şekil 4.4. Yonca kuru otunun besin madde sindirilebilirliğinin muamele gruplarına göre değişimi.

Artan dozlarda ZYE ilavesinin yonca kuru otunun besin madde sindirilebilirliği üzerine etkisi önemli düzeyde ($P<0.05$) saptanmıştır. Yonca kuru otunun KMS ZYE ilavesiyle düşmüştür. Bu düşüş; OLE100, OLE200, OLE300,

OLE350 ve OLE400 muamele gruplarında (sırasıyla %52.70, %52.29, %52.83, %50.12 ve %51.56) ZYE ekstraktı içermeyen kontrol grubuna (%54.90) göre önemli düzeyde ($P<0.05$) iken OLE150 (%54.47) ve OLE250 (%53.55) muamele gruplarında önemsiz düzeydedir ($P>0.05$). Zeytin yaprağı ekstraktının artan dozlarda ilavesinin yonca kuru otunun KMS üzerine etkisi lineer, kuadratik ve kübik olarak önemli ($P<0.05$) düzeydedir (Çizelge 4.4).

Kuru madde sindirilebilirliğinde olduğu gibi artan dozlarda ZYE ilavesi NDFS'yi düşürmüştür (Çizelge 4.4). Nitekim OLE100, OLE150, OLE200 ve OLE350 muamele grupları (sırasıyla %50.33, %52.23, %48.78 ve %52.32) kontrole (%56.82) göre önemli düzeyde ($P<0.05$) düşük ortalama değerlere sahipken OLE250, OLE300 ve OLE400 muamele gruplarına ait ortalamalar (sırasıyla %55.09, %54.71 ve %54.36) kontrol grubu ortalamasına göre düşük ancak grup ortalamaları arasındaki farklılıklar önemsiz düzeydedir ($P>0.05$). Özellikle OLE200 muamele grubunda NDFS'nin kontrol grubuna göre %14.15 düzeyinde düşüşü dikkat çekicidir. Artan dozlarda ZYE ilavesinin yonca kuru otunun NDFS üzerine etkisi lineer olmamakla birlikte kuadratik ve kübiktir ($P<0.05$).

Artan dozlarda ZYE ilavesinin yonca kuru otunun OMS üzerine etkisi önemli düzeyde ($P<0.05$) olup bu etki düşüş şeklindedir. Çizelge 4.4'te yonca kuru otuna ait OMS ortalamalarının kontrol, OLE100, OLE150, OLE200, OLE250, OLE300, OLE350 ve OLE400 muamele gruplarında sırasıyla %53.81, %50.43, %52.36, %49.83, %52.92, %51.20, %52.22 ve %50.90 düzeyinde olduğu görülmektedir. Muamele gruplarından OLE100, OLE200, OLE300 ve OLE400 için kontrole göre düşüşler önemli düzeyde ($P<0.05$) iken OLE150, OLE250 ve OLE350 için önemsiz düzeydedir ($P>0.05$). Organik madde sindirilebilirliğinde en yüksek düşüş, NDF sindirilebilirliğinde olduğu gibi; OLE200 grubunda saptanmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktının artan dozlarda ilavesi ile yonca kuru otunun OMS lineer, kuadratik ve kübik olarak önemli düzeyde ($P<0.05$) azalış göstermiştir.

In vitro denemede ZYE'nin artan dozlarda ilavesinin ayçiçeği tohumu küspesinin KM, HP ve OM sindirilebilirliği üzerine etkisi Çizelge 4.5, ayçiçeği tohumu küspesi besin madde sindirilebilirliğinin muamele gruplarına göre değişimi Şekil 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Zeytin yaprağı ekstraktının artan dozlarda ilavesinin ayçiçeği tohumu küspesinin *in vitro* KM, HP ve OM sindirilebilirliği üzerine etkisi (%)

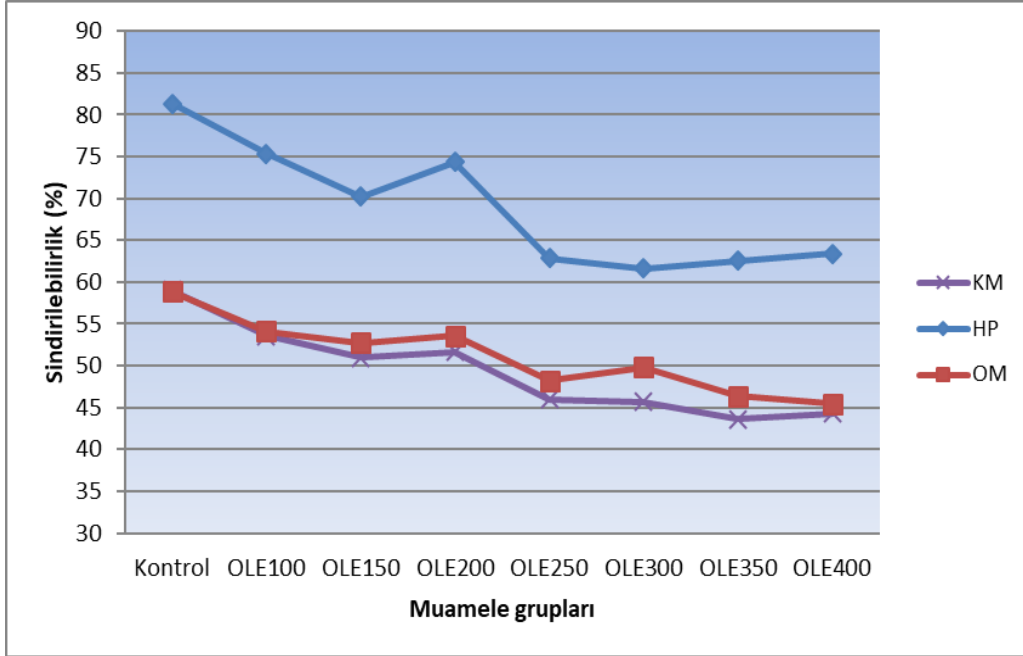
Muamele Grupları	KMS	HPS	OMS
Kontrol	57.13±0.41 ^a	80.31±0.78 ^a	58.41±0.56 ^a
OLE100	53.54±0.55 ^b	75.32±1.10 ^b	54.11±0.78 ^b
OLE150	51.67±0.56 ^c	70.18±1.10 ^c	52.74±0.78 ^b
OLE200	52.15±0.58 ^{bc}	74.35±1.10 ^b	53.80±0.81 ^b
OLE250	45.91±0.59 ^d	62.87±1.10 ^d	48.33±0.81 ^{cd}
OLE300	45.67±0.67 ^d	61.61±1.10 ^d	49.81±0.67 ^c
OLE350	43.62±0.67 ^e	62.52±1.10 ^d	46.37±0.67 ^{de}
OLE400	44.23±0.59 ^{de}	63.38±1.10 ^d	45.23±0.90 ^e
<i>P</i> değeri			
Muamele	<0.001	<0.001	<0.001
Lineer	<0.001	<0.001	<0.001
Kuadratik	<0.001	<0.001	<0.001
Kübik	<0.001	<0.001	<0.001

Kontrol: Zeytin yaprağı içermeyen, OLE100, OLE150, OLE200, OLE250, OLE300, OLE350 ve OLE400: Zeytin yaprağı ekstraktının sırasıyla 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 ppm düzeyinde oleuropein içerecek şekilde artan dozlarda ilavesiyle oluşturulmuş muamele gruplarıdır.

KMS: Kuru madde sindirilebilirliği; HPS: Ham protein sindirilebilirliği; OMS: Organik madde sindirilebilirliği

Ortalama±standart hata

a-e: Sütunlarda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0.05$).



Şekil 4.5. Ayçiçeği tohumu küspesi besin madde sindirilebilirliğinin muamele gruplarına göre değişimi.

Ayçiçeği tohumu küspesinin KM, HP ve OM sindirilebilirliği, ZYE'nin en düşük dozundan itibaren önemli düzeyde ($P<0.05$) düşmüştür. Çizelge 4.5 KMS açısından incelendiğinde; muamele gruplarında ortalama değerlerin %43.62-57.13 arasında değiştiği görülmektedir. Elde edilen bulgulara göre; en az düşüş OLE100 (%53.54) ve en fazla düşüş ise OLE350 (%43.62) grubunda saptanmıştır. Ortogonal karşılaştırmada yeme artan dozlarda ZYE ilavesinin ATK'nın KMS üzerine etkisi lineer, kuadratik ve kübik olarak önemli düzeydedir ($P<0.05$).

Ayçiçeği tohumu küspesinin HPS artan dozlarda ZYE ilavesi ile önemli düzeyde ($P<0.05$) düşmüştür. Nitekim kontrol grubunda HPS ortalama %80.31 iken diğer muamele gruplarında sırasıyla %75.32, %70.18, %74.35, %62.87, %61.61, %62.52 ve %63.38 olarak saptanmıştır. En fazla düşüş OLE300 grubunda, en az düşüş ise, KMS'de olduğu gibi, OLE100 grubunda yani en düşük dozda ZYE ilavesinde saptanmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktının artan dozda ilavesine bağlı olarak HP sindirilebilirliğinde saptanan düşüşler aynı oranda olmamıştır. Nitekim ortogonal polinomial karşılaştırmada etkiler lineer, kuadratik ve kübik olarak önemli ($P<0.05$) düzeydedir.

Çizelge 4.5 OMS açısından incelendiğinde; artan dozlarda ZYE ilavesi ATK'nın OMS'ni önemli ($P<0.05$) düzeyde düşürmüştür. Kontrole (%58.41) göre en belirgin düşüş OLE400 muamele grubunda (%45.23), en az düşüş ise diğer KM ve HP sindirilebilirliğinde olduğu gibi, OLE100 muamele grubunda (%54.11) saptanmıştır. Artan dozlarda ZYE ilavesinin ATK'nın OMS üzerine lineer, kuadratik ve kübik etkisi istatistiksel olarak önemli düzeydedir ($P<0.05$).

In vitro denemede; ZYE'nin artan dozlarda ilavesinin arpanın *in vitro* KM ve OM sindirilebilirliğine etkisi Çizelge 4.6, arpanın besin madde sindirilebilirliğinin muamele gruplarına göre değişimi Şekil 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Zeytin yaprağı ekstraktının artan dozlarda ilavesinin arpanın *in vitro* KM ve OM sindirilebilirliği üzerine etkisi (%)

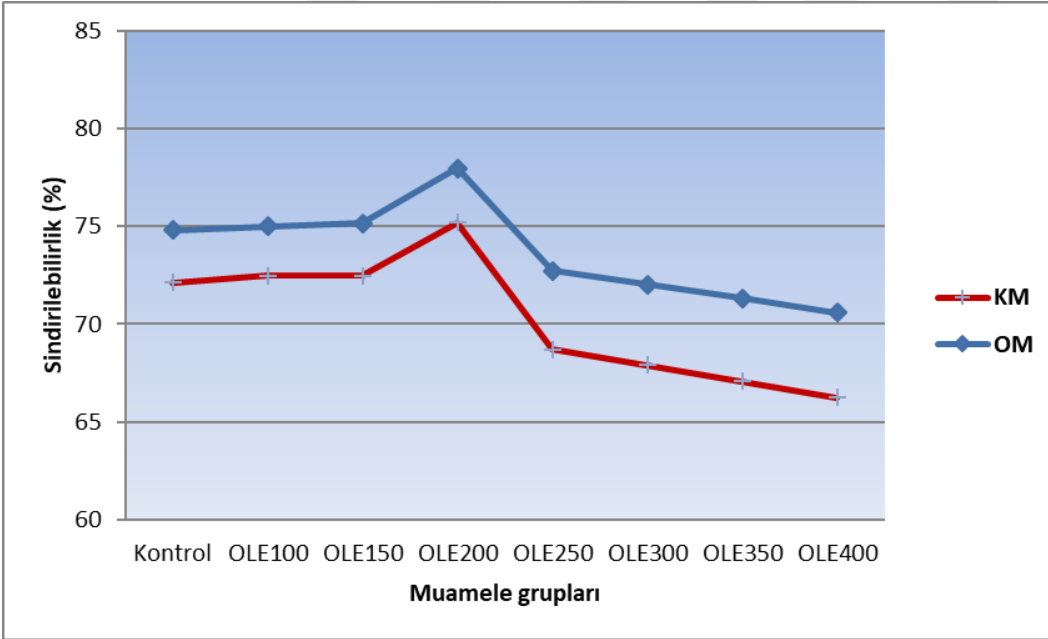
Muamele Grupları	KMS	OMS
Kontrol	71.76±0.45 ^b	75.26±0.48 ^b
OLE100	72.47±0.62 ^b	75.00±0.67 ^b
OLE150	72.46±0.62 ^b	75.14±0.67 ^b
OLE200	75.18±0.62 ^a	77.98±0.67 ^a
OLE250	68.72±0.62 ^c	73.33±0.67 ^{bc}
OLE300	67.90±0.62 ^{cd}	72.03±0.67 ^{cd}
OLE350	67.08±0.62 ^{cd}	71.32±0.67 ^d
OLE400	66.25±0.62 ^d	70.61±0.67 ^d
<i>P</i> değeri		
Muamele	<0.001	<0.001
Lineer	<0.001	<0.001
Kuadratik	<0.001	<0.001
Kübik	<0.001	<0.001

Kontrol: Zeytin yaprağı içermeyen, OLE100, OLE150, OLE200, OLE250, OLE300, OLE350 ve OLE400: Zeytin yaprağı ekstraktının sırasıyla 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 ppm düzeyinde oleuropein içerecek şekilde artan dozlarda ilavesiyle oluşturulmuş muamele gruplarıdır.

KMS: Kuru madde sindirilebilirliği; OMS: Organik madde sindirilebilirliği

Ortalama±standart hata

a-d: Sütunlarda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0.05$).



Şekil 4.6. Arpa besin madde sindirilebilirliğinin muamele gruplarına göre değişimi.

Artan dozlarda ZYE ilavesinin kolay yıkılabilir nişasta kaynağı olan arpanın KMS ve OMS üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli düzeyde ($P<0.05$)

saptanmıştır. Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi muamele gruplarına ait KMS ortalamaları sırasıyla %71.76, %72.47, %72.46, %75.18, %68.72, %67.90, %67.08 ve %66.25; muamele gruplarına ait OMS ortalamaları ise %75.26, %75.00, %75.14, %77.98, %73.33, %72.03, %71.32 ve %70.61 değerinde saptanmıştır. Arpanın KMS sindirilebilirliği, kontrole göre 100 ve 150 ppm oleuropein dozlarında önemsiz ($P>0.05$), 200 ppm oleuropein dozunda ise önemli düzeyde ($P<0.05$) artmıştır. Oleuropeinin 250 ppm ve üzeri dozlarında ise KMS kontrole göre önemli düzeyde ($P<0.05$) düşmüştür. Arpanın OMS sindirilebilirliği ise 100, 150 ve 250 ppm oleuropein dozlarında kontrol grubu ile benzerlik gösterirken OLE200 grubunda, KMS'de olduğu gibi, önemli düzeyde ($P<0.05$) artmıştır. Nitekim kontrol grubunda %71.76 ve %75.26 olarak belirlenen KM ve OM sindirilebilirliği OLE200 grubunda %75.18 ve %77.98 olarak belirlenmiştir. Oleuropeinin 300 ppm ve üzeri dozlarında OMS önemli düzeyde ($P<0.05$) düşmüştür. En düşük KMS (%66.25) ve OMS (%70.61) ise en yüksek doz yani OLE400 grubunda saptanmıştır. Artan dozlarda ZYE ilavesinin arpanın KMS ve OMS üzerine lineer, kuadratik ve kubik etkisi önemli düzeydedir ($P<0.05$).

In vitro denemede inkübasyon öncesi (0), inkübasyonun 24. ve 48. saatlerinde belirlenen pH değerlerine ait bulgular Çizelge 4.7, pH'nın inkübasyon öncesi, inkübasyonun 24. ve 48. saatteki değişimi ise Şekil 4.7'de verilmiştir.

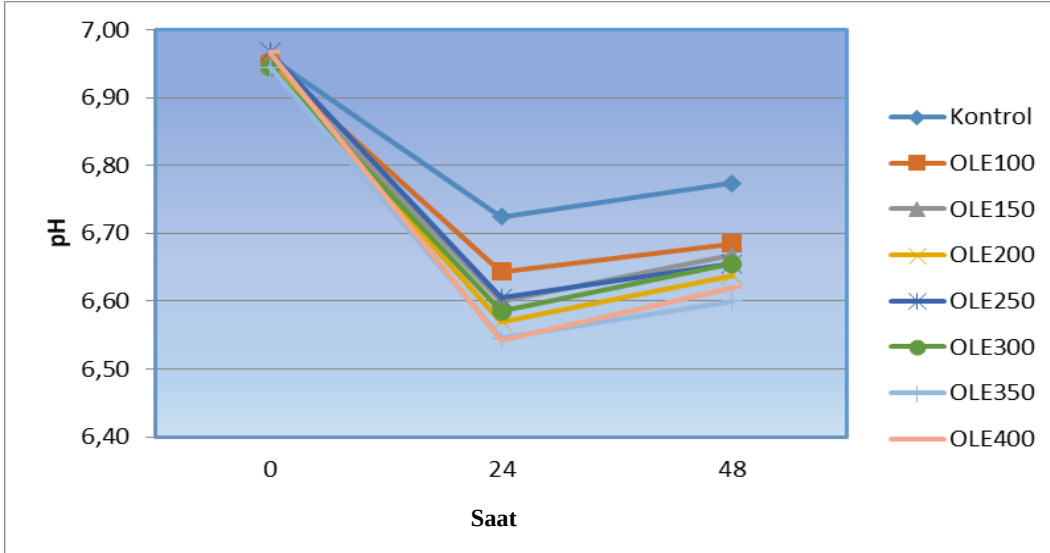
Çizelge 4.7. *In vitro* denemede ZYE'nin artan dozlarda ilavesinin inkübasyon süresince belirlenen pH değeri üzerine etkisi

Grup	Saat		
	0	24	48
Kontrol	6.96	6.72 ^a	6.77 ^a
OLE100	6.95	6.64 ^b	6.69 ^b
OLE150	6.95	6.60 ^{bc}	6.67 ^{bc}
OLE200	6.95	6.57 ^{cd}	6.64 ^{bcd}
OLE250	6.97	6.61 ^{bc}	6.66 ^{bcd}
OLE300	6.95	6.59 ^{cd}	6.66 ^{bcd}
OLE350	6.95	6.55 ^d	6.60 ^d
OLE400	6.97	6.54 ^d	6.62 ^{cd}
SEM	0.01	0.02	0.02
P değeri	0.850	<0.001	<0.001

Kontrol: Zeytin yaprağı içermeyen, OLE100, OLE150, OLE200, OLE250, OLE300, OLE350 ve OLE400: Zeytin yaprağı ekstraktının sırasıyla 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 ppm düzeyinde oleuropein içerecek şekilde artan dozlarda ilavesiyle oluşturulmuş muamele gruplarıdır.

SEM: Ortalamanın standart hatası

a-d: Sütunlarda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0.05$).



Şekil 4.7. *In vitro* denemede pH'nın muamele gruplarında saate göre değişimi.

In vitro denemede elde edilen ortalama pH değerleri incelendiğinde; inkübasyon başlangıcında muamele gruplarında pH'nın 6.95-6.97 arasında değişim gösterdiği ve muameleden etkilenmediği görülmektedir ($P>0.05$). İnkübasyon süresi ilerledikçe artan ZYE dozuna bağlı olarak 24. ve 48. saatlerde ortam pH'sı kontrole göre önemli düzeyde ($P<0.05$) düşmüştür. İnkübasyonun 24. saatinde ölçülen ortam pH'sı kontrol grubunda ortalama 6.72, muamele gruplarında ise ortalama 6.54-6.64 arasında belirlenmiştir. Benzer düşüş inkübasyonun 48. saatinde belirlenen pH değerlerinde de görülmüştür (Şekil 4.6). Nitekim kontrol grubunda ortam pH'sı ortalama 6.77 iken muamele gruplarında ortalama pH değerleri 6.60-6.69 arasında değişim göstermiştir.

4.3 *In Vivo* Besin Madde Sindirilebilirliği

In vitro denemeden elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda ZYE'nin sekiz farklı dozunun yonca kuru otu, ATK ve arpanın besin madde sindirilebilirliğini düşürdüğü belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre; ZYE'nin 200 ppm oleuropein içerecek şekilde ilavesi (OLE200) *in vitro* besin madde sindirilebilirliğinde kırılma noktası olmuştur. Nitekim 200 ppm oleuropein dozunda yonca kuru otunun ortalama NDF ve OM sindirilebilirliği en düşük, arpanın ortalama KM ve OM sindirilebilirliği en yüksektir (Çizelge 4.4). Ayçiçeği küspesinin besin madde sindirilebilirliğine ait bulgular incelendiğinde ise 200

ppm oleuropein dozundan sonra besin madde sindirilebilirliğinde belirgin düşüşler saptanmıştır. Bu bulgular doğrultusunda; çalışmanın *in vivo* kısmında 200 ppm ve en yüksek 400 ppm oleuropein dozlarının etkisini görmek amacıyla kontrol, OLE200 ve OLE400 muamele grupları ile klasik sindirim denemesi yürütülmüştür. Zeytin yaprağı ekstraktının *in vivo* besin madde sindirilebilirliği üzerine etkisi Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Zeytin yaprağı ekstraktının *in vivo* besin madde sindirilebilirliği üzerine etkisi, %

	Muamele Grupları			SEM	P değeri
	Kontrol	OLE200	OLE400		
KM	61.85	59.84	58.56	1.48	0.352
OM	65.69	65.06	63.60	1.41	0.590
HP	72.04 ^a	67.81 ^b	67.44 ^b	0.96	0.026
HY	86.13 ^a	85.73 ^a	73.72 ^b	1.36	0.001
HS	50.08	48.12	49.30	2.92	0.836
NDF	61.34	61.87	59.53	1.25	0.430
ADF	53.90	50.04	49.61	1.93	0.297

Kontrol: Zeytin yaprağı ekstraktı içermeyen, OLE200: Kontrol yemine 200 ppm düzeyinde oleuropein içerecek şekilde ZYE ilavesi, OLE400: Kontrol yemine 400 ppm düzeyinde oleuropein içerecek şekilde ZYE ilavesiyle oluşturulmuş muamele gruplarıdır.

SEM: Ortalamanın standart hatası

a, b: Satırlarda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0.05$).

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde; muamelenin etkisi sadece HP ve HY sindirilebilirliği üzerine önemli düzeyde ($P<0.05$) saptanmıştır. Ham protein sindirilme derecesi kontrol grubunda %72.04 iken OLE200 grubunda %5.87 lik bir oranla %67.81’e; OLE400 grubunda ise %6.39’luk bir oran ile %67.44’e düşmüştür ($P<0.05$). Kontrol ve OLE200 muamele gruplarında HY sindirilme derecesi sırasıyla %86.13 ve %85.73 ortalamaları ile benzerlik gösterirken 400 ppm oleuropein dozunda (OLE400) HY sindirilme derecesi %73.72’ye düşmüştür ($P<0.05$). Kontrol, OLE200 ve OLE400 grubunda KM sindirilme derecesi ortalamaları sırasıyla %61.85, %59.84 ve %58.56; OM sindirilme derecesi ortalamaları sırasıyla %65.69, %65.06 ve %63.60; HS sindirilme derecesi ortalamaları sırasıyla %50.08, %48.12 ve %49.30; NDF sindirilme derecesi ortalamaları sırasıyla %61.34, %61.87 ve %59.53; ADF sindirilme derecesi

ortalamaları sırasıyla %53.90, %50.04 ve %49.61 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

4.4 Rumen Metabolitleri

In vivo denemede; her dönemin sonunda yemlemeden önce (0) ve yemlemeden 2, 4, 6 ve 8 saat sonra alınan rumen sıvısı örneklerinde UYA ve TUYA düzeyi belirlenmiş, AA/PA hesaplanmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktının rumen sıvısı UYA ve TUYA düzeyi ile AA/PA üzerine etkisi Çizelge 4.9'da; muamele gruplarında saate göre rumen sıvısı UYA ve TUYA düzeyi ile AA/PA değişimi ise Şekil 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.9. Zeytin yaprağı ekstraktının rumen sıvısı UYA ve TUYA düzeyi ile AA/PA üzerine etkisi

Muamele grupları	Asetik asit (mmol/L)	Propiyonik asit (mmol/L)	Bütirik asit (mmol/L)	TUYA (mmol/L)	AA/PA
Kontrol	60.36±1.38 ^{ab}	14.44±0.38 ^a	8.93±0.46 ^b	85.53±1.53 ^a	4.23±0.14 ^b
OLE200	57.78±1.38 ^b	11.33±0.38 ^b	8.92±0.46 ^b	78.03±1.53 ^b	5.16±0.14 ^a
OLE400	64.58±1.38 ^a	12.85±0.38 ^{ab}	10.79±0.46 ^a	88.21±1.53 ^a	5.05±0.14 ^a
Saat					
0	53.85±1.47 ^b	10.44±0.40 ^b	7.91±0.26 ^b	72.21±2.01 ^b	5.18±0.13 ^a
2	64.23±1.75 ^{ab}	13.91±0.32 ^{ab}	8.81±0.32 ^b	87.77±2.49 ^{ab}	4.63±0.04 ^b
4	70.54±1.35 ^a	15.27±0.46 ^a	11.88±0.67 ^a	99.86±2.45 ^a	4.67±0.10 ^b
6	60.74±1.68 ^{ab}	12.78±0.49 ^{ab}	9.85±0.46 ^{ab}	83.37±2.42 ^b	4.82±0.12 ^{ab}
8	55.17±1.50 ^b	11.95±0.23 ^b	9.29±0.45 ^{ab}	76.42±1.94 ^b	4.78±0.10 ^{ab}
P değeri					
M	0.035	0.004	0.046	0.008	0.007
S	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
MxS	0.056	0.001	0.739	0.143	0.007

Kontrol: Zeytin yaprağı ekstraktı içermeyen, OLE200: Kontrol yemine 200 ppm düzeyinde oleuropein içerecek şekilde ZYE ilavesi, OLE400: Kontrol yemine 400 ppm düzeyinde oleuropein içerecek şekilde ZYE ilavesiyle oluşturulmuş muamele gruplarıdır.

M: Muamele, S: Saat, MxS: MuamelexSaat

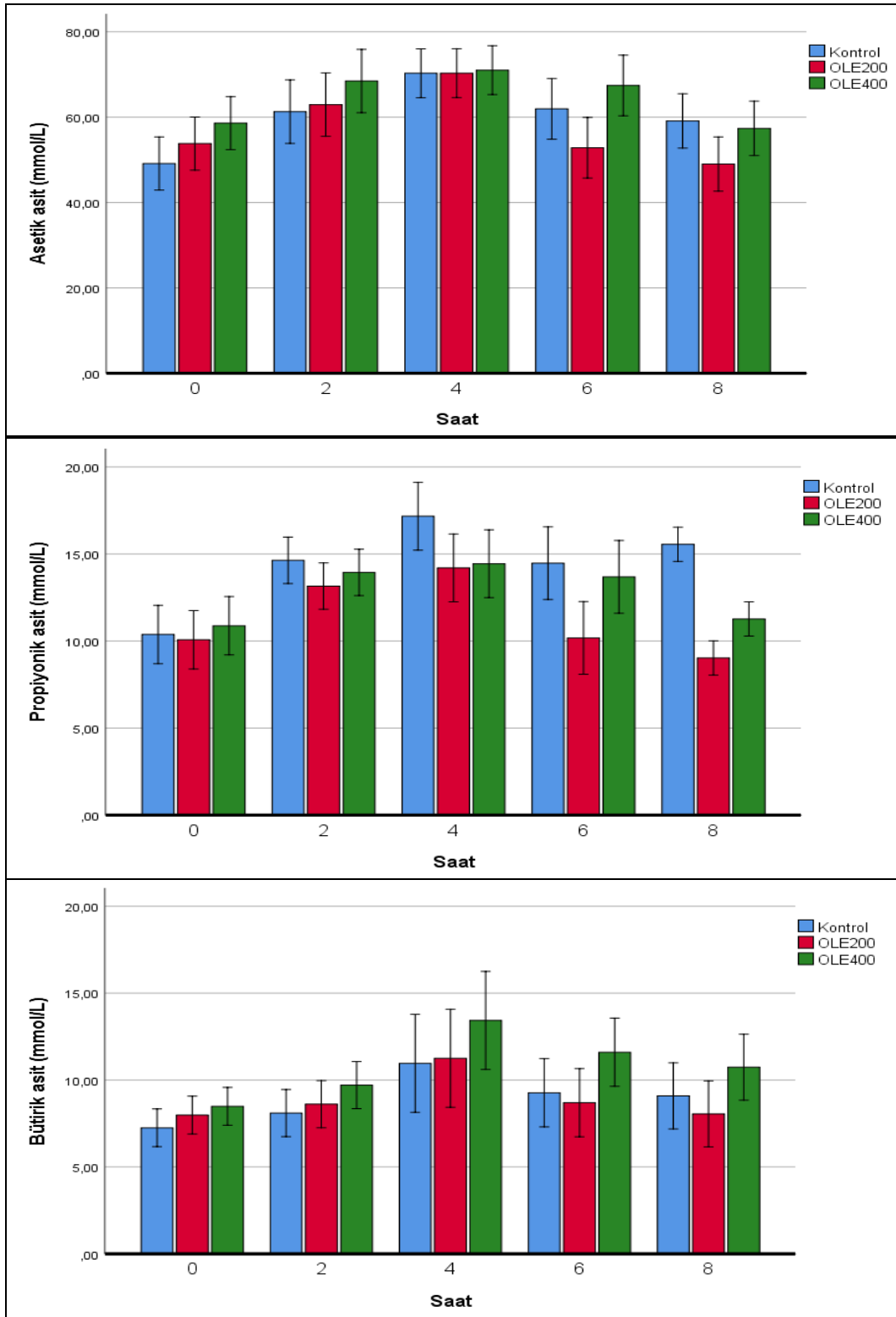
Ortalama±standart hata

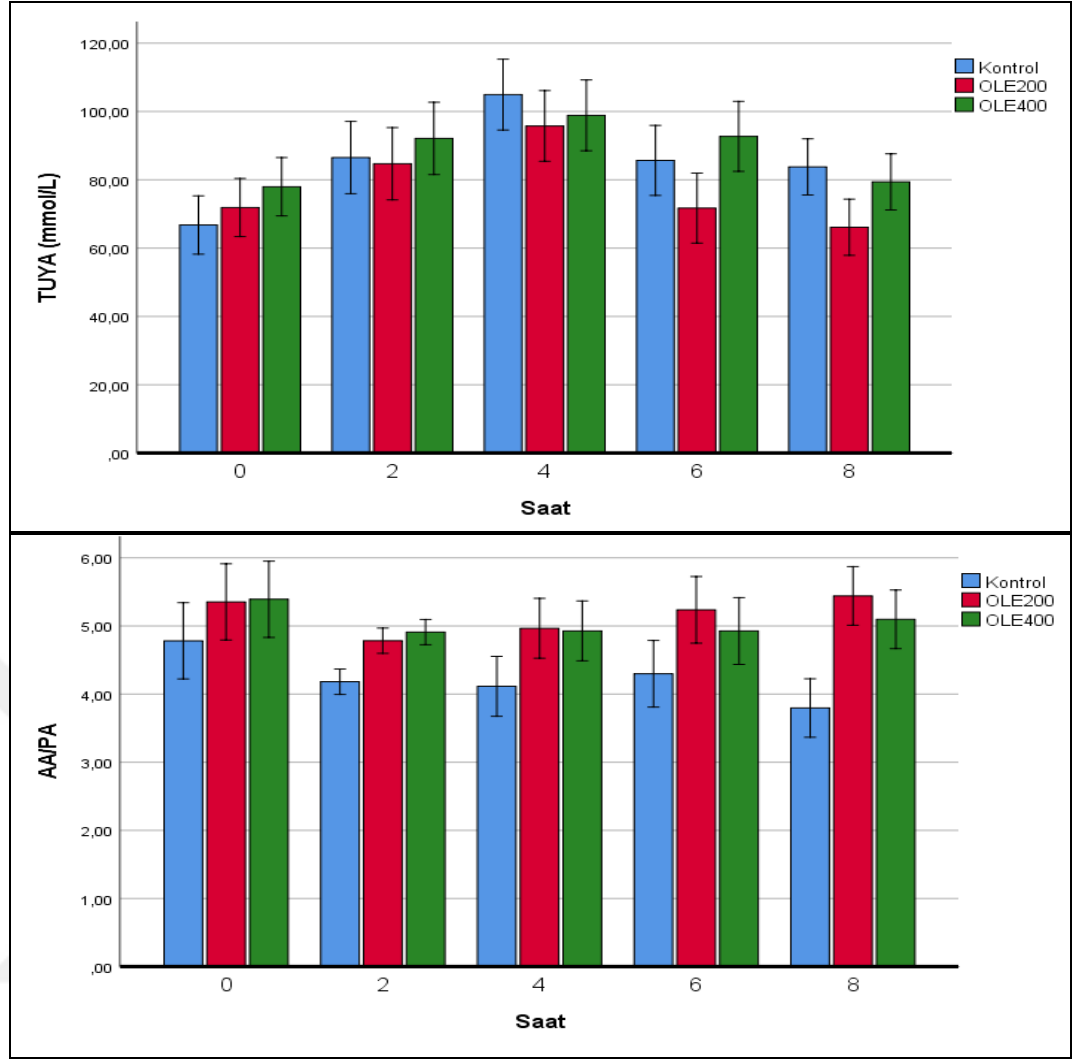
a, b: Satırlarda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0.05$).

Zeytin yaprağı ekstraktının rumen sıvısı UYA (asetik, propiyonik ve bütirik asit) ve TUYA düzeyi ile AA/PA üzerine etkisi önemli düzeyde ($P<0.05$) saptanmıştır. Çizelge 4.9 incelendiğinde; rumen sıvısı asetik asit düzeyi OLE200

ve OLE400 gruplarında kontrol grubu ile benzerlik gösterirken OLE400 muamele grubunda (64.58 mmol/L) OLE200 muamele grubuna (57.78 mmol/L) göre önemli düzeyde ($P<0.05$) artış göstermiştir. Propiyonik asit düzeyine ait değerler incelendiğinde ise muamele gruplarında ortalamalar arasındaki farklılıklar önemli düzeyde ($P<0.05$) olup OLE200 grubunda (11.33 mmol/L) kontrole (14.44 mmol/L) göre propiyonik asit düzeyi önemli düzeyde ($P<0.05$) düşmüş, OLE400 grubu (12.85 mmol/L) ise kontrol grubu ile benzerlik göstermiştir. Yüksek oleuropein dozu (OLE400) rumen sıvısı bütirik asit düzeyinde (10.79 mmol/L), kontrole ve 200 ppm oleuropein dozuna (sırasıyla 8.93 mmol/L ve 8.92 mmol/L) göre önemli düzeyde ($P<0.05$) artışa neden olmuştur. Düşük oleuropein dozuna (OLE200) ait TUYA ortalaması (78.03 mmol/L) kontrol ve OLE400 gruplarına ait TUYA ortalamalarına (sırasıyla 85.53 ve 88.21 mmol/L) göre önemli düzeyde ($P<0.05$) daha düşüktür (Çizelge 4.9). Muamele gruplarında AA/PA bakımından ortalamalar arası farklılıklar önemli düzeyde ($P<0.05$) olup OLE200 (5.16) ve OLE400 (5.05) gruplarında AA/PA kontrole (4.23) göre daha yüksektir.

Çizelge 4.9 incelendiğinde; asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit ve TUYA düzeyi ile AA/PA üzerine saatin etkisi önemlidir ($P<0.05$). Yemlemeden önce (0) ve yemlemeden 2, 4, 6 ve 8 saat sonra alınan rumen sıvısı örneklerinde UYA (asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit) ve TUYA düzeyleri yemlemeden sonra 4. saate kadar artmış daha sonra azalmıştır. Muamele ve saat interaksyonu sadece propiyonik asit ve AA/PA için önemli düzeydedir ($P<0.05$).





Şekil 4.8. Muamele gruplarında saate göre rumen sıvısı UYA ve TUYA düzeyleri ile AA/PA değişimi.

Zeytin yaprağı ekstraktının rumen metabolitlerinden rumen sıvısı $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyi, pH'sı ve protozoa sayısı üzerine etkisini araştırmak amacıyla yemlemeden önce (0) ve yemlemeden 2, 4, 6 ve 8 saat sonra alınan rumen sıvılarında ölçümler yapılmıştır. Bu parametrelere ait bulgular Çizelge 4.10'da verilmiştir. Muamele gruplarında saate göre rumen sıvısı $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyi, pH'sı ve protozoa sayısı değişimi Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. Zeytin yaprağı ekstraktının rumen sıvısı $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyi, pH'sı ve protozoa sayısı üzerine etkisi

Muamele grupları	$\text{NH}_3\text{-N}$ (mg/dL)	pH	Protozoa sayısı ($\times 10^5/\text{mL}$)
Kontrol	14.35 $\pm$ 0.43 ^{ab}	6.84 $\pm$ 0.06	6.57 $\pm$ 0.44
OLE200	13.76 $\pm$ 0.43 ^b	6.93 $\pm$ 0.06	5.47 $\pm$ 0.44
OLE400	15.80 $\pm$ 0.43 ^a	6.73 $\pm$ 0.06	7.09 $\pm$ 0.44
Saat			
0	12.59 $\pm$ 0.21 ^{bc}	7.13 $\pm$ 0.06 ^a	7.08 $\pm$ 0.52
2	19.27 $\pm$ 0.62 ^a	6.74 $\pm$ 0.04 ^{abc}	5.80 $\pm$ 0.63
4	15.65 $\pm$ 0.45 ^{ab}	6.50 $\pm$ 0.05 ^c	5.95 $\pm$ 0.63
6	13.25 $\pm$ 0.32 ^{bc}	6.87 $\pm$ 0.06 ^{abc}	5.93 $\pm$ 0.52
8	12.45 $\pm$ 0.40 ^c	6.94 $\pm$ 0.06 ^a	7.11 $\pm$ 0.69
P değeri			
M	0.038	0.118	0.094
S	<0.001	<0.001	0.349
MxS	0.255	0.001	0.036

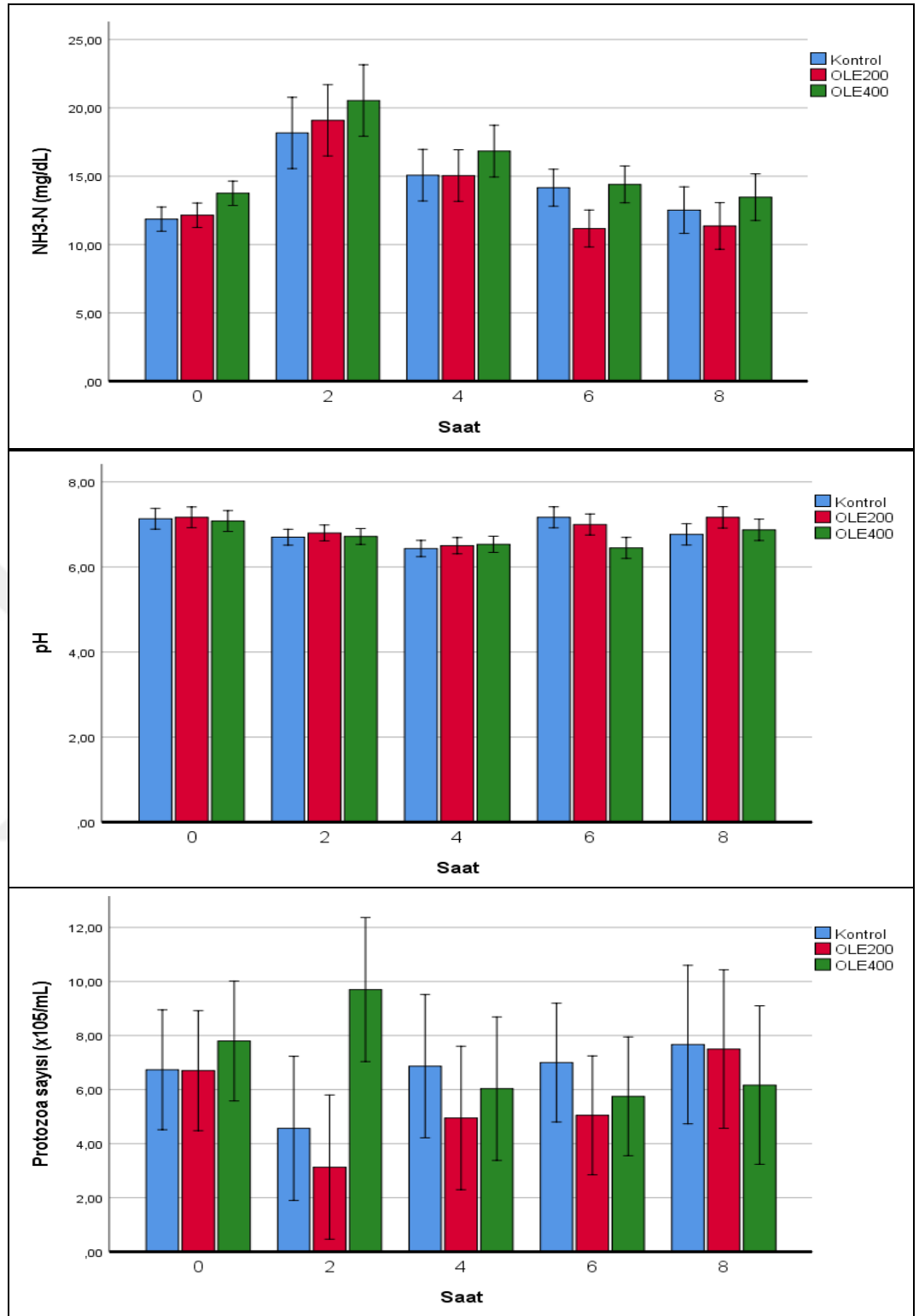
Kontrol: Zeytin yaprağı ekstraktı içermeyen, OLE200: Kontrol yemine 200 ppm düzeyinde oleuropein içerecek şekilde ZYE ilavesi, OLE400: Kontrol yemine 400 ppm düzeyinde oleuropein içerecek şekilde ZYE ilavesiyle oluşturulmuş muamele gruplarıdır.

M: Muamele, S: Saat, MxS: MuamelexSaat

Ortalama $\pm$ standart hata

a-c: Satırlarda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0.05$).

Muamelenin rumen sıvısı $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyi dışında rumen sıvısı pH'sı ve protozoa sayısı üzerine etkisi önemsiz ($P>0.05$) olup muamele gruplarında pH değeri sırasıyla 6.84, 6.93 ve 6.73, protozoa sayısı ise sırasıyla 6.57, 5.47 ve 7.09 $\times 10^5/\text{mL}$ saptanmıştır. Rumen sıvısı $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyi OLE200 grubunda (13.76 mg/dL) OLE400 grubuna (15.80 mg/dL) göre önemli düzeyde ($P<0.05$) düşük saptanırken kontrol (14.35 mg/dL) ile benzerlik göstermiştir. Saatin protozoa sayısı üzerine etkisi önemsiz düzeyde ($P>0.05$) iken $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyi ve pH üzerine etkisi önemlidir ($P<0.05$). Nitekim rumen sıvısı $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyi yemlemeden 2 saat sonra en yüksek değere ulaşmış daha sonra azalmıştır, rumen sıvısı pH değeri ise yemlemeden 4 saat sonra en düşük değere ulaşırken daha sonra artış göstermiştir. Çizelge 4.10 incelendiğinde; MxS interaksiyonunun rumen sıvısı pH değeri ve protozoa sayısı üzerine etkisi önemlidir ($P<0.05$).



Şekil 4.9. Muamele gruplarında saate göre rumen sıvısı NH₃-N düzeyi, pH'sı ve protozoa sayısının değişimi.

4.5 Biyokimyasal, Oksidan ve Antioksidan Parametreler

Zeytin yaprağı ekstraktının biyokimyasal, oksidan ve antioksidan parametreler üzerine etkisini ortaya koymak amacıyla yemleme öncesi (0) ve yemleme sonrası 2. ve 4. saatte hayvanlardan kan örnekleri alınmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktının biyokimyasal parametreler üzerine etkisi Çizelge 4.11, oksidan (MDA ve TOS) ve antioksidan parametreler [TAS, enzimatik (GPx, SOD, CAT) ve enzimatik olmayan (GSH) antioksidanlar] üzerine etkisi Çizelge 4.12’te verilmiştir.

Çizelge 4.11. Zeytin yaprağı ekstraktının biyokimyasal parametreler üzerine etkisi

Muamele grupları	BUN (mg/dL)	Glikoz (mg/dL)	Kolesterol (mg/dL)	Trigliserit (mg/dL)	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)
Kontrol	10.98±1.03	57.94±1.20 ^{ab}	49.74±3.12	27.27±1.82 ^b	6.19±0.25	3.74±0.11
OLE200	11.77±1.03	54.56±1.20 ^b	54.46±3.12	40.24±1.82 ^a	6.30±0.25	3.88±0.11
OLE400	13.78±1.03	63.19±1.20 ^a	57.31±3.12	39.83±1.82 ^a	7.04±0.25	4.19±0.11
Saat						
0	11.26±0.51	57.59±2.01	54.20±2.95	34.79±4.24	6.54±0.46	4.01±0.16
2	12.64±0.84	59.21±1.52	51.67±2.66	40.20±2.45	6.57±0.24	4.01±0.15
4	12.63±0.84	58.89±2.35	55.64±2.36	32.34±2.91	6.42±0.25	3.79±0.09
<i>P</i> değeri						
M	0.220	0.006	0.296	0.004	0.104	0.071
S	0.169	0.870	0.518	0.362	0.957	0.520
MxS	0.434	0.665	0.847	0.940	0.820	0.902

Kontrol: Zeytin yaprağı ekstraktı içermeyen, OLE200: Kontrol yemine 200 ppm düzeyinde oleuropein içerecek şekilde ZYE ilavesi, OLE400: Kontrol yemine 400 ppm düzeyinde oleuropein içerecek şekilde ZYE ilavesiyle oluşturulmuş muamele gruplarıdır.

M: Muamele, S: Saat, MxS: MuamelexSaat

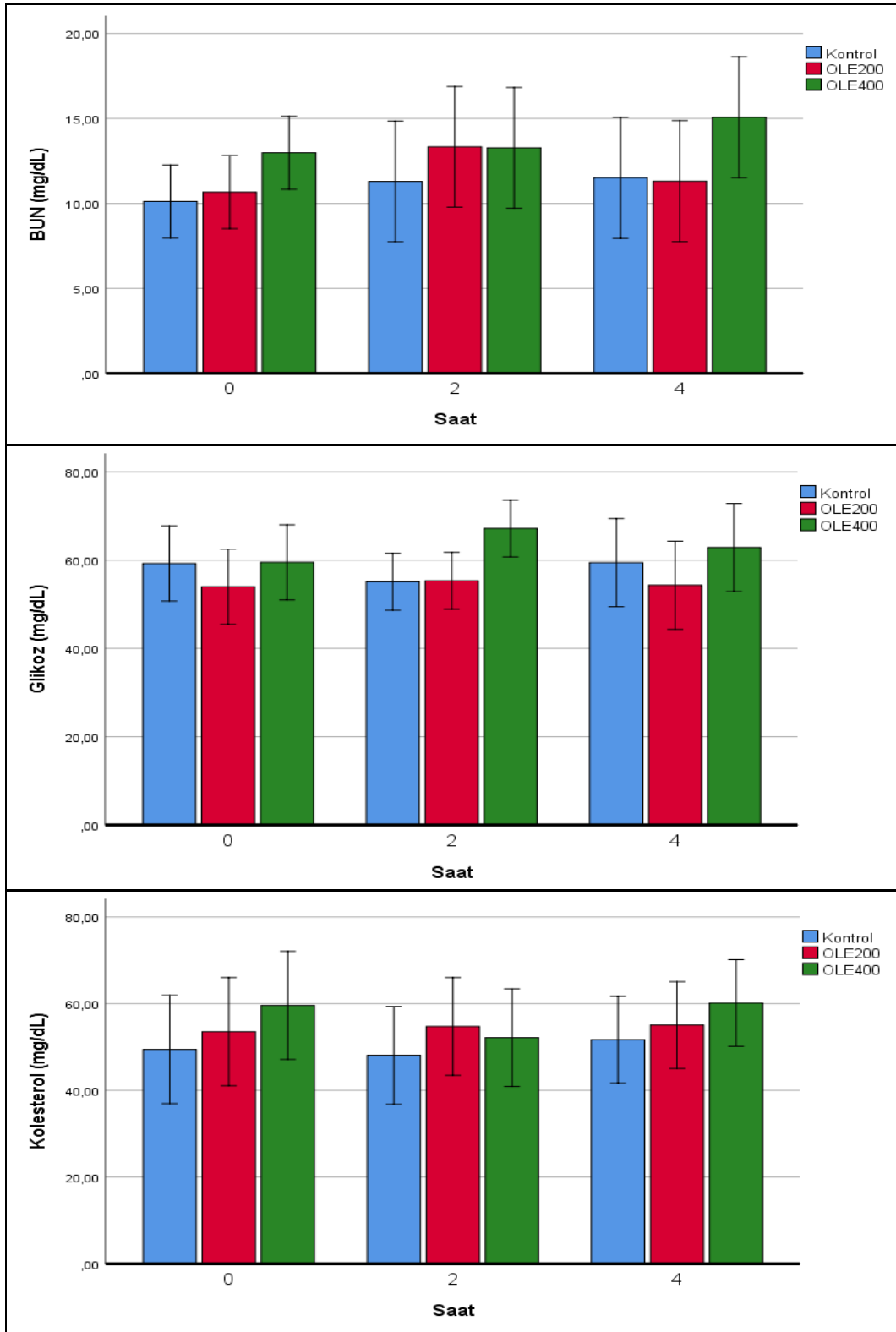
Ortalama±standart hata

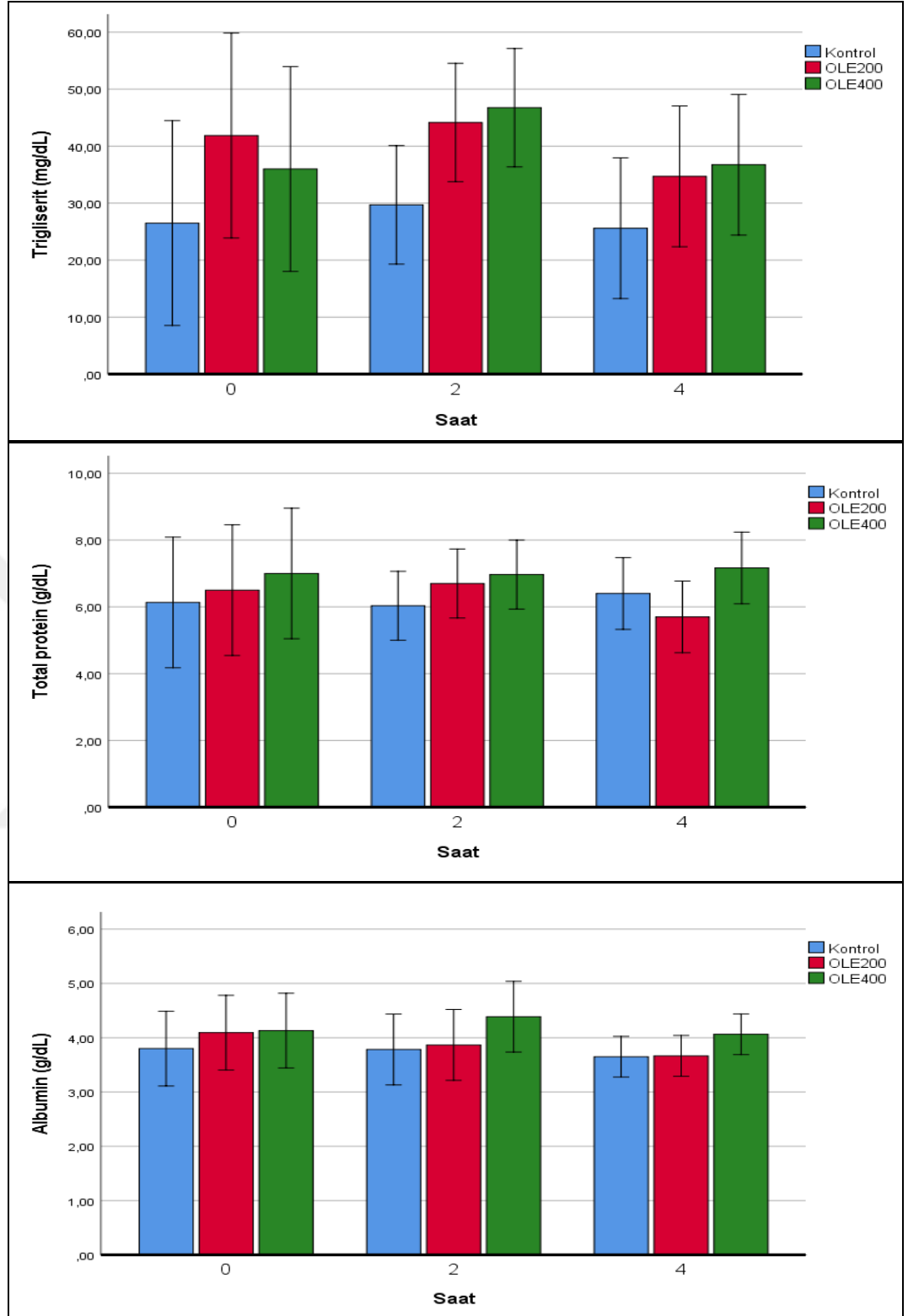
a, b: Satırlarda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0.05$).

Zeytin yaprağı ekstraktının biyokimyasal parametreler üzerine etkisi incelendiğinde; glikoz ve trigliserit parametrelerinin muameleden etkilendiği diğer parametrelerin (BUN, kolesterol, total protein ve albumin) etkilenmediği görülmektedir (Çizelge 4.11). Muamele gruplarında kan glikoz düzeyi ortalamaları sırasıyla 57.94, 54.56 ve 63.19 mg/dL saptanmıştır. Kontrol ile OLE200 ve OLE400 grupları arasında kan glikoz düzeyi açısından benzerlik

saptanırken OLE400 grubu OLE200 grubuna göre kan glikoz düzeyini önemli düzeyde ($P<0.05$) artırmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktı ilavesi ile (OLE200 ve OLE400) kan trigliserit düzeyi (sırasıyla 40.24 ve 39.83 mg/dL) kontrole (27.27 mg/dL) göre önemli düzeyde ($P<0.05$) artmıştır. Çizelge 4.11’de muamelenin BUN, kolesterol, total protein ve albumin düzeyi üzerine etkisi incelendiğinde; muamelenin etkisinin önemsiz ($P>0.05$) olduğu görülmüştür. Nitekim muamele gruplarında BUN düzeyi ortalamaları sırasıyla 10.98, 11.77 ve 13.78 mg/dL, kolesterol düzeyi ortalamaları sırasıyla 49.74, 54.46 ve 57.31 mg/dL, total protein düzeyi ortalamaları sırasıyla 6.19, 6.30 ve 7.04 g/dL ve albumin düzeyi ortalamaları sırasıyla 3.74, 3.88 ve 4.19 g/dL saptanmıştır. Biyokimyasal parametreler üzerine saatin ve MxS interaksiyonunun etkisi önemli değildir ($P>0.05$).

Muamele gruplarında saate göre biyokimyasal parametrelerin değişimi Şekil 4.10’da gösterilmiştir.





Şekil 4.10. Muamele gruplarında saate göre biyokimyasal parametrelerin değişimi.

Çizelge 4.12. Zeytin yaprağı ekstraktının oksidan ve antioksidan parametreler üzerine etkisi

Muamele grupları	MDA (nmol/mL)	TOS (μmol H ₂ O ₂ Equiv/L)	TAS (mmol Trolox Equiv/L)	GPx (U/L)	SOD (U/mL)	CAT (U/mL)	Toplam GSH (μmol/L)
Kontrol	1.83±0.27 ^b	13.04±0.84 ^b	2.42±0.08 ^b	553.71±36.31	18.65±0.77	7.88±0.25	3.58±0.33 ^b
OLE200	3.83±0.27 ^a	11.48±0.84 ^b	3.09±0.08 ^a	468.20±36.31	19.56±0.77	7.70±0.25	5.03±0.33 ^b
OLE400	3.70±0.27 ^a	18.49±0.84 ^a	3.25±0.08 ^a	503.11±36.31	20.38±0.77	7.71±0.25	11.09±0.33 ^a
Saat							
0	3.10±0.25 ^{ab}	11.40±0.89 ^b	3.03±0.08	536.56±31.49 ^a	18.66±0.83	7.77±0.20	6.40±0.33 ^{ab}
2	3.56±0.12 ^a	13.60±0.44 ^b	2.92±0.09	543.91±25.52 ^a	20.30±0.78	7.84±0.25	5.60±0.38 ^b
4	2.71±0.25 ^b	18.01±1.33 ^a	2.80±0.11	444.55±31.72 ^b	19.63±0.48	7.68±0.10	7.70±0.49 ^a
<i>P</i> değeri							
M	0.003	0.002	0.001	0.317	0.350	0.853	<0.001
S	0.022	0.002	0.317	0.033	0.266	0.782	0.017
MxS	0.022	0.005	0.620	0.505	0.052	0.887	0.062

Kontrol: Zeytin yaprağı ekstraktı içermeyen, OLE200: Kontrol yemine 200 ppm düzeyinde oleuropein içerecek şekilde ZYE ilavesi, OLE400: Kontrol yemine 400 ppm düzeyinde oleuropein içerecek şekilde ZYE ilavesiyle oluşturulmuş muamele gruplarıdır.

M: Muamele, S: Saat, MxS: MuamelexSaat

Ortalama±standart hata

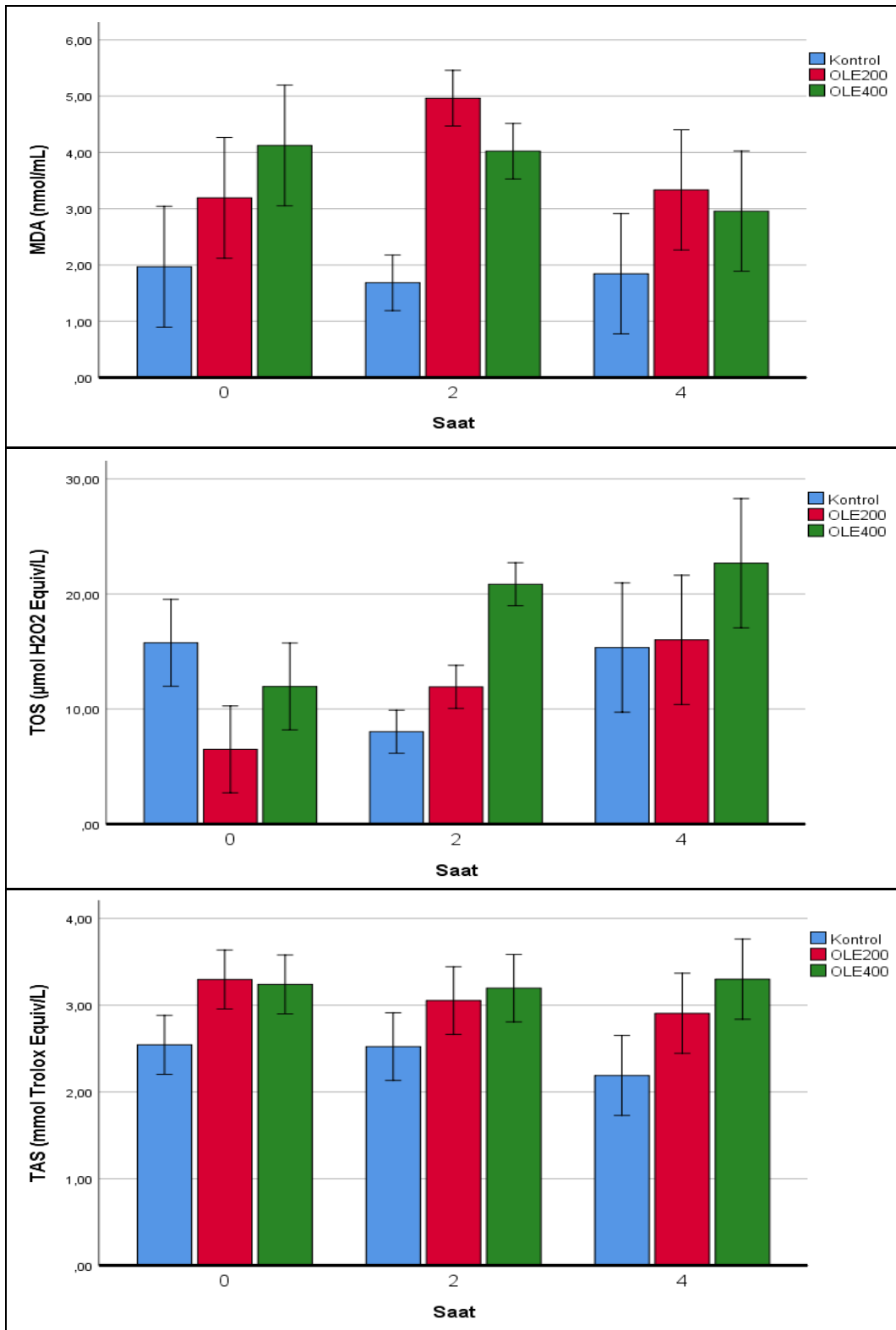
a, b: Sütunlarda farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P<0.05$).

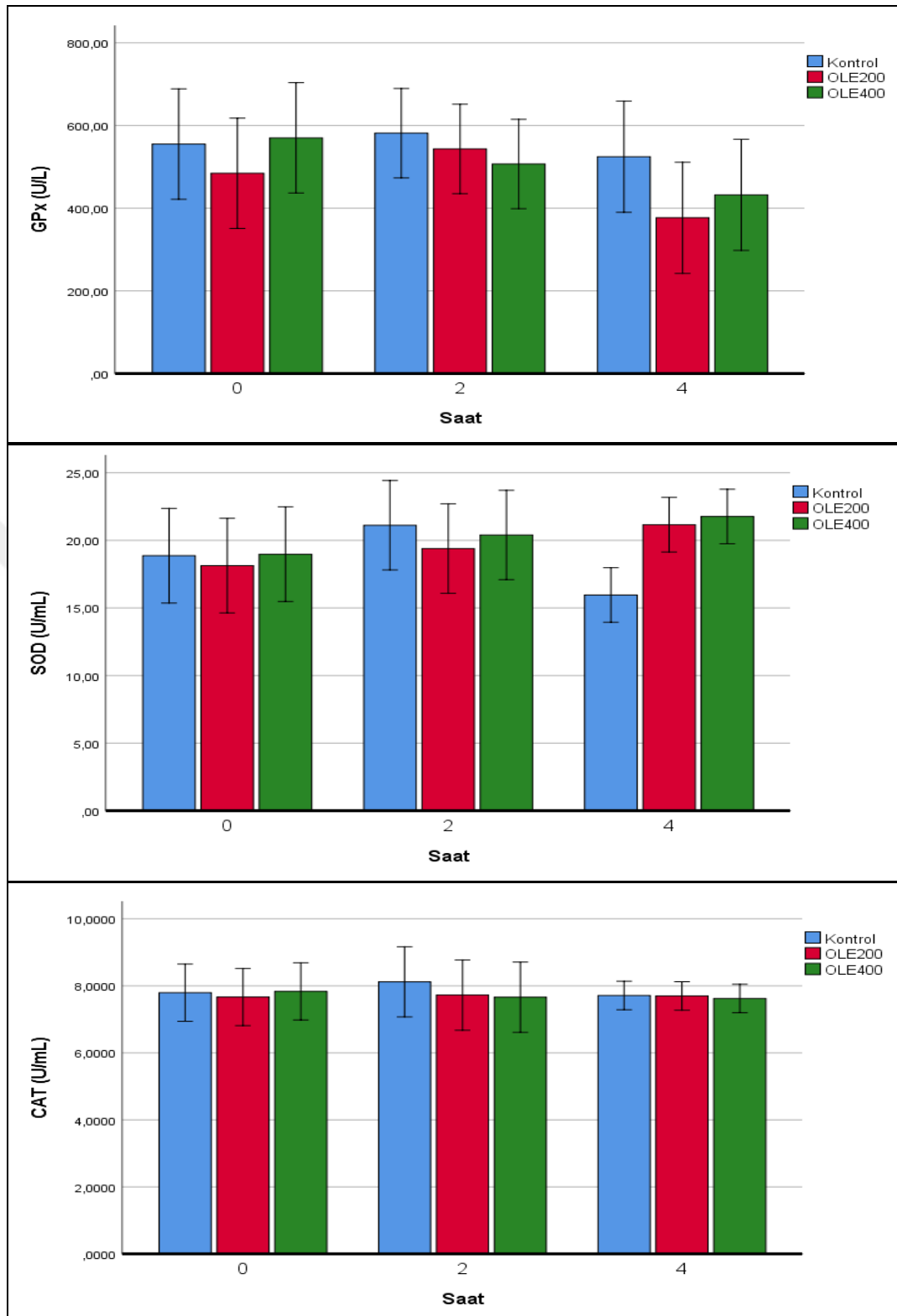
Muamelenin oksidan parametreler (MDA ve TOS) üzerine etkisi önemli düzeyde ($P<0.05$) saptanmıştır. Kontrol grubuna ait MDA ortalaması 1.83 nmol/mL iken OLE200 ve OLE400 gruplarına ait ortalamalar ise sırasıyla; 3.83 nmol/mL ve 3.70 nmol/mL ile kontrol grubu ortalamasından önemli düzeyde ($P<0.05$) yüksektir (Çizelge 4.12). Elde edilen bulgulara göre 400 ppm oleuropein dozu kontrol grubu ve 200 ppm oleuropein dozuna göre serum TOS düzeyinde önemli düzeyde ($P<0.05$) artışa neden olmuştur. Nitekim OLE400 grubunda TOS ortalama 18.49 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L düzeyinde iken ile kontrol ve OLE200 gruplarında sırasıyla ortalama 13.04 ve 11.48 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L düzeyindedir.

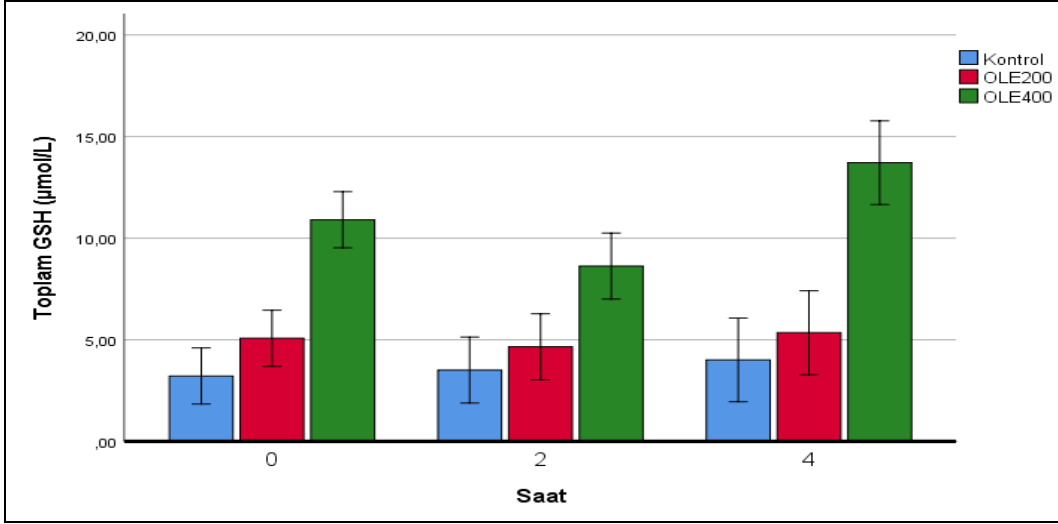
Muamelenin antioksidan parametrelerden GPx, SOD ve CAT üzerine etkisi önemsiz düzeyde ($P>0.05$), TAS ve toplam GSH parametresi üzerine etkisi ise önemli düzeyde ($P<0.05$) saptanmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktı ilavesi ile (OLE200 ve OLE400) TAS düzeyi (sırasıyla 3.09 ve 3.25 mmol Trolox Equiv/L) kontrole (2.42 mmol Trolox Equiv/L) göre önemli düzeyde ($P<0.05$) artmıştır. Kontrol, OLE200 ve OLE400 gruplarında GPx düzeyi ortalamaları sırasıyla 553.71, 468.20 ve 503.11 U/L; SOD düzeyi ortalamaları 18.65, 19.56 ve 20.38 U/mL ve CAT düzeyi ortalamaları ise 7.88, 7.70 ve 7.71 U/mL olarak belirlenmiştir. En yüksek dozda ZYE ilavesi (OLE400) toplam GSH düzeyini (11.09 $\mu\text{mol/L}$) kontrol (3.58 $\mu\text{mol/L}$) ve OLE200 (5.03 $\mu\text{mol/L}$) grubuna göre önemli düzeyde ($P<0.05$) artırmıştır.

Kan örneklerinin alım saatleri dikkate alındığında kan MDA, TOS, GPx ve toplam GSH düzeyi üzerine saatin etkisi önemli ($P<0.05$) iken TAS, SOD ve CAT üzerine etkisi önemli değildir ($P>0.05$). Yemlemeden 4 saat sonra TOS düzeyi en yüksek, GPx düzeyi ise en düşük değere ulaşmıştır. İnteraksiyon (MxS) etkisi sadece kan MDA ve TOS parametreleri üzerinde önemlidir.

Muamele gruplarında saate göre, yemlemeden önce (0) ve yemlemeden 2 ve 4 saat sonra, oksidan (MDA ve TOS) ve antioksidan [TAS, enzimatik (GPx, SOD, CAT) ve enzimatik olmayan (GSH) antioksidanlar] parametrelerin değişimi Şekil 4.11'de gösterilmiştir.







Şekil 4.11. Muamele gruplarında saate göre oksidan ve antioksidan parametrelerin değişimi.

5. TARTIŞMA

5.1 Zeytin Yapağı Ekstraktının Oleuropein ve Toplam Fenolik Madde İçeriği ile Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitesi

Oleuropein, zeytin yapağı ekstraktının ana etken fenolik madde bileşiğidir. Bu çalışmada etanol ekstraksiyonu ile elde edilen ZYE'nin oleuropein içeriği 220.30 mg/g belirlenmiştir. Benzer yöntemle elde edilen ZYE'nin oleuropein içeriği bir başka çalışmada (Coppa et al., 2017) 180 mg/g; solvent olarak metanolun kullanıldığı diğer çalışmalarda (Le Tutour and Guedon, 1992; Şahin vd., 2018) ise sırasıyla 190 mg/g ve 210 mg/g olarak saptanmış olmakla birlikte bu çalışmadan elde edilen bulgular ile uyumludur.

Bu çalışmada kullanılan ZYE'nin toplam fenolik madde içeriği 177.28 mg GAE/g saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.1). Elde edilen bu bulgu, Aytül (2010) tarafından etanol-su (%70 etanol) ekstraksiyonu ile elde edilen ZYE için bildirilen toplam fenolik madde içeriğinden (197.42 mg GAE/g) düşük, Aktaş (2012)'ın etanol ve Lins et al. (2018)'un metanol-su (%80 metanol) ekstraksiyonu ile edilen ZYE için bildirdikleri toplam fenolik madde içeriğinden (sırasıyla 141.74 ve 131.7 mg GAE/g) yüksektir.

Zeytin yapağı veya ekstraktının oleuropein ve toplam fenolik madde içeriğinin yapağın toplandığı hasat zamanına (Blasi et al., 2016), zeytinin orijinine (Nicolini et al., 2019), yapağın kurutulma yöntemine (Afaneh et al., 2015) ekstraksiyon yöntemine (Žuntar et al., 2019; Lama-Muñoz et al., 2020) ve ekstraksiyonda kullanılan solvente (çeşidi, oranları, sıcaklığı ve pH'sı) göre (Yateem et al., 2014) değiştiği bildirilmektedir. Nitekim Blasi et al. (2016) farklı hasat zamanına (aralık, mart, haziran ve eylül) ve farklı zeytin çeşidine (Dolce Agogia, Moraiolo, Leccino ve Frantoio) göre ZYE'nin oleuropein içeriğinin 9.7-91.8 mg/g ve toplam fenolik madde içeriğinin 40.9-66.6 mg GAE/g, Lama-Muñoz et al. (2020) farklı çeşitlerde (Arbequina, Picual ve Royal) farklı ekstraksiyon yöntemlerine (basınçlı sıvı ekstraksiyon ve solvent ekstraksiyonu) göre oleuropein içeriğinin 43.4-122.3 mg/g; Afaneh et al., (2015) farklı kurutma yöntemleri (ortam sıcaklığı ve etüv) ile solvent oranlarına (%80 etanol:%20 su ve %20

asetonitril:%80 su) göre oleuropein içeriğinin sırasıyla 1.7-10.0 mg/g ve 15.6-19.0 mg/g arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Antioksidan aktiviteyi ölçmek için oksijen radikal absorbans kapasite (ORAC), toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre (TRAP), demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP), oksidan olarak bakır (II) kullanan toplam antioksidan potansiyel yöntemi (CUPRAC) gibi birçok yöntem kullanılmakla birlikte DPPH ve TEAC yöntemi bitkilerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinden en yaygın kullanılan yöntemlerdir (Albayrak vd., 2010). Bu çalışmada ZYE'nin antioksidan aktivitesi DPPH ve TEAC yöntemine göre belirlenmiştir. Bu yöntemlere göre ZYE'nin antioksidan aktivitesi sırasıyla %84.89 ve 12.13 g/100 g saptanmıştır. Farklı yerli zeytin çeşitlerine (Gemlik, Sarı Ulak, Topak Aşı, Akdeniz Yerli ve Yağlık) ait yaprakların DDPH yöntemine göre antioksidan aktivitesinin belirlendiği bir çalışmada (Akbaş, 2017) DPPH antioksidan aktivite %81.0-83.2 değişim göstermiştir. Bu çalışmada ZYE için belirlenen %84.89 DDPH antioksidan aktivite Aktaş (2017)'ın bildirimi ile uyumludur. Bir diğer yöntem (TEAC) göre ZYE'nin belirlenen antioksidan aktivitesi (12.13 g/100g) ise Lins et al. (2018)'nın bildirisi (14.8 g/100g) ile uyumlu iken Hayes et al. (2011)'nin bildirışinden (37.93 g/100g) düşüktür. Zeytin yaprağı veya ekstraktının antioksidan aktivitesi, oleuropein ve fenolik madde içeriğinde olduğu gibi, birçok faktöre bağlı olarak değişim göstermektedir. Nitekim yaprakların kurutulma yönteminin, hasat zamanının, ekstraksiyonda kullanılan solvent türünün ve ZYE'nin fenolik madde içeriğinin antioksidan aktivite üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Brahmi et al., 2015; Akbaş, 2017; Žuntar et al., 2019). Bununla birlikte ZYE'de bulunan fenolik bileşiklerin arasında sinerjik etkinin olduğu dolayısıyla ekstrakt kullanımının serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarların engellenmesinde daha etkili olduğu bildirilmiştir (Žuntar et al., 2019).

Bu çalışmada disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemine göre test mikroorganizmalarına karşı ZYE'nin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ortaya konmuştur. Her iki yöntemde ZYE, 29 mm inhibisyon zon çapı ve 0.375 mg/mL MİK değeri ile *S. aureus*'a karşı en yüksek; 8.5 mm inhibisyon zon çapı ve 1.5 mg/mL MİK değeri ile *E. faecalis*'e karşı en düşük antimikrobiyal aktivite

göstermiştir (Bkz. Çizelge 4.2-4.3). Farklı konsantrasyonlarda da olsa (1.5 - 0.375 mg/mL) ZYE'nin tüm test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Zeytin yaprağı ekstraktının veya ana etken bileşiği oleuropeinin geniş ölçüde gram pozitif bakteri (*S. aureus*) gram negatif bakteri (*P. aeruginosa*, *E. coli*) ve mantar türleri (*C. albicans*) üzerinde güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Hassan Ali et al., 2011). Malik (2015) tarafından iki farklı yönteme (disk difüzyon ve MİK) göre *S. aureus* üzerinde zeytin yaprağı ve roka (*Eruca sativaa*) çekirdeği metanol ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış, 6.3 mm inhibisyon zon çapı ve 80 µg/mL MİK değeri ile ZYE'nin roka çekirdeği ekstraktına göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği ortaya konmuştur. Fesleğen, zeytin yaprağı, okaliptüs ve limon otu metanol ekstraktının *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. typhi* ve *C. albican* üzerine antimikrobiyal aktivitesinin disk difüzyon yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada (Zehra et al., 2016) ZYE'nin *S. aureus* (25 mm), *E. faecalis* (25 mm), *E. coli* (22 mm), *B. subtilis* (20 mm), *K. pneumoniae* (30 mm), *S. typhi* (30 mm) ve *C. albicans* (18 mm) üzerinde diğer ekstraktlara göre daha güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

5.2 In Vitro Besin Madde Sindirilebilirliği

In vitro denemeden elde edilen bulgulara göre yonca kuru otu, ATK ve arpa *in vitro* besin madde sindirilebilirliği artan dozlarda ZYE ilavesinden önemli düzeyde etkilenmiştir. Yonca kuru otu KMS, OMS ve NDFS artan dozlarda ZYE ilavesiyle önemli düzeyde düşmüştür. Bu düşüş ZYE'nin artan dozuna bağlı olmamakla birlikte dalgalanmalar şeklindedir (Bkz. Çizelge 4.4). Ayçiçeği tohumu küspesinin KMS, HPS ve OMS artan dozlarda ZYE ilavesi ile düşmekle birlikte özellikle 200 ppm oleuropein dozundan sonra düşüş belirgindir (Bkz. Çizelge 4.5). Kesif yem kaynağı olarak kullanılan arpanın KMS ve OMS 200 ppm oleuropein dozunda kontrole göre önemli düzeyde artarken 200 ppm sonrası önemli düzeyde düşmüş ve en yüksek düşüş 400 ppm dozunda görülmüştür.

Bu tez çalışmasında ZYE, oleuropein içeriği baz alınarak rumen sıvısı ya da kesif yeme ilave edilmiştir. Birçok çalışmada etken madde içeriği dikkate

alınmadan kullanılan katkıları direk ilave edilmekte ve elde edilen bulguların tartışılmasında karışıklıklara neden olmaktadır. Bazı çalışmalarda (Oskoueian et al., 2013; Biricik vd., 2016) ise etken maddeler direkt kullanılmıştır. Ancak bu ürünlerin içermiş oldukları fenolik madde bileşiklerinin bir aradaki sinerjik etkilerini de göz ardı etmemek gerekir. Dolayısıyla bu tez çalışmasında ZYE'nin saptanan ana etken madde (oleuropein) içeriği üzerinden artan dozlarda kullanımına gidilmiştir.

Farklı fitokimyasalların *in vitro* besin madde sindirilebilirliği üzerine etkilerinin araştırıldığı bazı çalışmalarda (Canbolat vd., 2011; Kamalak vd., 2011; Şahan, 2012), bu çalışmada olduğu gibi, substrat olarak kaba yem ve kesif yem tek kullanılırken bazı çalışmalarda ise kaba ve kesif yem karışım halinde (TMR) kullanılmıştır. Şahan (2012) tarafından substrat olarak buğday samanı, soya küspesi ve arpanın kullanıldığı *in vitro* bir çalışmada, biberiye uçucu yağının 50 ppm'lik dozunun buğday samanı KMS, OMS ve NDFS'ni düşürdüğü; tarçın, portakal kabuğu, anason ve sarımsak uçucu yağlarının ise artırdığı ortaya konmuştur. Aynı araştırmacı soya küspesinin KMS ve OMS'nin çörekotu, defne, kişniş, sarımsak ve üzüm çekirdeği uçucu yağlarının artan dozlarıyla (50, 100, 150 ppm); HPS'nin ise, çörekotu uçucu yağının 100 ppm, ığde uçucu yağının 50 ppm ve defne yağının 150 ppm dozlarıyla önemli düzeyde düştüğünü bildirmiştir. Substrat olarak kaba:kesif (50:50) yemin ve farklı bir sindirilebilirlik yönteminin (RUSITEC) kullanıldığı bir diğer çalışmada (Öztürk vd., 2012) ZYE'nin OMS üzerine etkisinin önemsiz olduğu bildirilmiştir. Sarımsak uçucu yağının kullanıldığı *in vitro* bir çalışmada kaba yem ağırlıklı TMR'ın NDF sindirilebilirliğinin sarımsak uçucu yağının artan dozlarıyla (33 µg/mL, 66 µg/mL ve 100 µg/mL) önemli düzeyde düştüğü saptanmıştır (Anassori et al., 2012). Ankom Daisy *in vitro* fermentasyon sisteminin kullanıldığı bir çalışmada (Martinez et al., 2006), iki farklı kekik (*T. hyemalis* L. ve *T. zygis* subsp. *gracilis*) türünden elde edilen uçucu yağların 1.35 µL/mL dozunda kullanımının arpa ve yonca kuru otu karışımının (70:30) besin madde sindirilebilirliği üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda iki farklı kekik uçucu yağının rumen mikroorganizmaları üzerine seçici olmayan güçlü antimikrobiyal etkisine bağlı olarak *in vitro* KM, HP ve NDF sindirilebilirliğinin önemli düzeyde düştüğü ortaya konmuştur. Benzer şekilde KM, OM, HP ve HS sindirilebilirliğinin

belirlenmesi amacıyla 60:40 kaba:kesif yem içerikli rasyona *Pinus merkusii*, *Cymbopogon nardus* ve *Melaleuca leucadendra* uçucu yağların artan dozlarda (100, 200, 400 ve 800 mg/L) ilavesinin KM, OM ve HS sindirilebilirliğini önemli düzeyde düşürdüğü saptanmıştır (Kurniawati et al., 2018).

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular değerlendirildiğinde yonca kuru otu KMS, OMS, NDFS'deki düşüş ZYE'nin içerdiği oleuropein ve diğer fenolik bileşiklerin rumen mikroorganizmaları üzerindeki toksik veya mikroorganizmaların gelişimlerini inhibe edici etkisine (Delgado-Pertíñez et al., 2000; Martín-García et al., 2003) bağlı olarak sindirilebilirliği olumsuz etkilemesi ile ilişkili olabilir. Nitekim antimikrobiyal aktivite gösteren fenolik bileşiklerin doza bağlı olarak rumen mikroorganizmalarının aktivitesini olumlu veya olumsuz yönde değiştirebileceği bildirilmiştir (Kurniawati et al., 2018). Rumende protein kaynaklarının parçalanabilirliğinin düşük olması yem proteinlerinden daha fazla yararlanılabilmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada, protein kaynağı ATK'nın sindirilebilirliği, özellikle 200 ppm oleuropein dozunun üzerinde belirgin olmakla birlikte ZYE ilavesi ile düşmüştür. Bu bağlamda *in vivo* denemede kırılmanın olduğu 200 ppm dozu ile en yüksek dozun (400 ppm) kullanılmasının uygun olacağı değerlendirilmiştir. Kullanılan fitokimyasallara göre protein sindirilebilirliğinin farklılık gösterdiği bunun da substrat olarak kullanılan yeme veya kaba:kesif yem oranına göre değişebileceği bildirilmiştir (Molero et al., 2004). Zeytin yaprağı ekstraktının arpa KMS ve OMS üzerine etkisini değerlendirdiğimizde; 200 ppm'in üzerinde düşüşler gözlenmiştir. Bu yöndeki etki nişasta sindiren bakterilerin ZYE'nin artan dozlarından etkilenmiş olabileceği şeklinde açıklanabilir. Arpa gibi rumende parçalanabilirliği yüksek olan yem hammaddelerinin rumende sindirilebilirliğinin ve parçalanabilirliğinin düşmesi rumen pH'sının kontrolü için önemlidir. Ruminant rasyonlarında yüksek düzeyde kesif yem kullanılması durumunda asidoz riski oluşmakta ve performansta düşüşler görülmektedir (Qadis et al., 2014). Rumende parçalanma hızının düşürülmesi açısından ZYE'nin artan dozunun (200 ppm üzeri) denenmesi olumsuzlukları ortadan kaldıracaktır. Bu çalışmada *in vitro* besin madde sindirilebilirliğinin belirlendiği inkübasyon sıvılarında pH değeri 24 ve 48. saatlerde ZYE'nin artan dozlarda ilavesiyle önemli düzeyde düşmüştür. Her ne kadar bu çalışmada ZYE'nin artan dozlarda ilavesi ile inkübasyon sıvısı pH'sı

6.54'e kadar düşmüş olsada bu düşük pH değeri selülotik bakterilerin fonksiyonunu yerine getirememelerinden dolayı NDF sindirilebilirliği olumsuz etkilenmiş olabilir. Nitekim Eryavuz ve Dehority (2004) tarafından rumen pH değerinin lif sindirimini etkilediği ve 6.4'ün altındaki rumen pH değerinin selüloz sindirimini düşürdüğü, rumen pH'sının 5.9'un altına indiğinde ise selülotik bakterilerin gelişiminin durduğu ortaya konmuştur.

Yapılan bu *in vitro* çalışmada artan dozda ZYE ilavesi substrat olarak kullanılan kesif yemler (ATK ve arpa) üzerinde olumlu yönde etkili olurken ZYE'nin kaba yem kaynağı olan yonca kuru otu üzerindeki etkisi olumsuzdur.

5.3 *In Vivo* Besin Madde Sindirilebilirliği

In vivo denemede *in vitro* denemenin sonuçları doğrultusunda seçilen iki farklı dozda (200 ve 400 ppm) ZYE'nin 60:40 oranında kaba ve kesif yem karışımıyla beslenen koyunların yemlerine rumen sıvısı miktarı baz alınarak ilavesinin KM, OM, HP, HY, HS, NDF ve ADF sindirilebilirliği üzerine etkisi araştırılmıştır. Kaba ve kesif yem karışımına ilave edilen ZYE'nin KM, OM, HS, NDF ve ADF sindirilebilirliği üzerine etkisi önemsiz, HP ve HY sindirilebilirliği üzerine etkisi ise önemlidir. Nitekim HP sindirilme derecesi OLE200 ve OLE400 grubunda, HY sindirilme derecesi ise OLE400 grubunda önemli düzeyde düşmüştür (Bkz. Çizelge 4.8). Zeytin yaprağı ekstraktının koyunlarda *in vivo* besin madde sindirilebilirliği üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalar bulunmadığından bu çalışmadan elde edilen bulgular diğer bazı fitokimyasalların ruminantlarda kullanıldığı çalışmalardan elde edilen bulgularla tartışılmıştır. Kumar et al. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada keçi rasyonlarına günlük KM tüketiminin %0.4 düzeyinde çay tohumu saponin ekstraktı ve %2.6 düzeyinde çay tohumu ilavesinin 21 gün sonra her iki muamele grubunda HY sindirilme derecesini önemli düzeyde düşürürken KM, HP, NDF ve ADF sindirilme derecesini etkilemediği ortaya konmuştur. Yapılan başka bir çalışmada ise 30:70 kaba:kesif yem içeren kuzu rasyonlarına %3 düzeyinde ilave edilen nane (%37.69 L-mentol ve %21.79 menton) ve kekiğin (%49.72 timol ve %50 karvakrol) yemin besin madde sindirilebilirliğini etkilemediği bildirilmiştir (Khamisabadi et al., 2016). Rumen kanüllü ve 50:50 kaba:kesif yemle beslenen koyunlarla yürütülen

bir çalışmada (Khateri et al., 2017) yeme 0.8 ve 1.6 mL/gün/hayvan düzeylerinde ilave edilen uçucu yağ karışımının (kekik, tarçın ve karanfil uçucu yağ) KM, OM, HP ve NDF sindirilebilirliğini önemli düzeyde etkilemediği ortaya konmuştur. Fitokimyasalların kullanıldığı *in vivo* çalışmalar arasındaki farklı bulgular rasyon içeriği, fitokimyasalların türü ve hayvanın kullanılan fitokimyasallara adaptasyonu ile ilişkilendirilebilir. Fitokimyasalların etkisinin araştırıldığı çalışmalarda farklı bulguların elde edilmesinde bir diğer faktör dozdur. Nitekim Calsamiglia et al. (2007) tarafından kullanılan fitokimyasalların uygun dozunun belirlenmesi ile rumen fermentasyonu manüplasyonunun sağlanabileceği bildirilmiştir.

In vitro besin madde sindirilebilirliği bulguları baz alınarak yürütülen *in vivo* denemede *in vitro* denemeden farklı sonuçlar elde edilmiştir. *In vivo* rumen ortamı *in vitro*'ya göre daha komplekstir ve söz konusu fitokimyasallar *in vivo* rumen ortamında bazı rumen mikroorganizmalarının gelişimini inhibe ederek rumen pH'sının düşmesini engelleyebilir ve besin madde sindirilebilirliğini iyileştirebilirler (Martinez et al., 2006). Ayrıca bu çalışmada elde edilen farklı bulgular statik *in vitro* koşullar ve dinamik canlı hayvan ve ortam koşullarının ciddi farklılığına bağlanabilir.

5.4 Rumen Metabolitleri

Koyun rasyonlarına ilave edilen ZYE'nin rumen metabolitleri üzerine etkisinin araştırıldığı *in vivo* denemede; rumen sıvısı UYA ve TUYA düzeyi ile AA/AP üzerine muamelenin etkisi önemlidir. İki farklı dozda ZYE ilavesi kontrole göre rumen sıvısı asetik asit düzeyini önemli düzeyde etkilemezken iki doz arasındaki farklılıklar önemli düzeydedir. Rasyona 200 ppm oleuropein olacak şekilde ZYE (OLE200) ilavesi rumen sıvısı propiyonik asit düzeyini kontrol grubuna göre önemli düzeyde düşürürken 400 ppm oleuropein olacak şekilde ZYE (OLE400) ilavesi farklılığa neden olmamıştır. Rasyonda 400 ppm oleuropein, 200 ppm oleuropeine ve ZYE ekstraktı içermeyen kontrol grubuna göre rumen sıvısı bütirik asit düzeyinde artışa ($P<0.05$) neden olmuştur. Muamelenin rumen sıvısı TUYA düzeyi üzerine etkisi önemli olmakla birlikte 200 ppm düzeyinde oleuropein düşüşe neden olurken 400 ppm oleuropein ise

kontrol ile benzerlik göstermiştir. İki farklı dozda ZYE kullanımı (OLE200 ve OLE400) asetik asit ve propiyonik asit oranlarına göre hesaplanan AA/PA kontrole göre önemli düzeyde artırmıştır (Bkz. Çizelge 4.9).

Fitokimyasalların rumen sıvısı UYA üzerine etkisinin araştırıldığı *in vivo* çalışmaların bazılarında söz konusu katkıların UYA düzeyini etkilemediği bildirilirken (Yang et al., 2010; Vakili et al., 2013; Yeşilbağ vd., 2016) bazı çalışmalarda ise artırdığı (Chaves et al., 2008; Wang et al., 2009) bildirilmektedir. Bu çalışmadan elde edilen bulgulardan farklı olarak Yeşilbağ vd. (2016) keçi besi yemine ilave edilen ardıç uçucu yağının (0.4, 0.8 ve 2 mL/kg) asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit ve TUYA düzeyini etkilemediğini, Chaves et al. (2008), kuzu yemlerine karvakrol ve sinnamaldehid (0.2 g/kg, KM) ilavesinin TUYA düzeyini artırdığını, asetik asit, propiyonik asit ve AA/PA etkilemediğini bildirmişlerdir. Gaz üretim tekniğinin kullanıldığı *in vitro* bir çalışmada ise kaba:kesif (60:40) yem karışımına 9 mg ilave edilen flavonoidlerden (flavon, mirisetin, naringin, kateşin, rutin, quersetin ve kampferolin) flavon ve mirisetinin asetik ve propiyonik asit düzeyini düşürdüğü bütirik asit düzeyini artırdığı fakat AA/PA etkilemediği, rutin ve quersetinin ise AA/PA artırdığı bildirilmiştir (Oskoueian et al., 2013). Canbolat vd. (2010) *in vitro* çalışmalarında rumen sıvısına artan dozlarda (50, 100, 200, 400, 600 ve 800 mg/L) kekik uçucu yağ ilavesiyle rumen mikroorganizmalarının etkinliğinin düşmesine bağlı olarak UYA (asetik, propiyonik ve bütirik asit) ve TUYA düzeyinin düştüğünü bildirmiştir. Farklı uçucu yağlar ile çalışılan bir diğer *in vitro* bir çalışmada ise kesif yem ağırlıklı (%90) besi yemine 500 mg/L biberiye, adaçayı, karanfil yaprağı uçucu yağları ilavesi propiyonik asit düzeyinde artışa, asetik asit düzeyi ve AA/PA düşüşe neden olarak rumen UYA profilini olumlu etkilemiştir (Castillejos et al., 2008). Bunu başarmak yem enerjisinin ruminant tarafından daha verimli (rumendeki UYA profilini hayvanın lehine çevirerek) kullanılmasını sağlayacaktır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular doğrultusunda ZYE rumendeki bakteriyel flora üzerinde seçici bir aktivite göstermeden gram pozitif ve gram negatif bakterileri baskılayarak UYA profilini olumsuz etkilemiş olabileceği söylenebilir.

Bu çalışmada ZYE'nin rumen metabolitlerinden pH ve protozoa sayısı üzerine etkisi önemli düzeyde değildir (Bkz. Çizelge 4.10). Bu çalışmadan elde

edilen bulgu ile benzer olarak Vakili et al. (2013) buzağılarda 5 g/gün kekik ve tarçın uçucu yağının; Aazami et al. (2013) koyun rasyonlarına ilave edilen saponinin (100 ve 200 mg/kg KM) rumen pH'sını değiştirmedığını bildirmiştir. Rumen pH'sı rasyonun bileşimine, yemin tüketim hızına, yeme ilave edilen fitokimyasalların çeşidine ve dozuna bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte (Hernández et al., 2014), yemlemeden önce en yüksek ve yemlemeden sonra (en az 2 ila 5 saat sonra) en düşük değerlerde olduğu bildirilmektedir (Bargo et al., 2002). Bu çalışmada da yemlemeden 4 saat sonra rumen pH'sı en düşük değerlerdedir.

Fitokimyasalların antiprotozoal etkileri; protozoaların hücre membranlarındaki kolesterol ile reaksiyona girip protozoanın hücre bütünlüğünün bozulması ve ölümle sonuçlanması şeklinde açıklanmaktadır (Cheeke, 2001). Yapılan çalışmalar rumen protozoalarının faydaları yanında sayılarında azalmanın bakteri popülasyonunun artmasına bağlı olarak rumen fermentasyonunu olumlu yönde etkileyebileceğini göstermiştir (Siew, 1997). Bu çalışmada ZYE ilaveli gruplarda protozoa sayısı kontrol grubu ile benzerlik göstermiştir. Elde edilen bu bulguya benzer olarak McIntosh et al. (2003), süt sığırları rasyonlarına 1000 mg/gün ticari uçucu yağ karışımı (timol, eugenol, vanilin ve limonen) ilavesinin; Eryavuz vd. (2015) erkek toklu rasyonlarına günlük 500 mg/kg ile üç günde bir 1500 mg/kg düzeylerinde ilave edilen *Yucca schidigera* tozunun protozoal aktivite üzerinde etkili olmadığını bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada da (Newbold et al., 2004), kanüllü koyunlarda 110 mg/gün uçucu yağ karışımının (timol, guajakol ve limonen) yemlemeden 2 ve 6 saat sonra rumen sıvısı protozoa sayısı üzerinde etkisi saptanmamıştır. Bu bulgulardan farklı olarak, rumen kanülü takılı ineklerin rasyonlarına ilave edilen 200 g/gün kurutulmuş nane protozoa sayısını %50 oranında düşürmüştür (Ando et al., 2003). Rumen protozoa sayısı ile rumen sıvısı $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyi arasında pozitif bir korelasyon olduğu bildirilmekle birlikte (Makkar et al., 1998; Holtshausen et al., 2009) bu çalışmada benzer ilişki görülmemiştir. Rumende amonyak üreten bakterilerin gelişimi baskılanarak proteinlerin deaminasyonu sonucu şekillenen azot kaybının önüne geçilmesi $\text{NH}_3\text{-N}$ değerlendirilebilirliği açısından önem taşımaktadır (Leng and Nolan, 1984). Bu çalışmada iki farklı dozda ZYE ilavesi rumen sıvısı $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyi bakımından kontrole göre önemli bir farklılığa neden olmazken OLE200 grubunda rumen

sıvısı $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyi OLE400 grubuna göre düşük saptanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen bulguyu destekler nitelikte bazı fitokimyasallarla (kekik, vanilin, limonen, eugenol, nane uçucu yağı) yürütülen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda rumen sıvısı $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyinin muameleden etkilenmediği kontrol ile benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Benchaa et al., 2007; Yang et al., 2010; Mohamadi et al., 2017). Farklı bir bulgu olarak Eryavuz vd. (2015) erkek toklu rasyonlarına günlük 500 mg/kg ile üç günde bir 1500 mg/kg düzeylerinde ilave edilen *Yucca schidigera* tozunun rumen sıvısı $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyini kontrole göre düşürdüğünü bildirmiştir.

ZYE'nin *in vivo* rumen fermentasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar bulunmamakla birlikte *in vitro* bir çalışmada (Öztürk vd., 2012) bu çalışmada elde edilen bulgudan farklı olarak ZYE'nin TUYA ve propiyonik asit düzeyini artırdığı, bütirik asit düzeyi ve toplam protozoa sayısını ise azalttığı saptanmıştır. Farklı fitokimyasalların (kafeik asit, p-kumarik asit, trans-sinamik asit ve kateşin hidrat) rumen fermentasyon parametreleri üzerine etkisinin araştırıldığı *in vitro* çalışmada (Giuburuncă et al., 2014) fitokimyasalların rumen sıvısı pH'sı ve UYA düzeyi üzerine etkisi önemsizdir.

Fitokimyasalların rumen fermentasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalardan farklı sonuçların elde edilmesi kullanılan rasyonun içeriği ve kaba:kesif yem oranı, yemlere ilave edilen fitokimyasalların türü ve dozu, rumen sıvısı pH değeri ve deneysel koşullara dayandırılmıştır (Frankiç et al., 2009).

5.5 Biyokimyasal, Oksidan ve Antioksidan Parametreler

Biyokimyasal kan parametrelerinden glikoz ve trigliserit düzeyi muameleden önemli düzeyde etkilenirken BUN, kolesterol, total protein ve albumin düzeyi etkilenmemiştir. Her iki dozda ZYE ilavesi (OLE200 ve OLE400) kontrole göre kan glikoz düzeyini değiştirmemekle birlikte iki doz arasındaki farklılıklar önemli düzeydedir. Bu çalışmada kan glikoz düzeyi muamele gruplarında 54.56-63.19 mg/dL arasında değişim göstermiştir (Bkz. Çizelge 4.11). Kan glikoz düzeyi birçok faktöre (ırk, rasyon yapısı, çevre koşulları, enfeksiyon,

stres vb.) bağı olarak değişmekle birlikte bu çalışmada saptanan düzeyler literatürde bildirilen ortalama düzeylerle uyum içindedir (Çimen vd., 2001; İmİK vd. 2008).

Her iki dozda ZYE ilavesi kontrole göre kan trigliserit düzeyinde artışa neden olmuştur (Bkz. Çizelge 4.11). Kan glikoz düzeyinde olduğu gibi trigliserit düzeyi birçok faktöre bağı olarak değişmekle birlikte bu çalışmada kan trigliserit düzeyi 27.27-40.24 mg/dL arasında değişim göstermiştir. Bu değerler literatürde bildirilen değerlerle uyumludur (Kurt vd., 2008; Udum vd., 2013). Fitokimyasallar kolesterol veya safra asitleriyle çözünmeyen kompleks yapılar oluşturmak suretiyle, sindirim kanalında kolesterolün emilimini engelleyerek kan kolesterol düzeyini düşürmektedir (Rahmanian et al., 2015). Oleuropeinin hipoglisemik etkisi; glikozla indüklenen insülin salımı ve artmış periferik glikozun geri alımının yanısıra glikozun hücreye geri alımını hızlandırması ve plazma glikozunun düşmesi şeklindedir (Ghosian Moghaddam et al., 2013). Her ne kadar fitokimyasalların kolesterol, trigliserit ve glikozu düşürdüğü mekanizmaları ile bildirilmiş ve bazı çalışmalarda (Kholif et al., 2012; Canbolat vd., 2021) kolesterol ve trigliserit düşürücü etkisi görülsede bu çalışmada böyle bir etki görülmemiş hatta trigliserit düzeyi her iki doz ZYE ilavesiyle artmıştır. Bazı çalışmalarda ise koyun rasyonlarına ilave edilen saponinin (100 ve 200 mg/kg KM) glikoz, trigliserit ve BUN düzeylerini (Aazami et al., 2013), kuzu rasyonlarına ilave edilen 250 ppm ve 500 ppm kekik uçucu yağının toplam kolesterol ve trigliserit düzeylerini (Ünal ve Kocabağı, 2014), buzağı rasyonlarına 5 g/gün/buzağı kekik uçucu yağı ilavesinin kolesterol ve trigliserit düzeylerini (Vakili et al., 2013) etkilemediği ortaya konmuştur. Ayrıca zeytin yağı işleme yan ürünü olan zeytin posasının %15 düzeyinde kesif yeme ilavesinin sıcak stresine maruz kalmış buzağılarda etkilerinin incelendiği bir çalışmada (Abdalla et al., 2015) ise toplam kolesterol ve trigliserit düzeyinde düşüş saptanmıştır. Bu düşüşün nedeni zeytin posasının içerdiği yüksek fenolik madde veya yüksek miktarda tekli doymamış yağ asitleri içeriğine dayandırılmıştır.

Herhangi bir stres koşulu oluşturulmadan yürütölen bu çalışmada ZYE'nin yüksek antioksidan etkilere sahip olması nedeniyle oksidan ve antioksidan parametreler üzerine etkisi araştırılmış, MDA, TOS, TAS ve toplam GSH üzerine

muamelenin etkisi önemli iken GPx, SOD ve CAT muameleden etkilenmemiştir. Kan MDA ve TAS düzeyi OLE200 ve OLE400 gruplarında, TOS ve toplam GSH düzeyi ise sadece OLE 400 grubunda kontrol grubuna göre önemli düzeyde artmıştır. Her ne kadar bu çalışmada ZYE'nin antioksidan potansiyele sahip olduğu ortaya konmuş ve bazı araştırmacılar (Visioli et al., 2002; Goulas et al., 2010; Tsimidou and Papoti, 2010; Fares et al., 2011) tarafından ZYE'nin içerdiği fenolik bileşiklerin (oleuropein, verbaskosit, lutein, apigenin, tirosol ve hidroksitirosol gibi) varlığından dolayı yüksek antioksidan aktiviteye sahip ürünler olarak kabul edilse de lipid oksidasyonun göstergesi olan kan MDA ve TOS düzeyi ZYE ilavesiyle yükselmiştir. Benzer şekilde TAS düzeyleri de ZYE ilavesiyle önemli düzeyde artmıştır. Çevik vd. (2013) MDA, TOS ve TAS düzeylerinin birlikte artmasının oksidatif stresin artışının göstergesi olduğunu bildirmiştir. Oksidatif strese bağlı olarak trigliserit düzeyinde de bir artış olabilir.

Serbest radikaller genellikle bir elektronunu kaybetmiş bir oksijen atomu içeren moleküllerdir. Oksidatif stres durumunda serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı hem hücre içinde hem de hücre membranında etki gösteren koruyucu mekanizmalar vardır. Antioksidanlar bu görevi üstlenir ve bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Endojen ve eksojen olarak ikiye ayrılan antioksidanlardan enzimatik ve enzimatik olmayan endojen antioksidanlar (SOD, GPx, CAT ve GSH) vücutta üretilir ve mevcut serbest radikallerle reaksiyona girerek onların daha zararlı formlara dönüşmelerini önler. Eksojen antioksidanlar ise C vitamini, E vitamini ve polifenoller gibi diyetle dışarıdan alınan doğal bileşiklerdir (Naregal et al., 2017). Fenolik bileşiklerin doğrudan prooksidan aktiviteleri, bir fenoksil radikalının veya bir geçiş metal iyonu ile bir redoks kompleksinin oluşumuna dayanır (Eghbaliferiz and Iranshahi, 2016). Çok sayıda fenolik bileşiğin prooksidan aktivitesinin, normal hücrelerde ve kanser hücrelerinde lipid peroksidasyonunu, DNA hasarını ve apoptozu (hücre ölümü) tetikleyebileceği varsayılmaktadır. Bu çalışmada *in vivo* denemede oleuropein düzeyi baz alınarak kesif yeme ilave edilen ZYE'nin dozlarının prooksidan etki göstererek hayvanlarda stres oluşturmuş olabileceği düşünülmektedir. Zeytin yaprağı ekstraktının enzimatik antioksidanlar (SOD, GPx ve CAT) üzerine etkisi önemsizken enzimatik olmayan antioksidanlardan GSH düzeyi yüksek doz ZYE

ilavesiyle artmış ama yeterli antioksidan aktiviteyi gösterememiştir. Elde edilen bulgulardan farklı olarak Abdalla et al. (2015) tarafından yüksek sıcaklık altında buzağılarda yapılan bir çalışmada rasyona zeytin posası ilavesiyle MDA düzeyinin önemli düzeyde düştüğü, CAT ve toplam antioksidan düzeyinin arttığı bildirilmiştir. Bu araştırmacılar sıcaklık stresi altında elde edilen değerlerin zeytin posasının içerdiği polifenollerin antioksidan etkisinden kaynaklandığını ortaya koymuşlardır. Sütten kesilmiş yaklaşık 6 aylık Tuj kuzularında kekik uçucu yağının (1 mL/kuzu/gün ve 2 mL/kuzu/gün) MDA, SOD ve CAT üzerinde önemli bir farklılığa neden olmaz iken SOD ve GPx üzerinde önemli düzeyde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Durna-Aydın vd., 2020). Başka bir çalışmada 500 mg/kg ile üç günde bir 1500 mg/kg düzeylerinde ilave edilen *Yucca schidigera* tozunun kanda MDA düzeyini düşürdüğü, antioksidan aktiviteyi artırdığı (özellikle üç günde bir 1500 mg/kg ile) fakat antioksidan enzimlerin düzeylerine etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Eryavuz vd., 2015). Daha çok fitokimyasalların stres koşulları oluşturulduğunda etkilerinin daha belirgin olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada kesif yeme ilave edilen ZYE'nin antioksidan etkisi *in vivo* model sistemde sınırlı düzeyde kalmıştır. Kullanılan doza bağlı olarak prooksidan etkinin baskın duruma geldiğini söyleyebiliriz. Serum glikoz (yüksek dozda) ve trigliserit düzeylerinin yanı sıra MDA, TOS, TAS ve GSH düzeylerinin artması bu düşüncüyü desteklemektedir. Nitekim, fenolik bileşiklerin düşük dozlarda antioksidan aktivite gösterirken geçiş metal iyonları, yüksek pH, oksijen moleküllerinin varlığı ve yüksek doz fenolik bileşikler dahil olmak üzere belirli koşullar altında prooksidan özelliklere sahip olduğu ve bununda fenolik bileşiklerin yapılarına bağlı olarak bileşikteki hidroksil gruplarının toplam sayısına göre farklı etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Wang et al., 2009; Eghbaliferiz and Iranshahi, 2016).

Oleuropeinin ruminantlarda antioksidan veya prooksidan etkileri üzerine çalışmalar bulunmamakla birlikte Yavaş ve Malayoğlu (2019), etlik piliç yemlerine ilave edilen zeytin yaprağının doza bağlı olarak antioksidan (250 mg/kg oleuropein) veya prooksidan (500 mg/kg oleuropein) etki gösterdiğini bildirmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, zeytin yaprağı ekstraktının *in vitro* ve *in vivo* besin madde sindirilebilirliği ile rumen fermentasyonu, bazı kan parametreleri ve antioksidan kapasite üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada ilk olarak ZYE'nin oleuropein ve toplam fenolik madde içeriği, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri saptanmıştır. Buna göre ZYE'nin oleuropein içeriği 220.30 mg/g ve toplam fenol içeriği 177.28 mg GAE/g'dır. İki farklı yöntemle (DPPH ve TEAC) belirlenen *in vitro* antioksidan aktivitesi ise sırasıyla % 84.89 ve 12.13 g/100 g olarak saptanmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktının seçilen test mikroorganizmaları (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* ve *Staphylococcus aureus*) üzerine etkisi disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Zeytin yaprağı ekstraktı *Staphylococcus aureus* üzerinde 0.375 mg/mL MİK değeri ve 29 mm inhibisyon zon çapı ile en yüksek *Enterococcus faecalis* üzerinde 1.5 mg/mL MİK değeri ve 8.5 mm inhibisyon zon çapı ile en düşük olmakla birlikte seçilen tüm test mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

In vitro denemede ZYE'nin oleuropein içeriği üzerinden artan şekilde (100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm ve 400 ppm) sekiz farklı dozunun yonca kuru otu, arpa ve ATK'nın besin madde sindirilebilirliği üzerine etkisi saptanmıştır. Muamelenin yonca kuru otu, arpa ve ATK'nın besin madde sindirilebilirliği üzerine etkisi önemlidir. Yemlerin *in vitro* besin madde sindirilebilirliğinde doza bağlı olarak dalgalanmalar görülmekle birlikte genel olarak 200 ppm oleuropein içerecek şekilde ilave edilen ZYE dozu (OLE200) kırılma noktası olmuş ve en yüksek 400 ppm oleuropein dozunda önemli düşüşler saptanmıştır.

In vitro denemeden elde edilen bulgular doğrultusunda *in vivo* deneme kapsamında kesif yeme 200 ppm ve 400 ppm oleuropein içerecek şekilde ZYE ilavesinin besin madde sindirilebilirliği, rumen sıvısı NH₃-N düzeyi, pH'sı,

protozoa sayısı, UYA ve TUYA düzeyi ile AA/PA üzerine etkisi, biyokimyasal, oksidan ve antioksidan parametrelere ilişkin bulgular kısaca aşağıda özetlenmiştir.

- ❖ Kesif yeme ilave edilen zeytin yaprağı ekstraktının *in vivo* besin madde sindirilebilirliği üzerine etkisi incelendiğinde KM, OM, HS, NDF ve ADF sindirilebilirliği üzerine etkisi önemsiz, HP ve HY sindirilebilirliği üzerine etkisi ise önemlidir. Ham protein sindirilme derecesi OLE200 ve OLE400 gruplarında, HY sindirilme derecesi ise OLE400 grubunda önemli düzeyde düşmüştür.
- ❖ Muamelenin rumen metabolitlerinden UYA ve TUYA düzeyleri ile AA/PA üzerine etkisi önemlidir. Yüksek oleuropein dozu (OLE400) asetik asit düzeyini düşük oleuropein dozuna (OLE200) göre, bütirik asit düzeyini ise OLE200 ve kontrole göre önemli düzeyde artırmıştır. Propiyonik asit ve TUYA düzeyi ise OLE200 grubunda kontrole göre önemli düzeyde düşmüştür. Her iki doz ilavesiyle AA/PA önemli düzeyde yükselmiştir. Saatin etkisi rumen sıvısı UYA ve TUYA düzeyi ile AA/PA üzerinde önemli olup rumen sıvısı UYA ve TUYA düzeyi yemlemeden 4 saat sonra artarken AA/PA yemlemeden 2 saat sonra düşmüştür.
- ❖ Muamelenin rumen metabolitlerinden pH ve protozoa sayısı üzerine etkisi önemsiz iken rumen sıvısı $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyi OLE200 grubunda OLE400 grubuna göre düşüş göstermiştir. Rumen sıvısı $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyi ve pH üzerine saatin etkisi önemli olup rumen sıvısı $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyi yemlemeden 2 saat sonra artmış daha sonra düşüş göstermiş, pH ise yemlemeden 4 saat sonra düşmüş daha sonra artış göstermiştir.
- ❖ Biyokimyasal parametreler üzerine muamelenin etkisi sadece kan glikoz ve trigliserit düzeyi üzerinde önemli olup glikoz düzeyi OLE400 muamele grubunda OLE200 grubuna göre artış gösterirken trigliserit düzeyi her iki muamele grubunda da kontrole göre artış göstermiştir.

- ❖ Muamelenin oksidan ve antioksidan parametreler üzerine etkisi MDA, TOS, TAS ve toplam GSH üzerinde önemli düzeydedir. Kan MDA ve TAS düzeyi OLE200 ve OLE400 grubunda, TOS ve toplam GSH düzeyi OLE400 grubunda kontrole göre önemli düzeyde yükselmiştir. Serbest radikallerin zararlı etkilerini gideren antioksidan etkiye sahip GPx, SOD ve CAT enzimleri muameleden etkilenmemiştir.

Bu çalışmada oluropein içeriği baz alınarak kesif yeme ilave edilen ZYE *in vivo* besin madde sindirilebilirliği (HP ve HY), rumen sıvısı UYA (propiyonik ve bütirik asit) ve TUYA düzeyi ile AA/PA, biyokimyasal (trigliserit) ve oksidan (MDA ve TOS) parametreler üzerindeki etkisi doza bağlı olarak olumsuzdur.

Zeytin yaprağı ekstraktının rumen sıvısı UYA ve TUYA ile AA/PA üzerine olumsuz etkisi rumen mikroorganizmaları üzerindeki seçici olmayan yüksek antimikrobiyal etkisine bağlı olarak rumen fermentasyonunu etkilemesi şeklinde açıklanabilir. Her ne kadar bu çalışmada ZYE'nin *in vitro* antioksidan aktivitesi ortaya konmuş olsada *in vivo* denemede oksidan ve antioksidan parametreler üzerinde bu etki sınırlı düzeyde kalmıştır. Nitekim ZYE ilavesi ile MDA ve TOS düzeyi artmış, enzimatik antioksidanlar (SOD, GPx ve CAT) ise değişmemiştir. Kullanılan oluropein dozuna bağlı olarak bu çalışmada antioksidan etkiden ziyade prooksidan etki görüldüğünü söyleyebiliriz.

Mikroorganizmaların bitkisel ekstraktlar ve etken maddelerine adaptasyonu ve bunların rumen içindeki metabolizmaları ile antioksidan/prooksidan etkileri ruminant beslenmesinde söz konusu ürünlerin kullanımı için göz önünde bulundurulması gereken önemli bir noktadır. Bu noktada uygulanan dozların belirli aralıklarla (gün aşırı veya haftalık) ya da düşük ve çok yüksek doz şeklinde kullanılması ve bu yöntemlerin de test edilmesi önerilmektedir.

Sonuç olarak her ne kadar *in vitro* denemede tek tek yemler (arpa ve ATK) üzerine ZYE'nin besin madde sindirilebilirliği üzerine genel olarak olumlu etkisi saptansada *in vivo* denemede kesif yeme ilave edilen ZYE'nin bu etkisi görülmemiştir. Bu konuda yürütülecek çalışmalarda sindirilebilirlik, rumen metabolitleri ve bir takım kan parametrelerinin (biyokimyasal, oksidan ve

antioksidan) birlikte ele alınması ve *in vivo* çalışmaların sayısının artırılması gerekmektedir. Ayrıca antimikrobiyal ve antioksidan potansiyele sahip zeytin yaprağı ekstraktının ruminant hayvanlarda bu çalışmada (*in vivo*) kullanılan 200 ppm oleuropein dozundan düşük dozların etkisinin araştırıldığı *in vivo* çalışmaların yapılması önerilmektedir. Ülkemizde kalite ve standardizasyon açısından bitkisel ekstrakt temini konusunda sıkıntılar yaşanmaktadır. Söz konusu bitkisel ürünlerin katma değer yaratacak ürünlere dönüşümü henüz istenilen düzeye ulaşamamıştır. Doğal ve yan ürün olan zeytin yapraklarının hayvancılığın çevresel, sosyal ve ekonomik sürdürülebilirliği açısından değerlendirilmesi önemlidir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aazami, M.H., Tahmasbi, A.M., Ghaffari, M.H., Naserian, A.A., Valizadeh, R. and Ghaffari, A.H.**, 2013, Effects of saponins on rumen fermentation, nutrients digestibility, performance, and plasma metabolites in sheep and goat kids, *Annual Review & Research in Biology*, 3:596–607pp.
- Abaza, L., Ben Youssef, N., Manai, H., Mahjoub Haddada, F., Methenni, K. and Zarrouk, M.**, 2011, Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities, *Grasas Aceites*, 62: 96-104pp.
- Abdalla, E.B., El-Masry, K.A., Khalil, F.A., Teama, F.E. and Emara, S.S.**, 2015, Alleviation of oxidative stress by using olive pomace in crossbred (Brown Swiss X Baladi) calves under hot environmental conditions, *Arab Journal of Nuclear Science and Applications*, 48(4): 88-99pp.
- Abreu, A., Carulla, J.E., Lascano, C.E., Diaz, T.E., Kreuzer, M. and Hess, H.D.**, 2004, Effects of *Sapindus saponaria* fruits on rumen fermentation and duodenal nitrogen flow of lambs fed a tropical grass diet with and without legume, *Journal of Animal Science*, 82:1392-1400pp.
- Afaneh, I., Yateem, H. and Al-Rimawi, F.**, 2015, Effect of olive leaves drying on the content of oleuropein, *American Journal of Analytical Chemistry*, 6: 246-252pp.
- Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L.C. and Kamra, D.N.**, 2009, Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor, *Animal Feed Science Technology*, 148: 321-327pp.
- Ajaikumar, K.B., Asheef, M., Babu, B.H. and Padikkala, J.**, 2005, The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanol extract, *Journal of Ethnopharmacol*, 96: 171-176pp.
- Akbaş, Ü.**, 2017, Farklı çeşit zeytin yapraklarının fenolik bileşen, antioksidan aktivite ve mineral içeriği üzerine kurutmanın etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 73s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Aktaş, B.**, 2012, Omega-3 yağ asitlerince zenginleştirilmiş yumurta tavuğu karma yemlerine farklı bitkisel ekstraktların ilavesinin yumurta verimi, kalitesi, lipid peroksidasyonu ve antioksidan kapasite üzerine etkileri, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 153s.
- Al Rahmoun, W.**, 1985, Utilisation digestive comparee chez les caprins et les ovins : effects de la nature du regme, du traitement des pailles par la soude, de la nature dela source azolee (Digestive utilization in goats and sheep. Effect of diet, NaOH treated straws, kind of nitrogen souces). These Univeriste de Dijon (France).
- Albayrak S., Sağdıç O. ve Aksoy A.**, 2010. Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(4):401-409.
- Alibes, X. and Berge, PH**, 1983, Valorización de los subproductos del olivar como alimentos para los rumiantes en España. *Animal Production and Health Division*, FAO, Rome.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Moghaddam, P.R., Barl, B. and Weil, J.A.**, 2004, Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from Canadian Prairies, *Food Chemistry*, 84: 551-562pp.
- Amici A., Vernaf, M. and Martillotti, F.**, 1991, Olive by-products in animal feeding: improvement and utilization, *Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens*, 16: 149-152pp.
- Anassori, E., Dalir-Naghadeh, B., Pirmohammadi, R., Taghizadeh, A., Asri-Rezaei, S., Farahmand-Azar, S., Besharati, M. and Tahmoozi, M.**, 2012, *In vitro* assessment of the digestibility of forage based sheep diet, supplemented with raw garlic, garlic oil and monensin, *Veterinary Research Forum*, 3: 5-11pp.
- Ando, S., Nishida, T., Ishida, M., Hosoda, K. and Bayaru, E.**, 2003, Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. *Livestock Production Science*, 82: 245–248pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Anonim**, 2018, Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Koperatifçilik Genel Müdürlüğü, 2017 yılı zeytin ve zeytinyağı raporu, Nisan, 2018, 28s.
- AOAC**, 1995, Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis (16th Edition), Arlington, Virginia USA.
- Aruoma, O.I., Deiana, M., Jenner, A., Halliwell, B., Kaur, H., Banni, S., Corogiu, F.P., Dessi, M.A. and Aeschbach, R.**, 1998, Effect of hydroxytyrosol found in extra virgin olive oil on oxidative DNA damage and on low-density lipoprotein oxidation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:5181-5187pp.
- Aschenbach, J. R., Penner, G. B., Stumpff, F. and Gäbel, G.**, 2011, Ruminant nutrition symposium: role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH, *Journal of Animal Science*, 89:1092-1107pp.
- Aytül, K.K.**, 2010, Zeytin yaprağı özütünün antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri ve gıda uygulamaları, Doktora tezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü İzmir, 102s (yayımlanmamış).
- Aziz, N.H., Farag, S.F., Mousa, L.A. and Abo-Zaid, M.A.**, 1998, Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds, *Microbios*, 93:43–54pp.
- Bargo, F., Muller, L.D., Delahoy, J.E. and Cassidy, T.W.**, 2002, Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances, *Journal of Dairy Science*, 85(7): 1777-1792pp.
- Basmacıoğlu-Malayoğlu, H., Altan, Ö., Tüzmen, M.N. ve Yeşil-Çelikleş, Ö.**, 2008, Yumurta Tavuklarında n-3 çoklu doymamış yağ asitlerince zenginleştirilmiş karma yemlere ilave edilen kekik uçucu yağı ve biberiye ekstraktının oksidatif stabilite, lipid metabolizması, performans ve bazı yumurta kalite kriterleri üzerine etkisi, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Tarım ve Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Grubu TOVAG-106O090 nolu proje kesin raporu, 125s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Basmacıoğlu-Malayoğlu, H. ve Aktaş, B.**, 2011, Zeytin yağı işleme yan ürünlerinden zeytin yaprağı ile zeytin karasuyunun antimikrobiyal ve antioksidan etkileri, *Hayvansal Üretim Dergisi*, 52(1): 49-58.
- Basmacıoğlu-Malayoğlu, H., Aktaş, B. ve Yeşil-Çeliktaş, Ö.**, 2011a, Total phenolic contents and antioxidant activities of the essential oils from some plant species, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 48(3): 211-215.
- Basmacıoğlu-Malayoğlu, H., Özdemir, P. ve Hameş-Kocabaş, E.E.**, 2011b, Chemical compositions and antibacterial activity of the essential oils from some plant spices, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 48(1):11-18.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A. and Del Rio, J.A.**, 2000, Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves, *Food Chemistry*, 68:457-462pp.
- Benchaa, C., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Wang, Y., Beauchemin, K.A. and McAllister, T.A.**, 2007, Effects of essential oils and their components on *in vitro* rumen microbial fermentation, *Canadian Journal of Animal Science*, 87: 413-419pp.
- Benchaa, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T.A. and Beauchemin, K.A.**, 2008, A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production, *Animal Feed Science and Technology*, 145: 209–228pp.
- Bilal, T., Keser, O. ve Abaş, İ.**, 2008, Esans yağların hayvan beslemede kullanılması, *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 5: 41-50.
- Bird, S.H.**, 1991, The role of protozoa in relation to the nutrition of the host animal. In *Recent Advances in the Nutrition of Herbivores*. Y.W. Ho, H.K. Wong, N. Abdullah and A.Z. Tajuddin (eds.), *Malaysian Society of Animal Production* 171-180pp.
- Biricik, H., Hanoğlu Oral, H., Taluğ, A.M., Cengiz, Ş.Ş., Koyuncu, M. ve Dikmen, S.**, 2016, The effects of carvacrol and/or thymol on the performance, blood and rumen parameters, and carcass traits of Merino sheep, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 40:651-659pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bisignano, G., Tomaino, A. Lo Cascio, R. Crisafi, G. Uccella, N. and Saija, A.,** 1999, On the *in vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51:971-974pp.
- Blasi, F., Urbani, E., Simonetti, M.S., Chiesi, C. and Cossignani, L.,** 2016, Seasonal variations in antioxidant compounds of *Olea europaea* leaves collected from different Italian cultivars, *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 89: 202-207pp.
- Blümmel, M., Makkar, H.P.S. and Becker, K.,** 1997, *In vitro* gas production- A technique revisied. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 77: 24-34pp.
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J. and López, S.,** 2012, Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites, *Animal Feed Science and Technology*, 176: 78–93pp.
- Bölükbaşı, M.F.,** 1989, Fizyoloji ders kitabı- Vücut ısısı ve sindirim. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, 413s.
- Boudhrioua, N., Bahloul, N., Slimen, B.I. and Kechaou, N.,** 2009, Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves, *Industrial Crops and Products*, 29: 412-419pp.
- Brahmi, F., Mechri, B., Dhibi, M. and Hammami M.,** 2013, Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons, *Industrial Crops and Products*, 49: 256-264pp.
- Brahmi, F., Mechri, B., Dhibi, M. and Hammami M.,** 2015, Effect of growth stage and solvent extract on the antioxidant potential of olive leaves, *Journal of Plant Science*, 3: 1-7pp.
- Bratzler, J.W. and Swift, R.F.,** 1959, A comparison of nitrogen and energy determinations on fresh and over-air dried cattle faeces, *Journal of Dairy Science*, 42: 686-691pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Briante, R., Patumi, M., Limongelli, S., Febbraio, F., Vaccaro, C., Di Salle, A., La Cara, F. and Nucci, R.,** 2002, Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europea* L., *Journal of Plant Science*, 162: 791- 798pp.
- Broudiscou, L. P., Papon, Y. and Broudiscou, A. F.,** 2000, Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes, *Animal Feed Science and Technology*, 87:263–277pp.
- Bulgurlu, Ş. ve Ergül, M.,** 1978, Yemlerin fiziksel kimyasal ve biyolojik analiz metotları. E.Ü. Basımevi, Yayın No. 127, İzmir.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Kamel, C.,** 2005, Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture, *Animal Feed Science and Technology*, 123-124 (2): 597-613pp.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Kamel, C.,** 2006, Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation, *Journal of Dairy Science*, 89: 761-771pp.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L. and Ferret, A.,** 2007, Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation, *Journal of Dairy Science*, 90: 2580–2595pp.
- Canbolat, Ö., Kamalak, A., Kalkan, H., Kara, H. ve Filya, İ.,** 2021. Effect of garlic oil on lamb fattening performance, rumen fermentation and blood parameters, *Progress in Nutrition*, 23 (1): e2021006.
- Canbolat, Ö., Karaman, Ş. ve Filya, İ.,** 2010. Farklı kekik yağı dozlarının mısır silajının sindirimi ve rumen fermentasyonu üzerine etkileri, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16 (6): 933-939.
- Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Kamel, C.,** 2004, Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and profiles in fermentation continuous culture, *Journal of Animal Science*, 82: 3230-3236pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Carluccio, M.A., Siculella, L., Ancora, M.A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., Visioli, F., Distante, A. and De Caterina, R.,** 2003, Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of mediterranean diet phytochemicals, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23: 622–629pp.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Losa, R.,** 2005, Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system, *Animal Feed Science and Technology*, 119: 29–41pp.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S. and Ferret, A.,** 2006. Effect of essential oils active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems, *Journal of Dairy Science*, 89: 2649-2658pp.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Losa, R.,** 2007. Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oils compounds on rumen fermentation, *Animal Feed Science and Technology*, 132: 186-201pp.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Martin-Tereso, J. and Ter Wijlen, H.,** 2008, *In vitro* evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets, *Animal Feed Science and Technology*, 145: 259-270pp.
- Çayan, H. ve Erener, G.,** 2015, Effect of olive leaf (*Olea europaea*) powder on laying hens performance, egg quality and egg yolk cholesterol levels, *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 28 (4): 538-543pp.
- Çayıroğlu, H.,** 2015, Süt sığırlarında uçucu yağların yem değerlendirme, sindirilebilirlik, rumen fermentasyonu ile süt verimi ve bileşimi üzerine etkileri, *Türk Tarım - Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 3(7): 522-528.
- Çevik, M.U., Acar, A., Yücel, Y., Varol, S., Akıl, E., Arıkanoglu, A. ve Yüksel, H.,** 2013, İntraserebral kanamalı hastaların kanında total oksidan/antioksidan durumunun araştırılması, *TJN* 19:1 DOI:10.4274/Tnd.77698.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chaves, A.V., Stanford, K., Dugan, M.E.R., Gibson, L.L., McAllister, T.A. and Benchaar, C.,** 2008, Effects of carvacrol and cinnamaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance and carcass characteristics of growing lambs, *Animal Feed Science and Technology*, 145: 396–408pp.
- Cheeke, P.R.,** 2001, Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition, *Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants*, 241-254pp.
- Çimen, M., Karaalp, M. ve Elmastaş, M.,** 2001, Farklı yerli koyun ırklarına ait bazı kan parametrelerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma, *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(1): 135-136.
- Coppa, C.F.S.C., Rosim, R.E., Oliveira, C.A.F., Rodrigues, C.E.C. and Gonçalves, C.B.,** 2017. Extraction of oleuropein from olive leaves using a hydroalcoholic solvent, *Brazilian Journal of Food Technology* 20: e2016169.
- Crozier, A., Jaganath, I.B. and Clifford, M.N.,** 2009, Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health, *Natural Product Reports*, 26 (8): 1001-1043pp.
- Damiran, D., DelCurto, T., Bohnert, D.W. and Findholt, S.L.,** 2008, Comparison of techniques and grinding size to estimate digestibility of forage based ruminant diets *Animal Feed Science and Technology*, 141(1-2): 15-35pp.
- De Castro, M.D.L. and Capote, F.P.,** 2010, Extraction of oleuropein and related phenols from olive leaves and branches, *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, 28: 259-273pp.
- DeJong, S. and Lanari, M.,** 2009, Extracts of olive polyphenols improve lipid stability in cooked beef and pork: contribution of individual phenolics to the antioxidant activity of the extract, *Food Chemistry*, 116: 892-897pp.
- Delgado-Pertíñez, M., Gómez Cabrera, A. and Garrido, A.,** 2000, Predicting the nutritive value of the olive leaf a (*Olea europaea*): digestibility and chemical composition and *in vitro* studies, *Animal Feed Science and Technology*, 87: 187-201pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Demir, T. ve Akpınar, Ö.**, 2020, Bitkilerde bulunan fitokimyasalların biyolojik aktiviteleri, *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(8):1734-1746.
- Demirtaş, A., Öztürk, H. ve Pişkin, İ.**, 2018, Overview of plant extracts and plant secondary metabolites as alternatives to antibiotics for modification of ruminal fermentation, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 65: 213-217pp.
- Dündar, Y.**, 2001, Fitokimyasallar ve sağlıklı yaşam, *Kocatepe Tıp Dergisi*, 2: 131-138.
- Durna-Aydın, Ö., Merhan, O., Yıldız, G. ve Ulufer, S.**, 2020, The effect of oregano oil (*origanum vulgare*) on the fattening performance and blood oxidant-antioxidant balance in post-weaned Tuj lambs, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 26 (1): 59-64pp.
- Eghbaliferiz, S. and Iranshahi, M.**, 2016, Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: updated review of mechanisms and catalyzing metals, *Phytotherapy Research*, 30: 1379–1391pp.
- Erbay, Z. ve İçier, F.**, 2008, Zeytin ağacından faydalanmanın yeni bir yolu olarak zeytin yaprağı ve gıda endüstrisindeki potansiyel uygulama alanları, *Akademik Gıda*, 6(3): 27-36.
- Erener, G., Ocak, N., Öztürk, E., Çankaya, S., Özkanca, R. ve Altop, A.**, 2020, Evaluation of olive leaf extract as a growth promoter on the performance, blood biochemical parameters, and caecal microflora of broiler chickens, *Brazilian Journal of Animal Science*, 49:e20180300, e-ISSN 1806-9290.
- Ergülen, E., Özkaya, M.T., Ülger, S. and Özilbey, N.**, 2002, Identification of some Turkish olive cultivars by using RAPDPCR technique, *Acta Horticulturae*, 1: 586p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Eryavuz, A. and Dehority, BA.**, 2004, Effect of *Yucca schidigera* extract on the concentration of rumen microorganisms in sheep, *Animal Feed Science and Technology*, 117 (3-4): 215-222pp.
- Eryavuz, A., Küçükkurt, İ., İnce, S., Fidan, A.F., Avcı, G. ve Bülbül, T.**, 2015, Kuzularda rasyona *Yucca schidigera* tozu katılması ve günlük dozunun rumen fermentasyonu ile verime etkilerinin araştırılması, *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 8 (2): 1-10.
- Evans, J.D. and Martin, S.A.**, 2000, Effects of thymol on ruminal microorganism, *Current Microbiology*, 41: 336-340pp.
- FAO**, 2019, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Farag, R.S., El-Baroty, G.S. and Basuny, A.M.**, 2003, The influence of phenolic extracts obtained from the olive plant (cvs. Picual and Kronakii), on the stability of sunflower oil, *International Journal of Food Science and Technology*, 38: 81-87pp.
- Fares, R., Bazzi, S., Baydoun, S.E. and Abdel-Massih, R. M.**, 2011, The antioxidant and anti-proliferative activity of the lebanese *Olea europaea* extract, *Plant Foods for Human Nutrition*, 66: 58-63pp.
- Fayed, A.M., El Ashry, M.A. and Hend, A.A.**, 2009, Effect of feeding olive tree pruning by-products on sheep performance in Sinai, *World Journal of Agricultural Research*, 5(4): 436-445pp.
- Fegeros, K., Zervas, G., Apsokardos, F., Vastardis, J. and Apostolaki, E.**, 1995, Nutritive evaluation of ammonia treated olive tree leaves for lactating sheep, *Small Ruminant Research*, 17: 9-15pp.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Soares, M.E., Bastos, M.L. and Pereira, J.A.**, 2007, Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations, *Food Chemistry*, 103: 188-195pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Frankič, T., Voljč, M., Salobir, J. and Rezar, V.**, 2009, Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition, *Acta Argiculturae Slovenica*, 94(2): 95–102pp.
- Fredrickson, W.R.F and Group, S.**, 2000, Inc. Method and composition for antiviral therapy with olive leaves, U.S. *Patent*. 6: 117-884pp.
- Frutos, P., Hervas, G., Ramos, G., Giraldez, F.J. and Mantecon, A.R.**, 2002, Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value, *Animal Feed Science and Technology*, 95 (3-4): 215-226pp.
- Furneri, P.M., Marino, A., Saija, A., Uccella, N. and Bisignano, G.**, 2002, *In vitro* antimycoplasmal activity of oleuropein, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20: 293-296pp.
- Ghosian Moghaddam, M., Masomi, Y. and Razavian, M.**, 2013, The effect of oral consumption of olive leaves on serum glu-cose level and lipid profile of diabetic rats, *Journal of Basic and Clinical Pathophysiology*, 1:39-44pp.
- Giuburuncă, M., Criste, A., Cocan, D., Constantinescu, R., Răducu, C. and Mireșan, V.**, 2014, Effects of plant secondary metabolites on methane production and fermentation parameters in *in vitro* ruminal cultures, *Animal Science and Biotechnologies*, 47(2): 78-82pp.
- Görgülü, M.**, 2004, Sindirim Sistemi ve Besleme, <https://www.ruminantbesleme.com/wp-content/uploads/2018/09/SINDIRIM-SISTEMI-BESLEME.pdf>. (Erişim tarihi: 20 Nisan 2021)
- Görgülü, M., Yurtseven, S. ve Unsal, I.**, 2004, Effect of *Yucca* powder on fattening performance of male lambs, *Journal of Applied Animal Research*, 25: 33-36pp.
- Goulas, V., Papoti, V.T., Exarchou, V., Tsimidou, M.Z. and Gerothanassis, I.P.**, 2010, Contribution of flavonoids to the overall radical scavenging activity of olive (*Olea europaea* L.) leaf polar extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 258: 3303-3308pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Griffin, A. S., West, S. A. and Buckling, A.**, 2004, Cooperation and competition in pathogenic bacteria, *Nature*, 430: 1024–1027pp.
- Guo, S., Falk, E., Kenne, L., Ronnberg, B. and Sundquist, B.G.**, 2000, Triterpenoid saponin containing an acetylated branched D-fucosyl residue from *Quillaja saponaria* Molina, *Phytochemistry*, 53: 861-868pp.
- Hassan Ali, N., Faizi, S. and Kazmi, S.U.**, 2011, Antibacterial activity in spices and local medicinal plants against clinical isolates of Karachi, Pakista, *Pharmaceutical Biology*, 49(8): 833-839pp.
- Hayes, J.E., Allen, P., Brunton, N., O’Grady, M.N. and Kerry J.P.**, 2011, Phenolic composition and *in vitro* antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid, *Food Chemistry*, 126: 948–955pp.
- Hernández, J., Benedito, J.L., Abuelo, A. and Castillo, C.**, 2014, Ruminant acidosis in feedlot: from aetiology to prevention, *Scientific World Journal*, Article ID 702572: 8 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/702572>.
- Herrero, M., Temirzoda, T. N., Segura-Carretero, A., Quirantes, R., Plaza, M. and Ibañez, E.**, 2011, New possibilities for the valorization of olive oil by-products, *Journal of Chromatography A*, 1218: 7511–7520pp.
- Hess, H.D., Beuret, R.A., Lotscher, M., Hindrichsen, I.K., Machmüller, A., Carulla, J.E., Lascano, C.E. and Kreuzer, M.**, 2004, Ruminant fermentation, methanogenesis and nitrogen utilization of lambs receiving tropical grass hay-concentrate diets offered with *Sapindus saponaria* fruits and *Cratylia argentea* foliage, *Journal of Animal Science*, 2004; 99:177-189pp.
- Holtshausen, L., Chaves, A.V., Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., McAllister, T.A., Odongo, N.E., Cheeke, P.R. and Benchaar, C.**, 2009, Feeding saponin containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 92: 2809-2821pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hu, W.L., Liu, J.X., Ye, J.A., Wu, Y.M. and Guo, Y.Q.**, 2005, Effect of tea saponin on rumen fermentation *in vitro*, *Animal Feed Science and Technology* 120: 333-339pp.
- Hussain, I. and Cheeke, P.R.**, 1995, Effect of dietary *Yucca schidigera* extract on rumen and blood profiles of steers fed concentrate or roughage-based diets, *Animal Feed Science and Technology*, 51: 213–242pp.
- Ibarra, A. and Sniderman, Z.**, 2008, Olive polyphenol concentrate. US patent application 20080014322 A1. January 17th.
- IBM Corp. Released** 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- İmik, H., Tuncer, Ş.D., Aylanç, A. ve Aytaç, M.**, 2008, Determination of some digestibility of nutrients, rumen and blood metabolites of Akkaraman rams fed low-tannin sorghum and other conventional feeds, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 55: 177-182.
- Ivan, M., Koenig, K.M., Teferedegne, B., Newbold, C.J., Entz, T., Rode, L.M and Ibrahim, M.**, 2004, Effect of the dietary *Enterolobium cyclocarpum* foliage on the population dynamics of rumen ciliate protozoa in sheep, *Small Ruminant Research*, 52:81-91pp.
- Jouany, J. P. and Ushida, K.**, 1999, The role of protozoa in feed digestive system, *AJAS*, 12(1): 113-128pp.
- Juven, B. and Henis, Y.**, 1970, Studies on antimicrobial activity of olive phenolic compounds, *Journal of applied bacteriology*, 33: 721-32pp.
- Kaçar, D.**, 2008, Screening of some plant species for their total antioxidant and antimicrobial activities. Thesis of master degree. Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Tecnology, İzmir, 106s.
- Kamalak, A., Canbolat, Ö., Gürbüz, Y., Özay, O. ve Özkose, E.**, 2005, Chemical composition and its relationship to *in vitro* gas production of several tannin containing trees and shrub leaves, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18: 203-208pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kamalak, A., Canbolat, O., Ozkan, C.O. ve Atalay, A.I.,** 2011, The effect of essential oil (Thymol) supplementation on *in vitro* gas production profiles and fermentation end products of alfalfa hay, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(2): 211-216pp.
- Kamel, C., Greathead, H. M. R., Tejido, M. L., Ranilla, M. J. and Carro, M. D.,** 2008, Effects of allicin and diallyl disulfide on *in vitro* rumen fermentation of a mixed diet, *Animal Feed Science and Technology*, 145: 351-363pp.
- Kantautaitė, J., Oberauskas, V., Sutkeviciene, R. and Sederevicius, A.,** 2006, The effect of probiotic strains of *Lactobacillus* on the microbiological parameters in the faeces of neonate calves, *Veterinarija ir Zootechnika*, 36: 58p.
- Khamisabadi, H., Kafilzadeh, F. and Charaien, B.,** 2016, Effect of thyme [*Thymus vulgaris*] or peppermint [*Mentha piperita*] on performance, digestibility and blood metabolites of fattening Sanjabi lambs, *Biharean Biologist*, 10(2): 118-122pp.
- Khateri, N., Azizi, O. and Jahani-Azizabadi, H.,** 2017, Effects of a specific blend of essential oils on apparent nutrient digestion, rumen fermentation and rumen microbial populations in sheep fed a 50:50 alfalfa hay:concentrate diet, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30(3): 370-378pp.
- Kholif, S.M., Morsy, T.A., Abdo, M.M., Matloup, O.H. and Abu Elella, A.A.,** 2012. Effect of supplementing lactating goats rations with garlic, cinnamon or ginger oils on milk yield, milk composition and milk fatty acids profile, *Journal Life Science*, 4(1): 27-34pp .
- Khorchani, T., Hammadi, M., Hammami, H. and BenRouina, B.,** 1997, Use of olive by-products in the nutrition of lambs in Southern Tunisia. In: Lindberg J.E., Gonda H.L., Ledin I. (eds). *Recent advances in small ruminant nutrition* Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 99-102pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Korukluoğlu, M., Sahan, Y., Yığıt, A. ve Karakas, R.,** 2006, Antifungal activity of olive leaf (*Olea europaea* L.) extracts from the Trilye Region of Turkey, *Annals of Microbiology*, 56(4): 359-362pp.
- Krause, K.M. and Oetzel, G.R.,** 2006, Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review, *Animal Feed Science and Technology*, 126: 215-236pp.
- Kumar, M., Kannan, A., Bhar, R., Gulati, A., Gaurav, A. and Sharma, V.K.,** 2017, Nutrient intake, digestibility and performance of Gaddi kids supplemented with tea seed or tea seed saponin extract, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30(4): 486-494pp.
- Kumar, R. and Vaithiyanathan, S.,** 1990, Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves, *Animal Feed Science and Technology*, 30: 21–23pp.
- Kumar, R., Kamra, D.N., Agrawal, N. and Chaudhary, L.C.,** 2009, Effect of eucalyptus (*Eucalyptus globules*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor, *Animal Feed Science and Technology*, 9: 237-243pp.
- Kurniawati, A., Widodo, W., Artama, W.T. and Yusiati, L.M.,** 2018, Effects of four essential oils on nutrients digestibility of *in vitro* ruminal fermentation, *Bulletin of Animal Science*, 42(2):122-126pp.
- Kurt, D., Yokuş, B., Çakır, D.Ü. ve Denli, O.,** 2008. Investigation levels of certain serum biochemistry components and minerals of pasturing Akkaraman sheeps in Adiyaman province, *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1: 34-37pp.
- Lama-Muñoz, A., del Mar Contreras, M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I. and Castro, E.,** 2020. Content of phenolic compounds and mannitol in olive leaves extracts from six Spanish cultivars: extraction with the Soxhlet method and pressurized liquids, *Food Chemistry*, 320: 126626.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Le Tutour, B. and Guedon, D.**, 1992, Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds, *Phytochemistry*, 31: 1173–1178pp.
- Lee, O.H. and Lee, B.Y.**, 2010, Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract, *Bioresource Technology*, 101: 3751-3754pp.
- Lee, O.H., Lee, B.Y., Lee, J., Lee, H.B., Son, J.Y., Park, C.S., Shetty, K. and Kim, Y.C.**, 2009, Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresource Technology*, 100, 6107–6113pp.
- Leinmuller, E., Steingass, I. and Menke, K.H.**, 1991, Tannins in ruminant feedstuffs, *Animal Research*, 321: 1–56pp.
- Leng, R.A. and Nolan, J. V.**, 1984, Nitrogen metabolism in the rumen, *Journal of Dairy Science*, 67: 1072-1089pp.
- Lila, Z.A., Mohammed, N., Kanda, S., Kamada, T. and Itabashi, H.**, 2003, Effect of sarsaponin on ruminal fermentation with particular reference to methane production *in vitro*, *Journal of Dairy Science*, 86: 3330-3336pp.
- Lins, P.G., Pugine, S.M.P., Scatolini, A.M. and Melo, M P.**, 2018, *In vitro* antioxidant activity of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) and its protective effect on oxidative damage in human erythrocytes, *Heliyon*, 4(9):e00805.
- Liu, L., Zubik, L., Collins, F.W., Marko, M. and Meydani, M.**, 2004, The antiatherogenic potential of oat phenolic compounds, *Atherosclerosis*, 175: 39-49pp.
- Lovett, D.K., Stack, L., Lovell, S., Callan, J., Flynn, B., Hawkins, M. and Mara, F.P.O.**, 2006, Effect of feeding *Yucca schidigera* extract on performance of lactating dairy cows and ruminal fermentation parameters in steers, *Livestock Science*, 102: 23-32pp.
- Makkar, H.P., Sen, S.S., Blummel, M. and Becker, K.**, 1998, Effect of fractions containing saponins from *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria* and *Acacia auriculoformis* on rumen fermentation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:4324–4328pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Malik, N.S.A. and Bradford, J.M.,** 2006, Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in ‘Arbequina’ olives. *Scientia Horticulturae*, 110: 274-278pp.
- Malik, P.K., Kolte, A.P., Baruah, L., Saravanan, M., Bakshi, B. and Bhatta, R.,** 2017, Enteric methane mitigation in sheep through leaves of selected tanniniferous tropical tree species, *Livestock Science*, 200: 29-34pp.
- Malik, S.N.,** 2015, Antibacterial activity of olive (*Olea europaea*) leaves and arugula (*Eruca sativa*) seeds extract, *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7(2); 307-310pp.
- Markin, D., Duek, L. and Berdicevsky, I.,** 2003, In vitro antimicrobial activity of olive leaves, *Mycoses*, 46: 132-136pp.
- Martinez, S., Madrid, J., Hernandez, F., Megias, M.D., Sotomayor, J.A. and M.J. Jordan,** 2006. Effect of thyme essential oils (*Thyme hyemalis* and *Thymus zygis*) and monensin on *in vitro* ruminal degradation and volatile fatty acid production, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 6598-6602pp.
- Martín-García, A.I., Moumen, A., Ruiz, D.R.Y. and Alcaide, E.M.,** 2003, Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves, *Animal Feed Science and Technology*, 107, 61–74pp.
- McIntosh, F.M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R.C., Beever, D.A. and Newbold C.J.,** 2003, Effects of essential oil on rumeninal microorganism and their protein metabolism, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8): 5011-5014pp.
- Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T. and McNabb, W.C.,** 2003, The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: A review, *Animal Feed Science and Technology*, 106: 3-19pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Moate, P.J., Williams, S.R.O., Torok, V., Hannah, M.C., Ribaux, B.E., Tavendale, M., Eckard, R.J., Jacobs, J.L., Auldist, M.J. and Wales, W.J.,** 2014, Grape marc reduces methane emissions when fed to dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 97: 5073-5087pp.
- Mohamadi, R., Rahchamani, R., Ghanbari, F. and Farivar, F.,** 2017, Peppermint and pennyroyal essential oil effect on performance, rumen microbial population and some blood parameters of sheep, *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 11(1): 75-84pp.
- Molero, R., Ibars, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Losa, R.,** 2004, Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios, *Animal Feed Science and Technology*, 114 (1-4): 91-104pp.
- Muğlalı, H.,** 2013, Süt ineklerinde subklinik asidozis, *Tüsedad*, 4(23): 21.
- Munoz, F., Anguita, T., Lara, L., Suarez, A. and Boza, J.,** 1983, The utilization of olive leaves in goats feeding, *Advances in Nutrition Animal Breeding*, 24: 355-358pp.
- Naregal, G.V., Devaranavadagi, B.B., Patil, S.G. and Aksi, B.S.,** 2017, Elevation of oxidative stress and decline in endogenous antioxidant defense in elderly individuals with hypertension, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(7), BC09–BC12.
- Newbold, C.J., McIntosh, F.M., Williams, P., Losa, R. and Wallace, R.J.,** 2004, Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation, *Animal Feed Science and Technology*, 114:105-112pp.
- Niaounakis, M. and Halvadakis, C.P.,** 2006, Olive processing waste management literature review and patent survey, 2nded.Elsevier: Waste Management Series, 5: 23-64pp.
- Nicoli, F., Negro, C., Vergine, M., Aprile, A., Nutricati, E., Sabella, E., Miceli, A., Luvisi, A. and De Bellis, L.,** 2019, Evaluation of phytochemical and antioxidant properties of 15 Italian *Olea europaea* L. cultivar leaves, *Molecules*, 24: 2-12pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nocek, J. E., Holt, M. G. and Oppy, J.,** 2011, Effects of supplementation with yeast culture and enzymatically hydrolyzed yeast on performance of early lactation dairy cattle, *Journal of Dairy Science*, 94: 4046-4056pp.
- Nora, N.B., Hamid, K., Snouci, M., Boumedien, M. and Abdellah, A.,** 2012, Antibacterial activity and phytochemical screening of *Olea europea* leaves from Algeria, *Open Conference Proceedings Journal*, 3(1-M11): 66-69pp.
- NRC,** 2007, Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, Goats, Cervide, and New World Camelids. National Academy of Sciences, Washington, DC, USA.
- Ogimoto, K., and Imai, S.,** 1981, Atlas of Rumen Microbiology. *Japan Sci. Soc. Press*, Tokyo, Japan.
- Oskoueian, E., Abdullah, N. and Oskoueian, A.,** 2013, Effects of flavonoids on rumen fermentation activity, methane production, and microbial population, *BioMed Research International*, Article ID 349129, 8p.
- Öztürk, H.,** 2007, Küresel ısınmada ruminantların rolü, *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 78: 17-21.
- Öztürk, H., Demirtas, A., Salgirli, Y., Pekcan, M., Emre, B. ve Fidanci, U.R.,** 2012, Effects of olive leaf extract on rumen microbial fermentation in *in vitro* semi-continuous culture system (RUSITEC), *Veterinary Journal of Ankara University*, 59(1):17-21pp.
- Öztürk, Z.,** 2018, Diyabet, oksidatif stres ve endotel disfonksiyonu, *Bezmialem Science*, DOI: 10.14235/bs.2018.2145.
- Paglia, D.E. and Valentine, W.N.,** 1967, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(1): 158-169pp.
- Panizzi, L., Scarpati, M.L. and Oriente, G.,** 1960, Chemical structure of oleuropein, bitter glucoside of olive with hypotensive activity, *Gazzetta Chimica Italiana*, 90:1449-1485pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Papoti, V.T. and Tsimidou, M.Z.**, 2009, Impact of sampling parameters on the radical scavenging potential of olive (*Olea europaea* L.) leaves, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 3470–3477pp.
- Patra, A.K. and Saxena, J.**, 2009, Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations, *Anton Van Leeuwenhoek*, 96: 363-375pp.
- Patra, A.K. and Saxena, J.**, 2010, A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen, *Phytochemistry*, 71: 1198-1222pp.
- Patra, A.K., Kamra, D.N. and Agarwal, N.**, 2006, Effect of spices on rumen fermentation, methanogenesis and protozoa counts in *in vitro* gas production test, *International Congress Series*, 1293:176–179pp.
- Pourezza, N.**, 2013, Phenolic compounds as potential antioxidant, *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 8(4): 149–150pp.
- Prichard, D.A., Stocks, D.C., O’Sullivan, B.M., Marth, P.R., HurWood, I.S.O. and Rourke, P.K.**, 1988, The effect polyethylene glycol (PEG) on wool and growth and live weight of sheep consuming Mulga (*Acacia aneura*) diet, *Proceedings of Australian Society of Animal Production*, 17: 290-293pp.
- Qadis, A.Q., Goya, S., Ikuta, K., Yatsu, M., Kimura, A., Nakanishi, S. and Sato, S.**, 2014, Effects of a bacteria based probiotic on ruminal pH, volatile fatty acids and bacterial flora of Holstein calves, *Journal of Veterinary Medical Science*, 76: 877–885pp.
- Quirantes-Piné, R., Zurek, G., Barrajon-Catalán, E., Bäßmann, C., Micol, V., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A.**, 2013, A metabolite-profiling approach to assess the uptake and metabolism of phenolic compounds from olive leaves in SKBR3 cells by HPLC–ESI-QTOF-MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72: 121–126pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rahmanian, N., Jafari, S.M. and Wani, T.A.,** 2015, Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves, *Trends in Food Science and Technology*, 42 (2): 150-172pp.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C.,** 1999, Antioxidant activity applying an improved radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231-1237pp.
- Romero-Huelva, M. and Molina-Alcaide, R., E.,** 2013. Nutrient utilization, ruminal fermentation, microbial nitrogen flow, microbial abundances, and methane emissions in goats fed diets including tomato and cucumber waste fruits, *Journal of Animal Science*, 91(2): 914–923pp.
- Sallam, S.M.A., Bueno, I.C.S., Brigide, P., Godoy, P.B., Vitti, D.M.S.S. and Abdalla, A.L.,** 2009, Efficacy of eucalyptus oil on *in vitro* rumen fermentation and methane production, *Options Méditerranéennes*, 85: 267-272pp.
- Samuelsson, G.,** 1951, The blood pressure lowering factor in leaves of *Olea Europaea*, *Farmaceutisk Revy*, 15: 229- 239pp.
- Sanchez, J.C., Alsina, M.A., Herrlein, M.K and Mestres, C.,** 2007, Interaction between the antibacterial compound, oleuropein, and model membranes, *Colloid Polymer Science*, (285): 1351-1360pp.
- Santos, M. B., Robinson, P. H., Williams, P. and Losa, R.,** 2010, Effects of addition of an essential oil complex to the diet of lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance, *Animal Feed Science and Technology*, 157:64–71pp.
- Sarıpınar, D. ve Sulu, N.,** 2005, Ruminantlarda probiyotiklerin kullanımı ve rumene etkileri, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 11(1): 93-98.
- Sieo, C.C.,** 1997, *In vitro* studies on the adhesion of fibrobacter succinogenes strain D3 to microcry stalline cellulose, Master Thesis, Institute of Bioscience, Malaysia, 25p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Silanikove, N., Gilboa, A., Perevolotsky, A. and Nitsan, Z.**, 1996, Goats fed tannin-containing leaves do not exhibit toxic syndromes, *Small Ruminant Research*, 21: 195-201pp.
- Silanikove, N., Gilboa, N. and Nitsan, Z.**, 2001. Effect of polyethylene glycol on rumen volume and retention time of liquid and particulate matter along the digestive tract in goats fed tannin-rich carob leaves (*Ceratonia siliqua*), *Small Ruminant Research*, 40: 95-99pp.
- Silva, S., Gomes, L., Leitaó, F., Coelho, A.V. and Vilas Boas, L.**, 2006, Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves, *International Food Science and Technology*, 12:385-396pp.
- Singer, M.D., Robinson, H.P., Salem, A.Z.M. and DePeters, E.J.**, 2008, Impacts of rumen fluid modified by feeding *Yucca schidigera* to lactating dairy cows on *in vitro* gas production of 11 common dairy feedstuffs, as well as animal performance, *Animal Feed Science and Technology*, 146: 242-258pp.
- Soler-Rivas, C., Espin, J.C. and Wichers, H.J.**, 2000, Oleuropein and related compounds, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1013-1023pp.
- Spanghero, M., Zanfi, C., Fabbro, E., Scicutella, N. and Camellini, C.**, 2008, Effects of a blend of essential oils on some end products of *in vitro* rumen fermentation, *Animal Feed Science and Technology*, 145: 362-372pp.
- Stockhammer, S., Stolze, K., Rohr-Udilova, N., Chizzola, R., ZitterlEglseer, K. and Franz, C.**, 2009, Antioxidant activity of phylogenous industrial waste and derived extracts for the production of feed and food additives, *International Journal of Food Science and Technology*, 44: 702–710pp.
- Suarez, M., Romero, M.P. and Motilva, M.J.**, 2010, Development of a phenol enriched olive oil with phenolic compounds from olive cake, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:10396-10403pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sudjana, A.N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Riley, T.V. and Hammer, K.A.**, 2009, Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33: 461-463pp.
- Şahan, Z.**,2012, Bazı bitki uçucu yağlarının enerji, protein ve lif kaynağı yemlerin in vitro gerçek sindirilebilirliğine ve yüksek verimli süt sığırlarında süt verimi ve süt kompozisyonlarına etkileri, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 147s.
- Şahin, S., Elhussein, E., Bilgin, M., Lorenzo, J. M., Barba, F. J. and Roohinejad, S.**, 2018, Effect of drying method on oleuropein, total phenolic content, flavonoid content, and antioxidant activity of olive (*Olea europaea*) leaf, *Journal of Food Processing and Preservation*, 42, e13604. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13604>.
- Tager, L. R., and Krause, K. M.**, 2011, Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows, *Journal of Dairy Science*, 94:2455–2464pp.
- Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A. M., Roldán, C., León, L., De la Rosa, R., Fernández-Gutiérrez, A. and Segura-Carretero, A.**, 2015, Chemometric analysis for the evaluation of phenolic patterns in olive leaves from six cultivars at different growth stages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63: 1722-1729pp.
- Tassou, C.C. and Nychas, G.J.**, 1995, Inhibition of *Salmonella enteritidis* by oleuropein in broth and in a model food system, *Letters in Applied Microbiology*, 20:120-124pp.
- Tatsuoka, N., Hara, K., Milkuni, K., Hara, K., Hashimoto, H. and Itabashi, H.**, 2008, Effects of the essential oil cyclodextrin complexes on ruminal methane production *in vitro*, *Animal Science Journal*, 79: 68-75pp.
- Tjardes, K., Buskirk, D., Allen, M., Ames, N., Bourquin, L. and Rust, S.**, 2000, Brown midrib-3 corn silage improves digestion but not performance of growing beef steers, *Journal of animal science*, 78(11): 2957-2965pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tricarico, J. M., Johnston, J. D. and Dawson, K. A.,** 2008, Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* α -amylase, *Animal Feed Science and Technology*, 145:136–150pp.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S. and La Guardia, M.,** 2005, The phenolic composition of olive oil: structure, biological activity, and beneficial effects on human health, *Nutrition Research Reviews*, 18(1): 98-112pp.
- Tsimidou, M.Z. and Papoti, P.V.,** 2010, Bioactive ingredients in olive leaves, olives and olive oil in health and disease, *Prevention*, 39: 349-356pp.
- Tsiplakou, E. and Zervas, G.,** 2008, The effect of dietary inclusion of olive tree leaves and grape marc on the content of conjugated linoleic acid and vaccenic acid in the milk of dairy sheep and goats, *Journal of Dairy Research*, 75: 270-278pp.
- TÜİK,** 2018, <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Sera-Gazi-Emisyon-Istatistikleri-1990-2018-33624> (Erişim tarihi: 3 Aralık 2020)
- TÜİK,** 2019, www.tuik.gov.tr/PreIstatistikTablo.do?istab_id=1073. (Erişim tarihi: 3 Aralık 2020)
- Tuncer, H.İ.,** 2007, Karma yemlerde kullanımı yasaklanan hormon, antibiyotik, antikoksidiyal ve ilaçlar, *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 47: 29-37.
- Turan, F., Gurağaç, R. ve Sayın, S.,** 2012, Su ürünleri yetiştiriciliğinde uçucu yağlar, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5: 35-40.
- Türköz, G., Baydar, T., Sözbilen, M. ve Hışıl, Y.,** 2008, Oleuropein ve Ekstraksiyon Yöntemleri, I. Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi, 17-18 Mayıs 2008, Edremit-Balıkesir.
- Udum, D., Üstüner, H. Belenli, D. ve Uzabacı, E.,** 2013, Kıvrıcık ırkı koyunlara ait bazı biyokimyasal değerlerin belirlenmesi üzerine bir araştırma, *Uludağ University Journal of The Faculty of Veterinary Medicine*, 32: 7-10.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ünal, A. ve Kocabağlı, N.**, 2014, Effect of different dosages of oregano oil on performance and some blood parameters in lambs, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 61: 199-204.
- Ünal-Baruh, A. ve Kocabağlı, N.**, 2017, Effect of different levels of Oregano essential oil on some rumen parameters in lambs, *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 43(2): 116-122pp.
- Vakili, A.R., Khorrami, B., Danesh Mesgaran, M. and Parand, E.**, 2013, The effects of thyme and cinnamon essential oils on performance, rumen fermentation and blood metabolites in Holstein Calves consuming high concentrate diet, *Asian Australasian Journal of Animal Science*, 26: 935-944pp.
- Valenzuela-Grijalva, N.V., Pinelli-Saavedra, A., Muhlia-Almazan, A., Domínguez-Díaz, D. and González-Ríos, E.**, 2017, Dietary inclusion effects of phytochemicals as growth promoters in animal production, *Journal of Animal Science and Technology*, 59(8): 2-17pp.
- Valero, M. V., Prado, R. M., Zawadzki, F., Eiras, C. E., Madrona, G. S. and Prado, I. N.**, 2014, Propolis and essential oils additives in the diets improved animal performance and feed efficiency of bulls finished in feedlot, *Acta Scientiarum-Animal Sciences*, 36: 419-426pp.
- Van Soest, P. J.**, 1994, Nutritional ecology of the ruminant, 2nd edn. Ithaca (NY): Comstock Publishing Associates.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewggs, B. A.**, 1991, Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition, *Journal of Dairy Science*, 74: 3583–3597pp.
- Varel, V.H. and Miller, D.N.**, 2001, Plant derived oils reducen pathogens and gaseous emissions from stored cattle waste, *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1366-1370pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Venturi, C. R., Danielli, L. J. and Klein, F.** 2015, Chemical analysis and *in vitro* antiviral and antifungal activities of essential oils from *Glechon spathulata* and *Glechon marifolia*, *Pharmaceutical Biology*, ;53(5):682–688pp.
- Vinson, J.A., Dabbagh, Y.A., Serry, M.M. and Jinhee, J.**, 1995, Plant flavonoids, especially tea flavanols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(11): 2800-2802pp.
- Visioli, F. and Galli, C.**, 1998, Olive oil phenols and their potential effects on human health, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4292–4296pp.
- Visioli, F., Bellosta, S. and Galli, C.**, 1998, Oleuropein, the bitter principles of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages, *Life Science*, 62: 541–546pp.
- Visioli, F., Poli, A. and Galli, C.**, 2002, Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil, *Medicinal Research Reviews*, 22: 65–75pp.
- Vogel, P., Machado, I.K., Garavaglia, J., Zani, V.T., Souza, D. and Dal Bosco, S.M.**, 2015, Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health, *Nutricion Hospitalaria*, 31(3):1427-1433pp.
- Waghorn, G.**, 2008, Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-progress and challenges, *Animal Feed Science and Technology*, 147: 116-139pp.
- Wahrmund, J.L., Ronchesel, J.R., Krehbiel, C.R., Goad, C.L., Trost, S.M. and Richards, C.J.**, 2012, Ruminant acidosis challenge impact on ruminal temperature in feedlot cattle, *Journal of Animal Science*, 90: 2794-2801pp.
- Wallace, R.J., McEwan, N.R., McIntosh, F.M., Teferedegne, B. and Newbold, C.J.**, 2002, Natural products as manipulators of rumen fermentation, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 15: 1458–1468pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, C.J., Wang, S.P. and Zou, H.**, 2009, Influences of flavomycin, ropadiar and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation and methane emission from sheep, *Animal Feed Science and Technology*, 148: 157–166pp.
- Wang, Y., Douglas, G. B., Waghorn, G. C., Barry, T. N. and Foote, A. G.**, 1996, Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon lactation performance in ewes, *Journal of Agricultural Science*, 126:353-362pp.
- Wang, Y., McAllister, T.A., Newbold, C.J., Rode, L.M., Cheeke, P.R. and Cheng, K.J.**, 1998, Effect of *Yucca schidigera* extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique (Rusitec), *Animal Feed Science and Technology*, 74:143-53pp.
- Wayne, P.A.**, 2012a, CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard-Eleventh Edition. CLSI document M02-A11.
- Wayne, P.A.**, 2012b, PCLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard-Ninth Ed. CLSI document M07-A9.
- Wina, E., Muetzel, S., Hoffman, E., Makkar, H.P.S. and Becker, K.**, 2005, Saponins containing methanol extract of *Sapindus rarak* affect microbial fermentation, microbial activity and microbial community structure *in vitro*, *Animal Feed Science and Technology*, 121:159-174pp.
- Wright, A.D.G. and Klieve, A.V.**, 2011, Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation? *Animal Feed Science and Technology*, 166: 248-253pp.
- Wu, Z., Sadik M, Sleiman, F.T., Simas, J.M., Pessarakli, M. and Huber, J.T.**, 1994, Influence of *Yucca* extract on rumen metabolism in cows, *Journal of Animal Science*, 72:1038-1042pp.
- Xie, P., Huang, L., Zhang, C. and Zhang, Y.**, 2015, Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) extracts and their structure activity relationships, *Journal of Functional Foods*, 16: 460-471pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yalçın, S., Can, P., Gürdal, A. O., Bağcı, C. ve Eltan, Ö.,** 2011, The nutritive value of live yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) and its effect on milk yield, milk composition and some blood parameters on dairy cows, *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, 24: 1377-1385pp.
- Yáñez Ruiz, D. R., Martin-Garcia, A. I., Moumen, A. and Molina-Alcaide, E.,** 2004a, Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on olive leaves, *Journal of Animal Sciences*, 82: 3006-3014pp.
- Yáñez Ruiz, D.R., Moumen, A., Martin Garcia, I. and Molina Alcaide, E.,** 2004b, Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: Effect of PEG supply, *Journal of Animal Sciences*, 82: 2023-2032pp.
- Yang, W.Z., Benchaar, C., Ametaj, B.N. and Beauchemin, K.A.,** 2010, Dose response to eugenol supplementation in growing beef cattle: ruminal fermentation and intestinal digestion, *Animal Feed Science and Technology*, 158:57–64pp.
- Yateem, H., Afaneh, I. and Al-Rimawi, F.,** 2014, Optimum Conditions for Oleuropein Extraction from Olive Leaves, *International Journal of Applied Science and Technology*, 4: 5p.
- Yavaş, İ.,** 2013, Etlik piliç karma yemlerine ilave edilen zeytin yaprağının performans, bazı kan parametreleri ve bağırsak mikrobiyotası üzerine etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 89s.
- Yavaş, İ. ve Malayoğlu, B.H.,** 2019, Effects of olive leaf (oleuropein) supplementation on quality of breast meat in broilers, *Tarım Bilimleri Dergisi*, 25: 467-473pp.
- Yeşilbağ, D., Biricik, H., Çetin, I., Kara, C., Meral, Y., Cengiz, S.S., Orman, A. ve Udum, D.,** 2016, Effects of juniper essential oil on growth performance, some rumen protozoa, rumen fermentation and antioxidant blood enzyme parameters of growing Saanen kids, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(5): 67-76pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Younus, H.**, 2018, Therapeutic potentials of superoxide dismutase, *International Journal of Health Sciences*, (Qassim), 12(3): 88–93pp.
- Yuan, Z.P., Zhang, C.M., Zhou, L., Zou, C.X., Guo, Y.Q., Li, W.T., Liu, J.X. and Wu, Y.M.**, 2007, Inhibition of methanogenesis by tea saponin and tea saponin plus disodium fumarate in sheep, *Journal of Animal and Feed Sciences*, 7: 560-565pp.
- Zarzuelo, A., Duarte, J., Jiménez, J., González, M. and Utrilla, M.P.**, 1991, Vasodilator effect of olive leaf, *Planta Medica*, 57(5): 417-419pp.
- Zehra, A., Naqvi, S.B.S. and Ali, S.Q.** 2016. *In vitro* evaluation of antimicrobial effect of extracts of medicinal plant's leaves, *Journal of Medical Microbiology Diagnosis*, 5: 236p.
- Žuntar, I., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Nutrizio, M., Šupljika, F., Poljanec, A., Dubrović, I., Barba, F.J. and Režek Jambrak, A.** 2019, Phenolic and antioxidant analysis of olive leaves extracts (*Olea europaea* L.) obtained by high voltage electrical discharges (HVED), *Foods*, 8: 1–29pp.

TEŞEKKÜR

Yüksek öğrenim hayatıma başladığım ilk günden bu güne, değerli bilgilerini benimle paylaşan, yönlendirmeleriyle bilimsel gelişimime katkıda bulunan, zorlu çalışma sürecinde bana yol gösteren danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Hatice BASMACIOĞLU MALAYOĞLU'na saygı ve teşekkürlerimi bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum. Ayrıca;

Sağlamış olduğu maddi destek ile çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğüne, desteklerinden dolayı Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi'nin yöneticilerine, Yemler ve Hayvan Besleme Bölümü çalışanlarına ve Dr. Zeynep SEMEN'e, çalışmam sırasında tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen doktor öğretim üyesi Sema YAMAN FIRINCIOĞLU, Dr. Engin ÜNAY ve Doç. Dr. Şinasi AŞKAR'a teşekkür ederim.

Daima yanımda olan maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen başta eşim Önal ÖZDEMİR'e ve aileme gösterdikleri sabır ve anlayış için teşekkür ederim.

17 / 06 / 2021

Pınar ÖZDEMİR

ÖZGEÇMİŞ

İlk ve ortaokulu Bağarası Cemil Midilli İlköğretim Okulu'nda, liseyi Foça Cemil Midilli Lisesi'inde tamamladı. Yükseköğretime 2002 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakóltesi Hayvansal Üretim Programı'nda başladı. Çamlı Yem A.Ş.'de 2005 yılında stajını yaptı ve 2006 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakóltesi Hayvansal Üretim Programı'ndan mezun oldu. 2009 yılında E.Ü Fen Bilimleri Enstitüsünde Zootečni Bölümü Yemler ve Hayvan Besleme A.B.D.'da yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl E.Ü Fen Bilimleri Enstitüsünde Zootečni Bölümü Yemler ve Hayvan Besleme A.B.D.'da doktora eğitimine başladı. 2011 yılından itibaren Ankara Uluslararası Hayvancılık araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü'nde araştırmacı yüksek mühendis olarak görev yapmaktadır. Evli ve iki çocuk annesidir.

EKLER

Ek 1. Zeytin Yaprğı Ekstraktının Elde Ediliş şeması



Ek 1. Zeytin yaprağı ekstraktının elde edilış şeması.

