



T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİĞLA YAPRAĞI (*Liquidamber orientalis*)
EKSTRAKTININ, YONCANIN
FERMENTASYONUNA VE METAN ÜRETİMİNE
ETKİSİ**

SALİH EVLİCE

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2021

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİĞLA YAPRAĞI (*Liquidamber orientalis*)
EKSTRAKTININ, YONCANIN
FERMENTASYONUNA VE METAN ÜRETİMİNE
ETKİSİ

SALİH EVLİCE

Bu tez,
Zootekni Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS
derecesi için hazırlanmıştır.

KAHRAMANMARAŞ 2021

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Salih EVLİCE



Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri kanunundaki hükümlere tabidir.

**SIĞLA YAPRAĞI (*Liquidamber orientalis*) EKSTRAKTININ, YONCANIN
FERMENTASYONUNA VE METAN ÜRETİMİNE ETKİSİ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

SALİH EVLİCE

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, sığla ekstraktının yoncanın fermentasyon parametreleri üzerine etkisini *in vitro* gaz üretim tekniği kullanarak belirlemektir. Sığla ekstraktı yoncanın fermentasyon parametrelerini önemli derecede etkilemiştir. Sığla ekstraktı yoncanın gaz üretimini, amonyak üretimini, metabolik enerji ve organik madde sindirim derecesini azaltırken, metan üretimini arttırmıştır. Fermentasyon sonucunda açığa çıkan gaz ve metan miktarı sırasıyla; 99.75 ile 113.8 ml ve 20.32 ile 27.90 ml arasında olmuştur. Fermentasyon sonucunda açığa çıkan gazın metan içeriği %19.97 ile 27.97 arasında değişmiş olup, en yüksek metan içeriği 1.5 ml sığla ekstraktı kullanılan muamele grubunda bulunmuştur. Fermentasyon sonucunda açığa çıkan amonyak 28.95 ile 35.72 mg/dL arasında değişmiş olup, en yüksek amonyak içeriği kontrol grubunda bulunmuştur. Metabolik enerji içeriği ve organik madde sindirim derecesi sırasıyla 9.06 ile 9.71 MJ/ kg KM ve 67.05 ile 72.48 arasında değişmiş olup, yüksek değerler 0.5 ml sığla ekstraktı kullanılan grubunda bulunmuştur. Sonuç olarak, sığla ekstraktının anti-metanojenik etkisinin olmamasına rağmen anti-proteolitik etkisinin olduğu bu yüzden ruminant hayvanların rasyonlarındaki proteinlerin rumende aşırı parçalanmasını önlemek için kullanılabilir. Fakat geniş çaplı uygulama yapılmadan sığla ekstraktının *in vivo* hayvan denemeleriyle test edilmesi gereklidir.

Anahtar kelimeler: sığla ekstraktı, gaz üretimi, anti-proteolitik etki, anti-metanojenik etki

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Zootekni Anabilim Dalı, Şubat/2021

Danışman: Prof. Dr. Adem KAMALAK

Sayfa Sayısı: 40

EFFECT OF ORIENTAL SWEETGUM (*Liquidamber orientalis*)

LEAVES ON THE FERMENTATION AND METHANE

PRODUCTION OF ALFALFA HAY

M.Sc. THESIS

SALIH EVLICE

ABSTRACT

The aim of the current experiment was to determine the effect of sweetgum leaf extract on the fermentation parameters of alfalfa hay using *in vitro* gas production technique. Sweetgum leaf extract had a significant effect on the fermentation parameters of alfalfa hay. Although sweetgum leaf extract has resulted in decrease in gas production, ammonia production, metabolisable energy and organic matter digestibility, sweetgum leaf extract increased the methane production. The gas production and methane production ranged from 99.75 to 113.8 ml and 20.32 to 27.90 ml respectively. The percentage of methane in gas produced during the fermentation ranged from 19.97 to 27.97 % with being highest in treatment with 1.5 ml sweetgum leaf extract. The ammonia production during fermentation ranged from 28.95 to 35 mg/dL with being highest in control group. Metabolisable energy and organic matter digestibility of alfalfa hay ranged from 9.06 to 9.71 MJ/ kg DM and 67.05 to 72.48 % respectively with being highest in treatment with 0.5 ml sweetgum leaf extract. As conclusion, sweetgum leaf extract can be used in ruminant diets to prevent the extensive degradation of protein in rumen due to its anti-proteolytic potential, although sweetgum leaf extract has no antimethanogenic potential. However, before large implication, sweetgum leaf extract should be tested *in vivo* experiments.

Key words: sweetgum leaf extract, gas production, anti-proteolytic effect, anti-methanogenic effect

University of Kahramanmaraş Sutcu Imam

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Animal Science, February/2021

Supervisor: Prof. Dr. Adem KAMALAK

Total pages: 40

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam sırasında bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve destek olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Adem KAMALAK'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalıőmalarım boyunca bana yardımcı olan değerli arkadaşlarım Bilal SELÇUK ve Ali KAYA'ya, maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, daima yanımda olan değerli eőim Sümeyra EVLİCE'ye sonsuz teőekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
3. MATERYAL VE METOD	10
3.1. Sığıla yaprağının hasadı, kurutulması ve öğütülme işlemleri	10
3.2. Metenol etenol karışımının hazırlanması	12
3.3. Sığıla yaprağının ekstrak haline getirilmesi	12
3.4. Yöntemler	13
3.4.1. Yoncanın kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi	13
3.4.2. Yoncanın kuru madde içeriğinin belirlenmesi	13
3.4.3. Yoncanın ham kül içeriğinin belirlenmesi	13
3.4.4. Yoncanın ham protein içeriğinin belirlenmesi	14
3.4.5. Yoncanın asit deterjan fiber içeriklerinin belirlenmesi	15
3.4.6. Yoncanın nötral deterjan fiber içeriklerinin belirlenmesi	16
3.4.7. Yoncanın ham yağ analizi	17
3.5. Yoncanın gaz üretiminin belirlenmesi	18
3.6. Yoncanın metan üretiminin belirlenmesi	20
3.7. Yoncanın metabolik enerji içeriğinin belirlenmesi	21
3.8. Yoncanın organik madde sindirim derecesinin belirlenmesi	21
3.9. Rumen sıvısının amonyak içeriğinin ve PH'sının belirlenmesi	21
3.10. İstatistik analiz	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4.1. Çiçeklenme dönemi hasat edilmiş yoncanın besin madde kompozisyonları	23
4.2. Sığıla yaprağı ekstraktının yoncanın fermentasyonuna etkisi	23
4.3. Sığıla yaprağı ekstrak dozuyla gaz üretimi arasında ilişki	24
4.4. Sığıla yaprağı ekstrak dozuyla metan üretimi (ml) arasındaki ilişki	24
4.5. Sığıla yaprağı ekstrak dozuyla gazın metan içeriği (%) arasında ilişki	25

4.6. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla amonyak üretimi arasında ilişki	26
4.7. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla metabolik enerji arasında ilişki	26
4.8. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla organik madde sindirim derecesi arasındaki ilişki	27
4.9. Sığla ekstraktının katkı oranı ile tampon çözeltisinin pH 'sı arasındaki ilişki	28
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	31
KAYNAKLAR	32
ÖZGEÇMİŞ	40



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3. Çiçeklenme dönemi yonca	10
Şekil 3.1. Sığıla yaprağı	11
Şekil 3.2. Sığıla yaprağının öğütülmesinde kullanılan öğütme makinesi	11
Şekil 3.3. Manyetik karıştırıcı	12
Şekil 3.4. Kül fırını	14
Şekil 3.5. Ham protein analizi, yaş yakma ünitesi	15
Şekil 3.6. Destilasyon cihazı	15
Şekil 3.7. ADF ve NDF içeriklerinin belirlenmesinde kullanılan cihaz	16
Şekil 3.8. Soxhlet cihazı	18
Şekil 3.9. Rumen sıvısının manyetik karıştırıcı ile karıştırılması işlemi	18
Şekil 3.10. Gaz ölçümlerinin yapılması	20
Şekil 3.11. Bilgisayara bağlı S-AGM 1010 cihazı	20

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 4.1. Çiçeklenme döneminde hasat edilen yonca otunun besin madde içeriği.....	23
Çizelge 4.2.Sığla yaprağı ekstraktının yoncanın fermentasyonuna etkisi	23
Çizelge 4.3. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla gaz üretimi arasında ilişki	24
Çizelge 4.4. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla metan üretimi (ml) arasında ilişki	25
Çizelge 4.5. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla metan içeriği (%) arasında ilişki	25
Çizelge 4.6.Sığla yaprağı ekstrak dozuyla amonyak üretimi arasındaki ilişki.....	26
Çizelge 4.7. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla metabolik enerji içeriği arasında ilişki	27
Çizelge 4.8. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla organik madde sindirim derecesi arasında ilişki ...	27
Çizelge 4.9. Sığla ekstraktının katkı oranı ile tampon çözeltisinin pH'sı arasındaki ilişki..	28

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADF	: Asit deterjan fiber
CH₄	: Metan
C₁₄H₂₈O₂	: Miristik asit
C₃₆H₆₂O₁₁	: Monensin
CO₂	: Karbondioksit
GÜ	: Gaz üretimi
H	: Hidrojen
H₂SO₄	: Sülfürik asit
HK	: Ham kül
HP	: Ham protein
HY	: Ham yağ
ME	: Metabolik enerji
NDF	: Nötral deterjan fiber
NH₄	: Amonyak
OMD	: Organik madde sindirim derecesi
SHO	: Standart hata ortalaması
HCl	: Hidroklorik asit
UYA	: Uçucu yağ asidi

1. GİRİŞ

Ülkemizde hayvancılığın geliştirilmesi için çözülmesi gereken sorunların temelinde kaliteli, maliyeti düşük ve fazla miktarda kaba yem gereksiniminin düzenli olarak karşılanamaması gelmektedir. Hayvan besleme fizyolojisine uygun olması yanında az maliyetli ve çokça kaba yem üretilmesi, maliyeti yüksek olan yoğun ya da kesif yemlerin hayvan beslemede kullanım oranı düşecektir. Hayvancılık işletme maliyetlerinin en fazla yem girdisi olduğu bilinmektedir. Buna göre kaba yem maliyetleri düştüğü takdirde bu işletmelerin kar oranları da buna bağlı artacaktır. (Alçıçek, 1995; Bilgen ve ark., 1996).

Merada var olan ve merayı oluşturan temel bitkiler ruminant hayvan yetiştiriciliği açısından önemi büyüktür, fakat bu bitkilerin içerikleri ve bileşimi ile ilgili yetiştiricilik açısından değerlendirildiğinde çok fazla kayda değer bir çalışma yapılmadığı görülmektedir. Merayı oluşturan bu bitkilerin araştırılması ruminant hayvan yetiştiriciliğinde önemli olduğu kadar, otlakların ve çayırların ıslah edilmesi ile ilgili yeni değerlere ulaşılmasına büyük ölçüde katkı sağlayacak ve ülke hayvancılığının gelişmesini sağlayacaktır (Özkan, Ç , Kamalak, A , Şahin, M , Canbolat, Ö , 2018).

Ruminant hayvanlardaki performansın düşmesi ve insanların ihtiyacı kadar protein alamamasının sebeplerinden bir tanesi de düşük maliyetli kaba yem içeriğinin istenilen nitelikte ve hayvan performansı açısından kabul edilebilir düzeyde üretilmediğinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. (Avcıoğlu ve ark., 2000; Alçıçek, 2001).

Metan ve amonyak, ruminantlarda rumen fermentasyon sürecinin enerji kaybına neden olan ve sağlık açısından zararlı ürünleridir. Bu ürünlerin bir diğer zararlı etkisi; metan, karbondioksitten daha güçlü bir sera gazı olduğundan çevresel sorunlara yol açmaktadır. Bu sebeple, ruminant mikrobiyologları ve beslenme uzmanları, yem dönüşüm verimliliğini artırmak ve metan üretimini azaltmak için ruminal mikrobik ekosistemi bu yönde sevk etmektedir. Geçmiş yıllardaki araştırmaların birçoğu, antimikrobiyal bileşiklerin ruminal fermentasyon üzerindeki etkilerini temelde iyonoforlar ve antibiyotikler üzerine yoğunlaşmışlardır. (Russell, 1987).

Ruminant hayvanların rumenlerinde besin elementlerinin anaerobik fermentasyonu sonucunda karbondioksit (CO₂) ve hidrojenin (H₂) metanojen bakteriler tarafından metana (CH₄) dönüştürme olayına metanogezis(metan oluşumu) denir. (Görgülü ve ark., 2009, Klieve ve Hegarty 1999). Yem ile birlikte elde edilen bürüt enerji oranı içindeki metan enerjisi oranı %2-12 kadardır. (Canbolat ve ark., 2011). Erişkin bir büyükbaş hayvanın

rumeninde bir günde meydana gelen metan 300 litre/gün ortalama değerlerdedir.(Breves ve Leonhard-Marek, 2000). Bu oluşan enerji miktarı yaklaşık 4000 kkal değerlerine varmaktadır ve böylece 550 kg canlı ağırlığı olan bir büyükbaş hayvanın yaşam payı için gerekli olan enerjinin 1/3'üne denk gelmektedir (Aksoy ve ark., 2000). Metan gazı içeriğinde var olan enerjiden geniş getiren hayvanlar yani ruminantlar faydalanamaz ve ağızdan dışarı (ruktus) atılır. Bu sebeple dışarı atılan gaz; ekonomik, çevresel ve hayvan performansı açısından önemli bir kayba yol açmaktadır. (Öztürk, 2008). Dünyadaki toplam ruminantlar tarafından yıllık 80 ile 115 milyon ton arasında yaklaşık olarak üretilen metan gazının küresel ısınmadaki etkisi karbondioksitten (CO₂) 23 kat yüksektir ve bu da insan odaklı metan oluşumunun %15-20'sini meydana getirmektedir (IPCC, 2001). Bu sebeple metanın zararlı etkilerinin azaltma yönündeki çalışmalar önem kazanmıştır. Bu çalışmalar hayvanların performans yapısında rehabilitasyon, enerji kayıplarının azaltılması ve çevreye verdiği zararlı etkilerin de öncelikle üzerinde durulması noktasında öneme sahiptir (Yurtseven, 2010).

Yem içeriklerinde ham besin maddelerinin birlikte sindirilebilir besin madde içeriklerinin tespiti, hayvansal üretim açısından çok önemlidir. Metan üretiminin artması hayvanlar, insanlar ve çevresel etki bakımından büyük bir olumsuzluktur.

Sığıla (*Liquidamber orientalis*), acıfindıklar (Altingiaceae) familyasındandır. Kalın dallı ve geniş tepeli bir ağaç olup, kışın yapraklarını döker ve 20 ile 25 metreye kadar boylanabilir. Taban suyunun yüksek olduğu veya hareketli suyun bulunduğu alanlarda yetişir. Görünüşte çınar ağacına benzer fakat gövde rengi ve dal yapısıyla çınar ağacından ayırt edilir. Ortalama ömrü 200 yıl kadar olup, uzun yıllar yaşayan bir ağaç türüdür. Genellikle yetiştiği topraklar kumlu, sulak ve asidik topraklardır. Yaşlandıkça, kabuk rengi koyulaşarak gövdesinde derin çatlaklar meydana gelir. Ağaç gövdelerinde genellikle patolojik balsam kanalları vardır. Bunun oluşma nedeni herhangi bir yaralanmayla, dolayısıyla dış etkilerden kaynaklanır. Ağaç gövdelerinden alınan balsam kozmetik sektörü ve eczacılık alanlarında değerlendirilir, besin takviyesi olarak tüketilmektedir. Sığıla ağacı kendi türündeki ağaçlar ile ya da diğer türlerdeki ağaçlarla (sıklıkla kızılçam) birlikte karışık ormanlar oluşturur. Günlük Ağacı, Kara Günlük Ağacı, Sığıla Ağacı, Ak Amber, Akan Amber ve Buhur bilinen diğer adlarıdır (Alan, M., Öztürk, H., 2018).

Bu çalışmada, sığıla yaprağının, yoncanın fermentasyonuna, *in vitro* gaz üretimine ve metan üretimine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Moe ve Tyrell (1979), metan oluşumunun ana kaynağı, rumen fermentasyonu sonucunda ortaya çıkan hidrojenidir. Bu sebeple metan üretimini azaltmak için hidrojenin daha çok kullanılması gerekmektedir. Rumen fermentasyon modelini propiyonik asitten yana geliştirmek metan üretiminin azalmasını sağlayabilir. Çünkü propiyonik asit yapısında daha fazlamiktarlarda hidrojen bulunduran bir bileşik olmakla birlikte hidrojenin bu yolla daha fazla kullanımı sağlanmış olur. Yemleme sistemlerinin değiştirilmesiyle organik madde fermentasyonu propiyonik asit yararına değiştirilebilir. Buna ek olarak, hayvanın tükettiği yem kalitesi ile rumen fermentasyon modeli ve metan üretimi arasında çok önemli bağlantı vardır. Örnek olarak yemin hayvan tarafından sindirilebilirliği azaldıkça kg'da sindirilebilir madde miktarı başına metan üretiminin arttığı belirtilmiştir.

Chun-long ve ark. (2007), %50 kaba %50 kesif yem tüketen ve kanül takılan koyunlara intraruminal yolla *Yucca schidigera* ekstraktı vermiştir. Verilen dozlar 0 (Kontrol), 100, 200 ve 300 mg/kg yem şeklinde olmuştur. Bu dozlar sabah 8.00 ve akşam 16.00 saatlerinde uygulanmıştır. Denemenin 15, 16 ve 17. günlerinde rumen örnekleri doz uygulamasından 0, 2, 4, 6 ve 8 saat sonra alınmıştır. Aynı zamanda deneme son aşamasında yani 18 ve 19. günlerde kan örnekleri alınmıştır. Rumen asitliği *Yucca schidigera* dozlamasından etkilenmemiştir. Kontrole göre rumen propiyonat düzeyi %29 artmış, asetik asit düzeyi ise özellikle doz verilmesinden 4 ve 6 saat sonra ve 300 mg/kg yem *Yucca schidigera* uygulamasında %15 ile %19 arasında azalma göstermiştir. Rumen amonyak içeriği doz uygulamasından 2 saat sonra *Yucca schidigera* almayan gruplarda en yüksek seviyeye çıktığı gözlemlenmiştir. Protozo populasyonu en az 300 mg/kg yeme *Yucca schidigera* uygulanan gruplarda olmuştur. Kan serum değerleri tüm gruplarda benzer olmuştur. Amonyak azalması protozoa sayısındaki azalma ile ilgili olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Sahoo ve ark. (1999), Buğday samanı ile ilgili çalışmalarında; buğday samanına bazı kimyasal ilaveler ile metan üretimine olan etkilerini ele almışlardır. Kuzular ile üç ayrı grup oluşturulmuş ve kuzular üre ve kalsiyum hidroksit ile denemiştir. Samana eklenen kimyasal ilavelerin metan oluşumuna ve enerji balansına etkisini araştırmışlardır. Samanın depolama sırasında %4 üre ilave edilmiştir. Diğer bir grupta %3 üre ve %3 kalsiyum hidroksit ilave edilmiştir. Samanlar hayvanlara rastgele yedirilmiştir. Samanların protein

değerleri değişmeyip aynı kalmıştır. Samana kalsiyum hidroksit ve üre ilavesinde kuzularda yem tüketim miktarını artırdığı gözlemlenmiştir. Buna ek olarak sindirim seviyelerinde de iyi yönde bir gelişme meydana gelmiştir. Ürenin doğrudan karıştırılması sprey ile samana eklenmesine karşın daha çok etki ettiği gözlemlenmiştir. Enerji tüketimi bütün gruplar için aynı seviyede olmuştur. Üre ilavesi ve üre + kalsiyum hidroksit ilavesi bu samanlardan yedirilen kuzularda metan üretimi azalmış bununla beraber üre ve kalsiyum hidroksit ilave edilen samanlardan yedirilenlerde sindirim düzeylerinin geliştiği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, samana üre ve kalsiyum hidroksit ilavesi sonrasında metan üretimini azalttığı görülmüştür.

Ruminantlarda fitobiyotikler ile fitokimyasalların metan üretimi açısından hangi oranlarda etki ettiğinin araştırıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur (Broudiscou ve ark., 2000; Busquet ve ark., 2006; Castillejos ve ark., 2006; Bodas ve ark., 2009; Dong 2010). Broudiscou ve ark. (2000)'nın yaptıkları çalışmada, flavonoid içeriği yüksek olan 13 adet bitki ekstraktının fermentasyon ve protozoa sayısına etkilerini araştırmışlardır. *Lavandula officinalis* ile *Solidago virgaurea* ekstraktları fermentasyonu arttırdığı gözlemlenirken, *Equisetum arvense* ve *Salvia officinalis*'in metan üretimini azalttığını görülmüştür. Bodas ve ark. (2009) çalışmalarında; *Carduus pycnocephalus*, *Populus tremula*, *Prunus avium*, *Quercus robur*, *Rheum nobile*, *Salix caprea* adlarında 6 bitki türünün *in vitro* rumen metan oluşumuna etkisini araştırmalarına konu etmişlerdir. *Rheum nobile*, kontrol grubuna oranla metan üretimini % 16 azaltıp, propiyonat/asetat oranı ile uçucu yağ asitlerini arttırarak sindirimi kolaylaştırmış ve düzenlemiştir. Rumende bulunan diğer değerlere olumsuz herhangi bir etkide bulunmadan metan üretimini azaltarak bu bitkiyi araştırmaya değer bir tür konumuna getirmiştir. *Rauwolfia serpentine*, *Indigofera tinctoria* ve *Withania somnifera*'nın fermentasyon üzerinde minimum olumsuz etki değeriyle metanogenezisi baskı altına aldığı görülmüştür (Bhatta ve ark., 2013). Çalışmalar ile metanogenezisin temelde protozoa populasyon yoğunluğu ile ilişkisinin bulunmadığı sonucuna varılmıştır.

Bodas ve ark. (2008), araştırmalarında metan azaltıcı yapılarını incelemek için 450 farklı bitki türünü gözlemlemiş, ruminantlarda yemler için katkı maddesi şeklinde kullanılabilecek bu bitki türlerinin metan azaltıcı özelliği en fazla olan bitki türünün *Rheum nobile* 23 olarak belirlemişlerdir. Hess ve ark. (2004), araştırmalarında *Calliandra* taninlerinin *in vitro* ortamda metan oluşumunu azalttığını belirtmiştir.

In vitro rumen metan üretimi, keçilerde yonca ekstraktı ile pelin (*Artemisiae annuae*) ekstraktı kullanılıp, araştırmacılar tarafından araştırılmıştır. Artı kontrol

grubundaki monensin'e(C₃₆H₆₂O₁₁) rağmen, fitobiyotik gruplarında metan üretimi ve protozoa sayısı azalır, propiyonat konsantrasyonunda ise artmıştır (Dong, 2010).

Bazı fitokimyasalların (trans-cinnamic-trans sinamik, caffeic-kafeik, p-coumaric acid-p-kumarik asit, catechin hydrate ruminantlarda *in vitro* metan üretimine olan etkisi araştırma konusu olmuştur. Kafeik ve p-kumarik asitler 6 mM düzeyinde kullanıldığı zaman rumen fermentasyon değerlerini negatif yönde bir etki yapmadan metan üretimini azalttığı görülmüştür. Çalışmada kullanılan fitokimyasalların rumende metan üretimini düşüren etkisi çoktan aza doğru kafeik, p-kumarik, ferulik ve sinnamik asitler şeklinde sıralanmıştır. Fitokimyasalların rumende metan üretimini azaltmasındaki etki anti-protozoal aktiviteleri olduğu görüşü bildirilmiştir (Giuburuncă ve ark., 2014).

Bazı fitokimyasalların metan üretimini azaltmadığı gibi rumen değerlerine negatif yönde etkisi olmaktadır. *Karvakrol, karvon, öjenol, timol ve vanilin* esansiyel yağlarının 3000 ve 5000 mg/L seviyelerinde kullanılmasıyla amonyak ve toplam uçucu yağ asidi (UYA) yoğunlaşması azalma eğilimi göstermiştir (Busquet ve ark., 2006; Castillejos ve ark., 2006). Esansiyel yağlar aşırı miktarlarda uygulandığında bakterisidal etkinlikleri meydana gelirken, az miktarlardaki kullanımında ise bu durum daha aşağı seviyelerdedir (Hart ve ark., 2008).

Bitkilerin ekstraktlarındaki antimikrobiyal ve metan azaltan yapılarının, esansiyel yağların içerisindeki var olan saponin, tanen, terpen ile fenilpropanoid kaynaklı olduğu görülmüştür (Piacente ve ark., 2005). Fazla miktarlarda kondanse tanen içeriği bulunan bitki türleri ya direkt olarak tanenler sebebiyle ya da selülozun sindirim oranını düşürmesiyle metan oluşumunu azaltırlar (Tavendale ve ark., 2005). Yapılan araştırmalar ile okaliptüs yapraklarının metan üretimini azalttığı, selülotik bakterilerin miktarını düşürdüğü (McSweeney ve ark., 2001) ve fibrolitik bakteriler adhezyona maruz kalmasıyla (Bento ve ark., 2005) selüloz sindirim oranını düşürdüğü, fibrolitik bakterilerde asetat formasyonundan meydana gelen H (hidrojen) değerini azalttığı sonucuna varılmıştır (Carulla ve ark., 2005). Aynı çalışmada, Carulla ve ark. (2005), çok sayıda bitki bünyesinde var olan tanenler, yeterli miktarlarda kullanıldığı takdirde rumen içinde oluşan proteinlerin değerini düşürerek, duodenuma gidenlerin seviyesini yükselttiğini açıklamışlardır. Bu araştırmacılar yine, oluşturulan rasyonda kuru madde oranını %0.025 seviyesinde, akasya bitkisinden oluşturulan tanen örneğinin %13 oranında metan üretimini düşürdüğünü gözlemlemişlerdir. Aynı durumda Hariadi ve Santoso (2010), rasyona %20 seviyesinde akasya bitkisinden yapılan tanen örneklerinin metan gazı oluşumunu kayda

değer miktarlarda azalttığını gözlemlemiştir. Geçtiğimiz senelerde metan gazından kaynaklanan enerji kayıplarını azaltmak amacıyla, bitki kökenli esansiyel yağların bitkiler (nane, kekik, zencefil, sarımsak, defne vb.) üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda, ruminant hayvanların beslenmesinde sıkça başvurulan kaba yemlerin ana maddelerine (arpa-buğday samanları, kurutulmuş yonca ve mısır slajları) farklı miktarlarda eklenen farklı türlerdeki (biberiye, akasya, asma ve okaliptus) bitki yaprak örnekleri ile rumende oluşan metan gazına etkilerini *in vitro* gaz üretim yöntemi ile saptanmasını hedeflemektedir (Denek, N , Avcı, M , Can, A , Daş, B , Aydın, S , Savrunlu, M, 2014).

Enerji ham maddesi olarak hayvan rasyonunda yağ kullanıldığında rumen içinde var olan mikrobiyal flora ile harcanan enerji değerleri farklılık göstermekte ve metan oluşumu düşmektedir (McGinn ark., 2004; Beauchemin ve McGinn, 2006). Bununla beraber, Giger Reverdin ve ark. (2003), sığırlar üzerinde yapmış oldukları araştırmalarında rasyon içeriğine orta büyüklükteki karbon sayısı olan (8-16 C) yağ asidi ilavelerinin, metan üretim miktarını düşürdüğü, bunun yağdaki doymamışlık seviyesiyle bir orantı bulunduğunu bildirmişlerdir. Odongo ve ark. (2007), araştırmalarında ise, sığırların rasyon içeriklerine $C_{14}H_{28}O_2$ (miristik asit) eklendiğinde metan oluşumu %36 seviyelerinde düşürdüğü ve sütte oluşan yağın derecesini artırdığını bildirmişlerdir.

Araştırmacıların birçoğu rasyondaki kaba yemler ile kesif yemlerin düzeyinin azalması (Johnson ve Johnson, 1995; Lana ve ark., 1998; Reynolds ve ark., 2001; McGinn ve ark., 2004) ve bunların pelet şekline dönüştürülerek hayvana yedirilmesinin, rumen içerisinde oluşan propiyonik asit oranında yükselmeye, metan oluşumun da düşmesine sebep olduğunu söylemişlerdir. Böylelikle; Reynolds ve ark. (2001), etçi düvelerde metan ile oluşan enerji azalmasında yüksek kesif yem alan gruptaki hayvanlarda önemli seviyede azalma gösterdiği görülmüştür. Bir diğer araştırmada, etçi sığırların rasyon içeriklerine kesif yem ilave edilmesinin metan oluşumunu düşürdüğü görülmüştür.

Yemde kalite metan üretiminde önem arz etmektedir. Kalitesiz rasyonlarla hayvanların beslenmesi sonucunda, hayvan için ihtiyaç duyulan mikrobiyal besin kaynağı istenilen seviyede olmaması sonucunda mikrobiyal büyüme de yeterli seviyeye ulaşamamakta ve bunun sonucunda metan (CH_4) oluşumu yükselmektedir (Nevel ve Demeyer, 1977; Sarıpınar ve Sulu, 2005). Karbonhidratlarda bölünebilirlik ne kadar artar ise, metan (CH_4) üretiminde de o düzeyde azalmalar oluşmaktadır. Bu nedenle rasyonlarda probiyotik kullanılmaktadır (Sarıpınar ve Sulu, 2005).

Arařtırmacılar, ruminant rasyonlarına malik asit, fumerik asit ile tuzların ilavesiyle yaptıđı çalıřmada, rumende metan oluřumunda dūřme, propiyonik asit oranında yūkselme, uçucu yađ asidi içerisinde toplam asetik-propiyonik asit dūzeyinin ise dūřtūđūnū gōzlemlenmiřtir (Asanuma ve ark., 1999, Foley ve ark., 2000, Martin ve ark., 2000).

Hücre eperi elemanlarının fermentasyonu yūksel düzeyde asetik-propiyonik asit meydana getirmiř ve çok fazla miktarlarda metan oluřturmuřtur (Beever ve ark., 1989, Moe ve Tyrrell, 1979). Moe ve Tyrrell (1979), suda ōzūnen karbonhidratların fermentasyonu nihayetinde, hücre çeperi elemanlarının fermentasyonu sonunda meydana gelenden daha az metan üretimi oluřtuđu gōzlemlenmiřtir. Johnson ve Johnson (1995), ise arařtırmalarında en fazla bitki hücre çeperi bileřenlerinin, sonraki sūrete řekerler ve en az oranda niřastanın metan üretimi gerçekleřtirdiđi saptanmıřtır. Bununla birlikte Kujawa (1994), kuzular ile yaptıđı çalıřmada, yūksel düzeyde sindirilebilir selūloz ana maddesi olarak řeker pancarı posası kullandıđı, arařtırma sonucunda řeker pancarı posası ne kadar fazla tūketilirse, elde edilen enerjinin metan üretimini % 5'den % 4 oranına dūřürdūđu gōrūlmüřtür. Kaba yemlerin parçalanarak boyutunun kūültölmesi ve pelet řeklinde kullanılması ile hayvanların daha az enerji harcaması sađlanır ve metan üretimi dūřer. Ama bu serbest yemleme sisteminde gōzlemlenmesine rađmen sınırlı yemleme sistemlerinde gōzlemlenememiřtir. Hayvanlarda çok fazla yem kullanımında metan ile kaybolan enerjinin üretilen enerjiye oranı % 40'dan % 20'ye gerilemektedir (Blaxter 1989).

Kaba yemlerin önemi, ruminant hayvanlara enerji, protein, mineral şeklinde dōnūřmesi ile beraber, doymuşluk hissi sağladığından ve ruminant hayvanların rasyonların büyük bōlümünü kapsamaktadır. Hayvansal üretim yapan işletmelerin toplam giderlerinin %60 ile %70'lik bōlümü yemlerden oluşmaktadır. Ülkemizde ayırlar ile meralardan elde edilen, çoğunluğu orta nitelik ile dūřük nitelikte yaklaşık 18 milyon ton kadar kuru ot üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu değer, kesif/kaba yeme olan ihtiyacın 1/3 denk gelmektedir. Bundan dolayı hala geniş çapta mera ile entegre hayvancılık işletmelerini negatif doğrultuda etkileyip, beslemeyle ilgili problemlere yol açmaktadır (řehu, 2001). Ruminantların besin madde gereksinimlerini gidermek için kullanılan yemlerin sindirim dūzeyinin saptanmasında *in vivo*, *in vitro* ve *in situ* şeklinde farklı yöntemler uygulanmaktadır. *In vivo* yönteminde hayvanlar doğrudan kullanılmasından dolayı daha kesin ve güven veren neticeler oluşturulmasına karşın, nispeten daha pahalı, güç, yapılan iřin uzun zaman alması, deneme koşullarının kontrolünün zor olması, numune ihtiyacının çok fazla miktarlarda olması (Qrskov, 1994; Getachew ve ark.,1998) nedeniyle *in vivo*

teknikleri yerine konulabilecek kolay, zahmetsiz ve pahalı olmaması nedeniyle sıklıkla *in vitro* gaz yöntemleri kullanılmaktadır.

Baytok ve ark., 2005; Djordjevic ve ark., 2005; Lorenzo ve O'Kiely, 2008; yaptığı araştırmalar ile antimikrobiyal ve silaj ilavesi için formik asit kullanılması yönünde çalışmalar yapmıştır. Fakat katkı ilavesinde kaba yem ile yoğun yem içeriklerine eklenen formik asit yakın dönemlerde önem kazanan sera gazı salınımlarınayönelik etkileri için araştırma konusu olan proje adedi yeterli değildir. Bundan önce yapılan araştırmalar neticesinde, muhafaza esnasında kaba yemde formik asit kullanımı organik madde sindirimini, *in vitro* gaz üretimi miktarını ve metabolik enerjisinin düzeyini önemli ölçüde yükselttiği kanıtlanmıştır (Hetta ve ark., 2003; Rowghani ve ark., 2008).

Shinkai ve ark., 2010; yaptığı çalışmalarda süt sığırlarının rasyonuna kaju fıstığı bünyesinde barındırılan aktif bileşenlerin eklenmesiyle metan gazı üretiminin %20 düzeyinde azalttığını belirtmişlerdir. Agarwal ve ark., 2009; araştırmalarında rumen sıvısına 0.33, 1 ve 2 µl/ml eklenen nane yağının metan gazı oluşumunu sırayla %19.9, %46.0 ve %75.6 oranında azalttığı belirtmişlerdir. Macheboeuf ve ark., 2014, 246 mg/lt tarçın yağının rumen materyaline eklenmesinin metan gazı üretimini %13 oranında azalttığını belirtmişlerdir. Patra ve ark., 2006; karanfil, rezene, soğan, sarımsak ve zencefil uçucu yağlarının rumen materyaline eklenmesiyle metan gazı oluşumunu düşürdüğünü belirtmişlerdir. Evans ve Martin, 2009; 400 µg/ml düzeyinde timolün rumen materyaline eklenmesinin metan gazı üretimini düşürdüğü sonucuna varmışlardır. Bununla birlikte Beauchemin ve McGinn, 2000; ruminant hayvanların rasyonlarında eterik yağ kullanımı, bütün metan gazı üretiminde, elde edilen KM/kg başına metan(CH₄) üretimi ile kullanılan toplam enerji miktarının yüzdelik olarak metan üretiminde kayba uğrayan enerjide bir farklılık oluşmadığını belirlemişlerdir. Bir diğer çalışmada ise nane, portakal ve kekik yağlarının rumen fermentasyonu üzerindeki etkileri ele alınmış, rasyonlara ilave edilen eterik yağın yükselen seviyeler ile birlikte metan(CH₄) ve karbondioksit(CO₂) sentezleri oluşmasında önemli derecede düşüş olduğu belirtilmiştir (Canbolat ve ark.,2011) . Durum böyle olsa da bu eğilime tabi olmayan bitkilerin bulunduğu belirtilmiştir (Cone ve ark., 1999; Mould ve ark., 1999). Bunun dışında kurutulması ve saklanması esnasında yapılan uygulamalar yemin bileşimini etkilediğinden fermentasyon sonucunda ortaya çıkan gaz seviyesini düşürebilmektedir (Chenost ve ark., 2001).

Hayvan yemlerinin rumen mikro-organizmalarıyla mikrobiyal fermentasyonu sonucunda meydana gelen gazların ölçümüne dayanan yöntem *in vitro* gaz üretim tekniği

denir (Doane ve ark., 1997; Cone ve ark., 1999; Filya ve ark., 2002; Getachew ve ark., 2004; Kamalak ve ark., 2005b).

Yem içeriğindeki lifli yapıların parçalanmasında oluşan gazdeğeri, nişastada parçalanma işlemi sonucunda oluşan gaz miktarından yüksektir (Wolin, 1960).

Kimyasal ve fiziksel yöntemlerin hayvan yemlerine uygulanması neticesinde, fermentasyon esnasında meydana gelen yapılara etki ettiği (Chenost ve ark., 2001; Kamalak ve ark., 2005a), yemlerin oluşturulma esnasında uygulanan yöntemlerin (soldurma, kurutma, öğütme vb.) yemlerde oluşan fermentasyon düzeyini yükselttiği (Sanderson ve ark., 1997), yemlerde yapılan ısı işlemler neticesinde de gaz oluşumunu düşürdüğü görülmüştür (Filya ve ark., 2002).

Yem bileşimlerinin *in vitro* gaz oluşumunu ve bunlar sonucunda ulaşılan değerleri yüksek ölçüde etkilediği sonucuna varılmıştır (Owensby ve ark., 1996).

Yemde var olan ham protein ve nitrojensiz hammadde ölçüleriyle fermentasyonun oluşumu esnasında oluşan gaz değeri ile ters orantılı olup, ham protein ve nitrojensiz hammadde miktarı arttığı zaman metan gazı oluşumunun düştüğü gözlemlenmiştir (Menke ve Steingass, 1988). Yem içeriklerinde minimum %10 seviyelerinde ham protein olması, rumen mikroorganizmalarının faaliyetlerini en üst seviyede sürdürmelerini sağlayacağı bildirilmiştir (Norton, 2003).

3. MATERYAL VE METOD

Bu araştırmada yonca (Şekil 3.), iek oluŐturduėu zamanda toplanıp yem materyali olarak deėerlendirilmiŐtir. iek açtığı zamanda toplanan yonca örnekleri, laboratuvarında kurutma işlemine tabi tutulup, kurutulan yonca örnekleri için ğtlme işlemi 1 mm elekten geçecek Şekilde ayarlanmıŐtır. Yem materyali olarak değerlendirilen yonca örnekleri kimyasal bileşimini saptamak üzere; kuru madde (KM) analizi, ham kül (HK) analizi, ham yağ (HY) analizi, ham protein (HP) analizi, asit deterjan fiber (ADF) analizi ve nötral deterjan fiber (NDF) analizleri uygulanmıştır (AOAC, 1990).



Şekil 3. eeklenme döneminde yonca

3.1. Sığla yaprağının hasadı, kurutulması ve ğtlme işlemleri

Resimde (Şekil 3.1) görülen sığla yaprağı, Kahramanmaraş Stc İmam Üniversitesi AvŐar Kampüsü yerleŐkesinde dikili çeŐitli yaŐlarda bulunan sığla ağaçlarından 2019 yılında 10 adet deėiŐik sığla ağağından, farklı dallardan (yeni sürgünler, yaşlı dallar vb.) toplamda 1300 gram kadar yaprak toplanıp kuru madde içerikleri belirlenmiştir (AOAC, 1990). Sığla yapraklarının diğer bölümü güneŐsiz ortamda

kurutulmuş olup resimdeki (Şekil 3.2.) öğütücüde işlenerek inceleme için hazır halde bulundurulmuştur. Öğütücü sıgla yaprağı örneklerini çok küçük parçalara ayırmış ve bu örnekleri 1 mm 'lik elek çapına eşit hale getirmiştir.



Şekil 3.1. Sıgla Yaprığı



Şekil 3.2. Sıgla yaprağının istenilen düzeyde küçültülmesini sağlayan öğütücü

3.2. Metanol etanol karışımının hazırlanması

Ekstraktı oluşturmak üzere ihtiyaç duyulan 10 ml kadar etanol, 10 ml kadar metanol ile 80 ml kadar saf su 100 ml büyüklükteki uygun bir cam şişe içersinde manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak 1 gün süre ile bırakılmıştır.

3.3. Sığla yaprağının ekstrak haline getirilmesi

Sığla yaprağının kurutulmuş ile kurutulmamış hali farklı kaplarda 5 gram kadar hazırlanıp cam şişelerin içerisine 50 ml kadar % 20 oranında metanol-etanol bileşimi beraber katılarak eklenmiştir. 72 saat süre ile bırakılan bileşim sığla yaprağından ayrıştırılmıştır. Ayrıştırılan bu içerik sığla yaprağının ekstraktıdır.



Şekil 3.3. Karışımın oluşturulmasında kullanılan manyetik karıştırıcı ve vida kapaklı cam şişeler.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Yoncanın kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi

Çiçeklenme döneminde toplanan yonca örneklerinin kimyasal kompozisyonunu belirlemek üzere gerekli analizler yapılmıştır. Bunlar; kuru madde (KM) analizi, ham kül (HK) analizi, ham protein (HP) analizi, ham yağ (HY) analizi, nötral deterjan fiber (NDF) analizi ve asit deterjan fiber (ADF) analizleri olup, bu analizler üç tekerrürlü olarak yapılmıştır.

3.4.2. Yoncanın kuru madde içeriğinin belirlenmesi

Öğütücü ile çok küçük parçalara ayrılmış olan sığla yaprağı örneklerinden 1 gram kadar alınmış ve darası alınan ısıya dayanıklı kaplar ile 105 °C ye ayarlanan etüv içerisinde tamamen kurutulmuş ve daha sonra hassas terazide tartılmıştır. Aşağıda verilen formüller yardımıyla sığla yaprağının kuru madde içeriği belirlenmiştir. (AOAC, 1990).

$$100 - \%Nem = \% Kuru Madde$$
$$((X_1 - da) - (X_2 - da)) / X * 100 = \% Nem$$

X: Sığla yaprağı örneğinin gram olarak değeri

X₁: Sığla yaprağı örn. + örnek kabının darası

da: örnek kabının gram olarak darası

X₂: Kuru madde + örnek kabının gram olarak darası

3.4.3. Yoncanın HK (ham kül) içeriğinin belirlenmesi

Daha önceden kuru maddesi oluşturulan yonca numuneleri ısıya dayanıklı porselen krozelerde kül fırınına konulmuştur. Ham kül fırınında (Şekil 3.4.) 550 °C de sekiz saat boyunca yakılma işlemine tabii tutulmuştur. Ham kül fırını yeterli derecede soğutulmuş ve daha sonra porselen krozelerin sıcaklığı ortalama 20-21 °C ye indikten sonra tartım işlemleri gerçekleştirilmiştir. Sığla yaprağının ham kül içeriğinin belirlenmesinde aşağıdaki formüllerden yararlanılmıştır (AOAC, 1990).

$$\% HK = ((X_1 - da) - (X_2 - da)) / X * 100$$

X: Örneğin gram olarak değeri

X₁: Sığla yaprağı örneği + kullanılan kabın gram olarak darası

X₂: En son tartım

da: Kap darası

HK: Ham kül (%)



Şekil 3.4. Ham kül fırını

3.4.4. Yoncanın HP (ham protein) içeriğinin belirlenmesi

Yoncanın ham protein içeriğini belirlemek için Kjeldahl metodu kullanılmıştır. Bu metoda göre titrasyon, destilasyon(Şekil 3.5.-3.6.) ve yaş yakma olarak 3 aşamada belirlenmiştir. Sığla yaprağının ham protein içeriğini belirlemek için aşağıdaki formüllerden yararlanılmıştır. (AOAC, 1990).

$$(N) * (fHCL) * (K) * (V) * (100) / (M) * (1000) * (fp) = \% Protein$$

K: 14.007 (Azotta var olan atom yükü)

V: Uygulanan HCl(ml)

N: HCl normalite değeri (0,1)

fHCL: 0.1 N HCl'nin etmeni

fp: Proteine dönüştürme etmeni(6.25)

M:Tartılmış olan toplam yem



Şekil 3.5. Yoncanın ham protein analizi için yaş halde yakılmasını sağlayan ünite.



Şekil 3.6. Yoncanın ham protein ölçümlerinin yapımında kullanılan Destilasyon cihazı

3.4.5. Yoncanın ADF (asit deterjan fiber) içeriklerinin belirlenmesi

20 (C₁₉H₄₂BrN) 1 litre 1 N H₂SO₄ içinde çözünmesiyle asit deterjan fiber çözeltisi(ADF) oluşturulmuştur. Oluşan karışımdan 100 ml alınmış daha sonra ortalama 1 gram kadar içinde yonca örneği (X) olan cam kaba aktarılmıştır. Daha sonra 1 saat kaynatılmış aşağıdaki resimde görülen (Şekil 3.7.) cihazda 1 saat süre ile kaynamaya bırakılmış ve sonrasında uygun cam kaplar ile süzülüp, kuru kısım alınmıştır. İçerisinde asit deterjan fiber(ADF) bulunan kaplar kurutma cihazında 12 saate kadar ve sıcaklığı 80°C' ye ayarlanıp bekletilmiş olup, sonrasında ise desikatörde sıcaklığı düşürülüp, hassas terazide tartım işlemine tabi tutulmuştur (X₁). Asit deterjan fiber(ADF) hesaplamaları için aşağıdaki formül kullanılmıştır.(AOAC,1990).

$$\text{Asit Deterjan Fiber (ADF) (g/kg Kuru Madde)} = (X_1) / (X) * 100$$

X: Örnek yonca miktarı gram olarak değeri

X₁: Birinci tartımın gram olarak değeri



Şekil 3.7. Asit deterjan fiber(ADF) ve nötral deterjan fiber (NDF) içeriklerinin belirlenmesinde kullanılan cihaz.

3.4.6. NDF (Nötral deterjan fiber) içeriklerinin belirlenmesi

$C_{12}H_{25}NaO_4S$ (dodecylsulfatesodium sülfat) 30g, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ (titriplex-III) 18.16 gram, $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ (di-sodiumtetraboratedecahydrate) 6.81 gram, Na_2HPO_4 (di-sodiumhydrogenphosphateanhydrous) 4.56 gram ve 1 litre saf su içerisinde 10 ml etanol pH'sı 6.8-7.2 aralığına ayarlanarak sıra ile karıştırılıp sonrasında saf suda çözündürülerek NDF(nötral deterjan fiber) solüsyonu oluşturulmuştur. Oluşturulan solüsyondan 100 ml alınıp içinde 1 gram (X) yonca örneği var olan cam kap içine eklenip sonra da 1 saat kadar kaynamaya bırakılmıştır. Bundan sonraki aşamada uygun cam kaplar yardımı ile örneklerin sıvısı süzümüştür. Nötral deterjan fiber içeriği bulunan kaplar kurutma cihazında 12 saate kadar ve sıcaklığı $80^{\circ}C$ ' ye ayarlanıp bekletilmiş olup, sonrasında ise desikatörde sıcaklığı düşürülüp, hassas terazide tartım işlemine tabi tutulmuştur (X_1). Nötral deterjan fiber(NDF) hesaplamaları için aşağıdaki formül kullanılmıştır. (AOAC,1990).

$$\text{Nötral Deterjan Fiber(NDF)} \text{ (g/kg Kuru Madde)} = (X_1) / (X) * 100$$

X: Örnek yonca miktarı gram olarak değeri

X_1 : Birincitartımın gram olarak değeri

3.4.7. HY (Ham yağ) içeriğinin belirlenmesi

Sıgla yaprağından 2 gram örnek (X) hassas terazi ile tartılıp *Soxhlet* kartuşuna eklenmiş ve örnek kartuş içinden çıkmaması için kartuş ucu ekstarksiyon bölümünde pamuk yardımı ile sıkılaştırılmıştır. Sonraki aşamada kartuş ile yağ balonları kurutma dolabı içerisinde 95 °C sıcaklıkta 120 dakika kurutma dolabında beklemeye alınmıştır. Bu süre sonunda kurutma dolabından çıkartılan örnekler desikatör ile uygun derecede soğutulup kullanılacak kapların darası alınarak (Y), *Soxhlet* cihazına ekstarksiyon bölümü konulmuştur. Şekil 3.8. de görülen *Soxhlet* cihazında ekstarksiyon bölümü kartuşların birisi tam diğeri ise yarım ölçek gelecek kadar eter eklenmiştir. Daha sonra *Soxhlet* cihazına konulup, gerekli sıcak-soğuk dereceleri 70°C ye sabitlenip çalıştırılmaya başlanmıştır. Burada 4 saat süre ile çalıştırılan cihazın ekstarksiyon bölümündeki eter farklı kaplara alınıp eter ve yağ ayırıştırma işlemleri yapılmıştır. Daha sonra bir saat süre boyunca 95 C° ye ayarlı kurutma cihazında kurutulan içinde yağ bulunan kaplar, desikatöre yardımı ile soğutulup ve tartımları yapılmıştır. (Z) Bunun sonucunda elde edilen değerler aşağıdaki formüle aktarılarak numunenin % ham yağ içeriği belirlenmiştir (AOAC, 1990).

$$\% H. Y. = (Z-Y)/X * 100$$

H.Y.: Ham yağın yüzde (%) olarak ifade edilmesi

X: Sıgla yaprağı örneğinin gram cinsinden değeri

Y: Kullanılan kabın gram olarak dara değeri

C: Örneğin son tartımının gram olarak ifade edilmesi



Şekil 3.8. Yoncanın ham yağ içeriğini belirlemede kullanılan *Soxhlet* sistemi



Şekil 3.9. Rumen sıvısının manyetik karıştırıcı ile karıştırılması işlemi

3.5 Yoncanın gaz üretiminin belirlenmesi

Yoncanın *in vitro* gaz üretimi Menke ve ark., (1979) bildirdiği yönteme göre yapılmıştır. Yaklaşık 0,5 gram yonca örneği 100 ml'lik cam şırınga içerisine eklenerek inkubasyona hazır hale getirilmiştir. Fermentasyonda kullanılacak tamponlanmış rumen sıvısı hazırlanması için 1/2 oranında rumen sıvısı tamponlanmış tampon çözeltiyle karıştırılmıştır.(Şekil 3.9.) Tamponlanmış rumen sıvısından 40 ml alınarak, içerisinde yonca örneği bulunan 100 ml'lik cam şırıngalara transfer edilmiştir. Daha sonra cam şırıngalar 39 °C ayarlanmış su banyosuna (Şekil 3.10.) yerleştirilerek, 24 saatlik fermentasyon başlatılmıştır. Fermentasyonun tamamlanmasıyla birlikte gaz ölçümleri belirlenmiştir. Sığla ekstraktları cam şırıngalara 0.5 ml, 1.0 ml, ve 1.5 ml olarak ilave edilmiştir. Her muamele grubu dörder tekerrürlü olarak yapılmıştır. Ayrıca her muamele grubu için spesifik körler oluşturulmuştur. Net gaz ölçümleri spesifik körlerden elde edilen gazlar düşülerek belirlenmiştir. Fermentasyonda kullanılan tampon çözeltinin hazırlanışı aşağıda detaylı bir şekilde verilmiştir.

3.5.1. Makro element çözeltisi

5.7 g Na_2HPO_4 + 6.2 g KH_2PO_4 + 0.6 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 litre saf su içinde eritilip, çözelti pH'sı 6.8 değerine getirilmiştir.

3.5.2. İz element çözeltisi

13.2 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ + 10.0 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ + 1.0 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ + 0.8 g $FeCl_2 \cdot 6H_2O$ karışım 100 ml saf su içinde eritilme işlemi yapılmıştır.

3.5.3. Tampon çözeltisi

35 g $NaHCO_3$ + 4 g $(NH_4)HCO_3$ 1 litre saf su içinde çözündürülerek, çözelti pH'sı 8.1 değerinde olmuştur.

3.5.4. Resazurin çözeltisi

100 mg Resazurin 100 ml saf su içinde çözündürülerek oluşturulmuştur.

3.5.5. Redüksiyon çözeltisi

2 ml 1.0 N (Normal) $NaOH$ + 285 mg $Na_2S \cdot 7H_2O$ + 47.5 ml saf su içerisinde çözündürülmüş, rumen sıvısını almadan biraz önce hazırlanmış olan bu çözelti tazeliğini kaybetmeden kullanıma alınmıştır.

Çözeltiler aşağıda gösterilen sıra ve miktarda karıştırılıp kullanıma hazırlanmıştır.

474 ml saf su

237 ml makro mineral çözeltisi

0.12 ml mikromineral çözeltisi

1.22 ml resazurin çözeltisi

237 ml tampon çözeltisi

47.5 ml redüksiyon çözeltisi



Şekil 3.10. Yoncada gaz ve metan ölçümlerinin yapılması

3.6 Yoncanın metan üretiminin belirlenmesi

Bir gün sürede fermentasyon sonrası ortaya çıkan gaz şırıngalar yardımıyla alınıp, Şekil 3.11.'de görülen S-AGM 1010 cihazı ile metan içeriği ölçülüp, % ml olarak belirtilmiştir (Goel ve ark., 2008).



Şekil 3.11. Bilgisayara bağlı S-AGM 1010 cihazı

3.7 Yoncanın metabolik enerji içeriğinin belirlenmesi

Yoncanın ham protein içerikleri ile 24 saatlik gaz ölçüm verileri kullanılıp, aşağıda verilen formülde yerine konularak yoncanın metabolik enerji içeriği belirlenmiştir (Menke ve Steingass, 1988).

$$ME(\text{Metabolik Enerji}) (MJ/kg KM) = 24.59 + 0.7984G\ddot{U} + 0.0496 HP$$

GÜ: 24 saatte üretilen gazın mililitre (ml) olarak değeri

HP: Ham proteinin yüzde (%) olarak ifade edilmesi

3.8 Yoncanın organik madde sindirim derecesinin belirlenmesi

Yoncada 1 gün sonunda elde edilen gaz ölçüm verileri, ham protein ile kül içeriği kullanılmış ve verilen formülden yararlanılarak organik madde sindirilme derecesi belirlenmiştir (Menke ve Steingass, 1988).

$$1.68 + (0.1418G\ddot{U}) + (0.073HP) + (0.217EE) - (0.028HK) = OMSD (\%)$$

OMSD: Organik maddenin sindirilme derecesi

GÜ: Gaz üretiminin mililitre olarak ifade edilmesi

HP: Ham protein oranı yüzdeolarak ifade edilmesi

HK: Ham kül içeriği

EE: Eter ekstrak

3.9 Rumen sıvısının amonyak (NH₃) içeriğinin ve PH'sının belirlenmesi

Fermentasyon sonunda tamponlanmış rumen sıvısının PH'sı, PH metre kullanılarak belirlenmiştir. Daha sonra iki katlı tülbentle süzölen tamponlanmış rumen sıvısından 30 ml alınarak kjeldahldestilasyon cihazıyla destilasyona tabi tutulmuştur. Bundan sonraki aşamada elde edilen çözelti titre edilerek tamponlanmış rumen sıvısının amonyak (NH₃) içeriği aşağıdaki formöl ile belirlenmiştir.

$$\text{Amonyak} \left(\frac{mg}{dL} \right) = \frac{(0,1 * 14 * HCl) * 100}{30}$$

HCl: Titrasyonda harcanan HCl miktarı

3.10. İstatistik Analiz

Sığla ekstraktının yoncanın fermentasyonuna etkisini belirlemek için elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalama arasındaki farklar Tukey çoklu karşılaştırma testiyle belirlenmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Çiçeklenme dönemi hasat edilmiş yoncanın besin madde kompozisyonu

Çiçeklenme zamanında hasat edilen yonca kuru otunun kimyasal kompozisyonuna ait parametreler Çizelge 1’de verilmiştir. *In vitro* gaz üretim tekniğinde kullanılan yoncanın besin madde içeriği Selçuk (2020) bildirdiği değerlerle uyumlu olmasına rağmen hücre duvarını oluşturan unsurlar bakımından Canbolat ve ark. (2011) bildirdiği değerlerden düşük bulunmuştur. Bilindiği gibi kaba yemlerin hücre duvarlarının oluşturan unsurlar hasat zamanından önemli derecede etkilenmektedir. Bitki olgunlaştıkça NDF ve ADF içerikleri yükseltmektedir. Bu yüzden iki çalışma arasındaki farkın hasat zamanından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 1. Çiçeklenme döneminde hasat edilen yonca otunun besin madde içeriği

Besin Maddeler	%
Kuru Madde	93.07
Ham Kül	9.61
Ham Protein	18.10
Ham Yağ	4.75
Nötral Deterjan Fiber	47.78
Asit Deterjan Fiber	30.42

4.2. Sığla yaprağı ekstraktının yoncanın fermentasyonuna etkisi

Sığla yaprağı ekstraktının yoncanın fermentasyonuna etkisi Çizelge 2’de verilmiştir. Sığla yaprağı ekstraktının yoncanın fermentasyonunu önemli derecede etkilemiş olup ekstrak dozuna bağlı olarak gaz üretiminde, amonyak üretiminde, metabolik enerji, organik madde sindirim derecesinde ve pH’da düşmeler olmasına rağmen metan üretiminde önemli miktarda artmalar meydana gelmiştir.

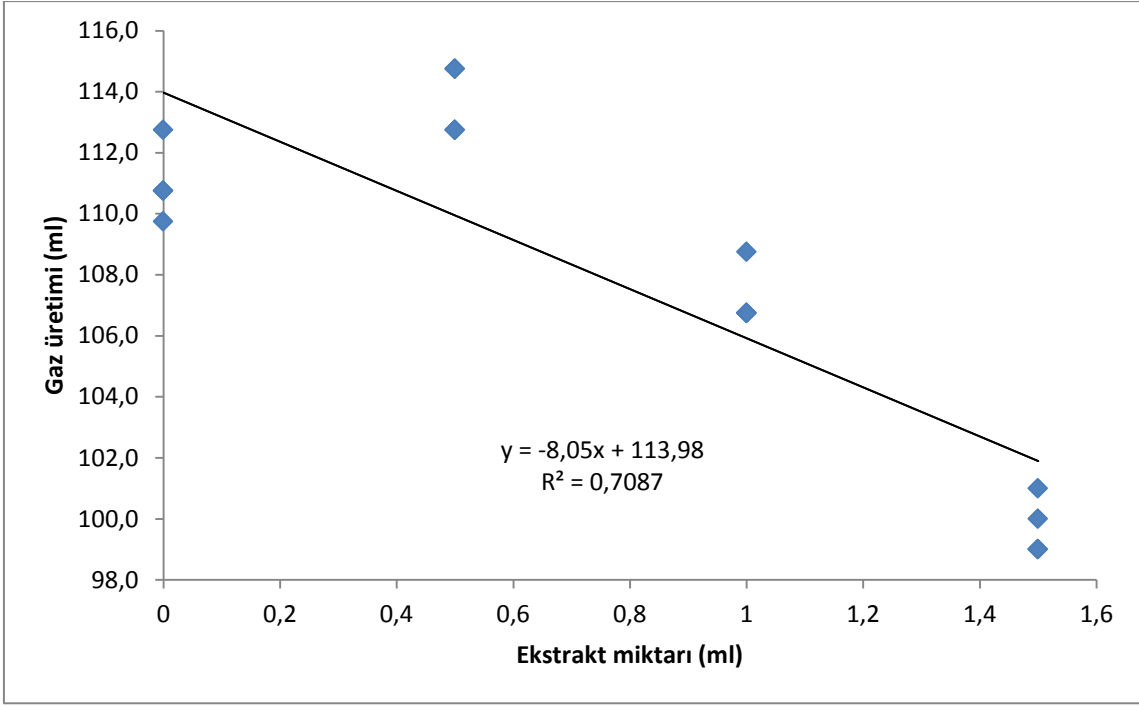
Çizelge 2. Sığla yaprağı ekstraktının yoncanın fermentasyonuna etkisi

Parametreler	Muamele grupları				SHO	Ö.S.
	0.0	0.5	1.0	1.5		
Gaz	111.0 ^b	113.8 ^a	107.30 ^c	99.75 ^d	0.777	***
CH ₄ (ml)	20.32 ^b	25.42 ^b	26.77 ^a	27.90 ^a	0.959	***
CH ₄ (%)	19.97 ^c	22.37 ^c	24.97 ^b	27.97 ^a	0.834	***
Amonyak	35.72 ^a	32.90 ^{ab}	31.95 ^{bc}	28.95 ^c	0.086	***
ME	9.71 ^b	9.89 ^a	9.51 ^c	9.06 ^d	0.044	***
OMSD	71.31 ^b	72.48 ^a	70.03 ^c	67.05 ^d	0.289	***
pH	6.84 ^a	6.39 ^b	6.35 ^b	6.20 ^b	0.086	***

^{abcd} Aynı simgeye sahip ve aynı satırda yer alan ortalamalar arasında fark yoktur ($P < 0.05$). ME: Metabolik enerji (MJ/kg KM), OMSD: Organik madde sindirim derecesi (%). SHO: standart hata ortalaması, Ö.S: Önem seviyesi, *** $P < 0.001$.

4.3. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla gaz üretimi arasında ilişki

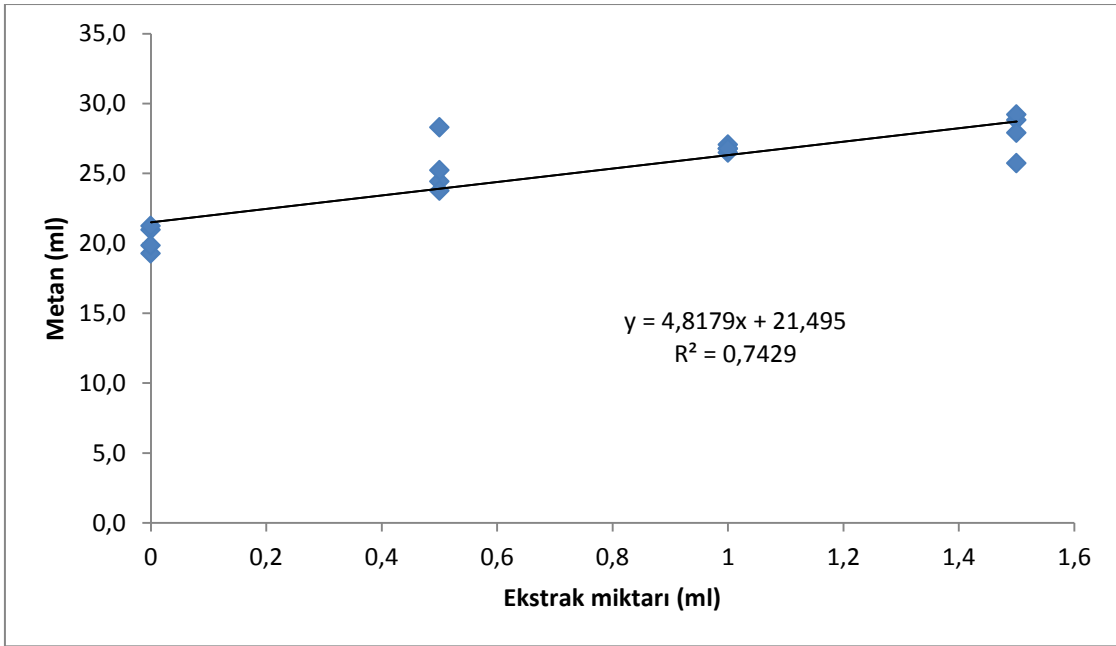
Fermentasyon sonucunda açığa çıkan gaz miktarı 99.75 ile 113.8 ml arasında değişmiş olup en yüksek gaz üretimi 0.5 ml sığla ekstraktı kullanılan muamele grubunda bulunmuştur. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla gaz üretimi arasında ilişki Çizelge 3'te verilmiştir. Görüldüğü gibi bir birim ekstraktın artmasıyla birlikte gaz üretiminde 8.05 ml azalma meydana gelmiştir.



Çizelge 3. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla gaz üretimi arasında ilişki

4.4. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla metan üretimi (ml) arasında ilişki

Fermentasyon sonucunda açığa çıkan metan miktarı 20.32 ile 27.9 0 ml arasında değişmiş olup en yüksek metan üretimi 1.5 ml sığla ekstraktı kullanılan muamele grubunda bulunmuştur. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla metan üretimi(ml) arasında ilişki Çizelge 4'te verilmiştir. Görüldüğü gibi bir birim ekstraktın artmasıyla birlikte metan üretiminde 4.818 ml artma meydana gelmiştir.

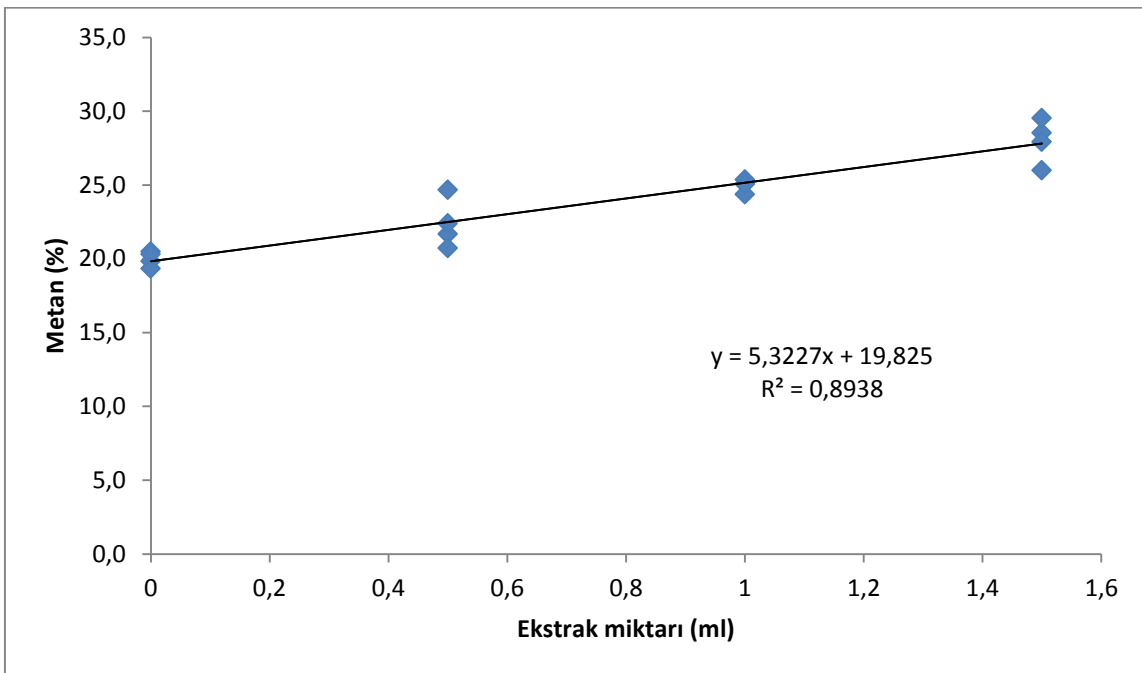


Çizelge 4. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla metan üretimi (ml) arasında ilişki

4.5. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla gazın metan içeriği (%) arasında ilişki

Fermentasyon sonucunda açığa çıkan gazın metan içeriği %19.97 ile 27.97 arasında değişmiş olup en yüksek metan içeriğine 1.5 ml sığla ekstraktı kullanılan muamele grubunda bulunmuştur.

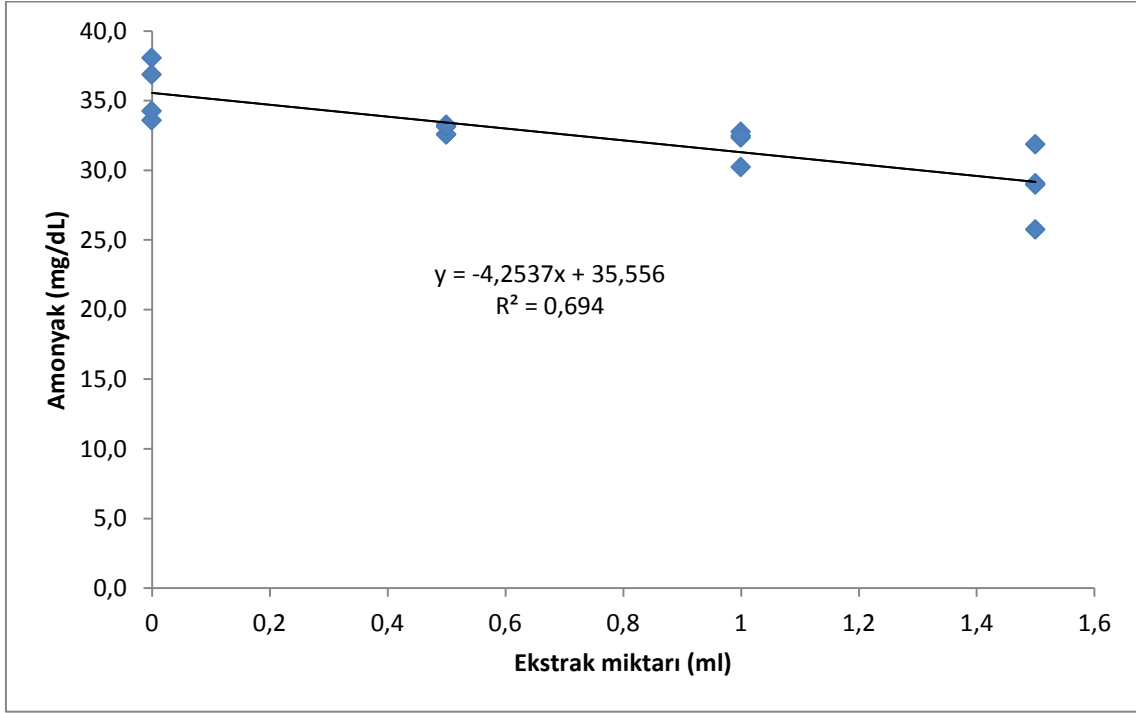
Sığla yaprağı ekstrak dozuyla metan üretimi (%) arasında ilişki Çizelge 5'te verilmiştir. Görüldüğü gibi bir birim ekstraktın artmasıyla birlikte metan içeriğinde 5.322 birimlik artma meydana gelmiştir.



Çizelge 5. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla gazın metan içeriği (%) arasında ilişki

4.6. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla amonyak üretimi arasında ilişki

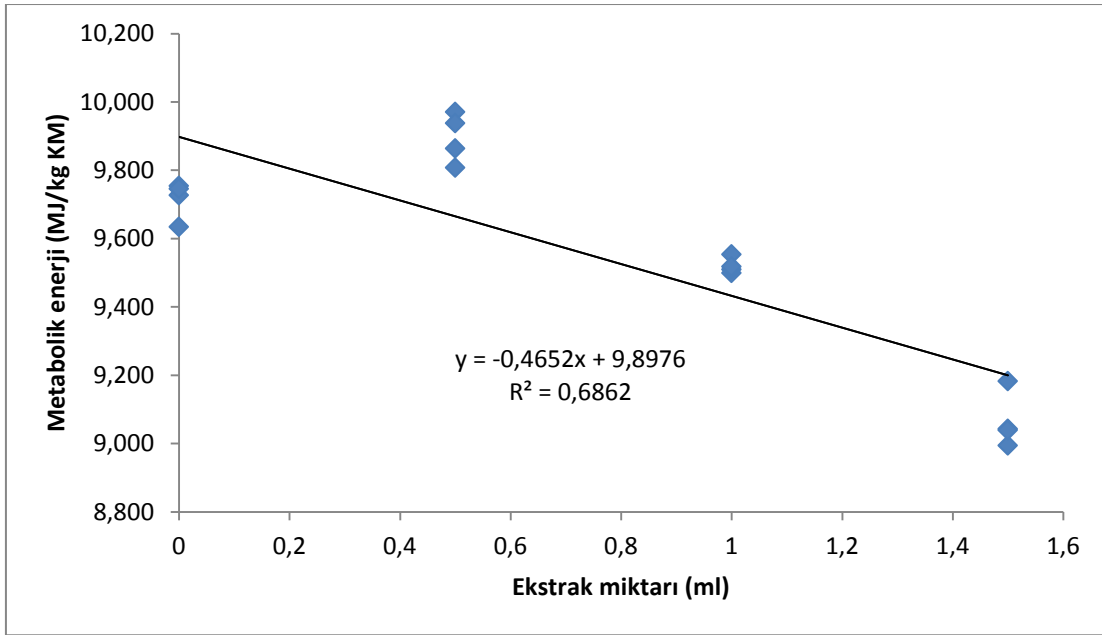
Fermentasyon sonucunda açığa çıkan amonyak 28.95 ile 35.72 mg/dL arasında değişmiş olup en yüksek amonyak içeriği kontrol grubunda bulunmuştur. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla amonyak üretimi arasında ilişki Çizelge 6'da verilmiştir. Görüldüğü gibi bir birim ekstraktın artmasıyla birlikte amonyak içeriğinde 4.253 birimlik azalma meydana gelmiştir.



Çizelge 6. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla amonyak üretimi arasında ilişki

4.7. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla metabolik enerji içeriği arasında ilişki

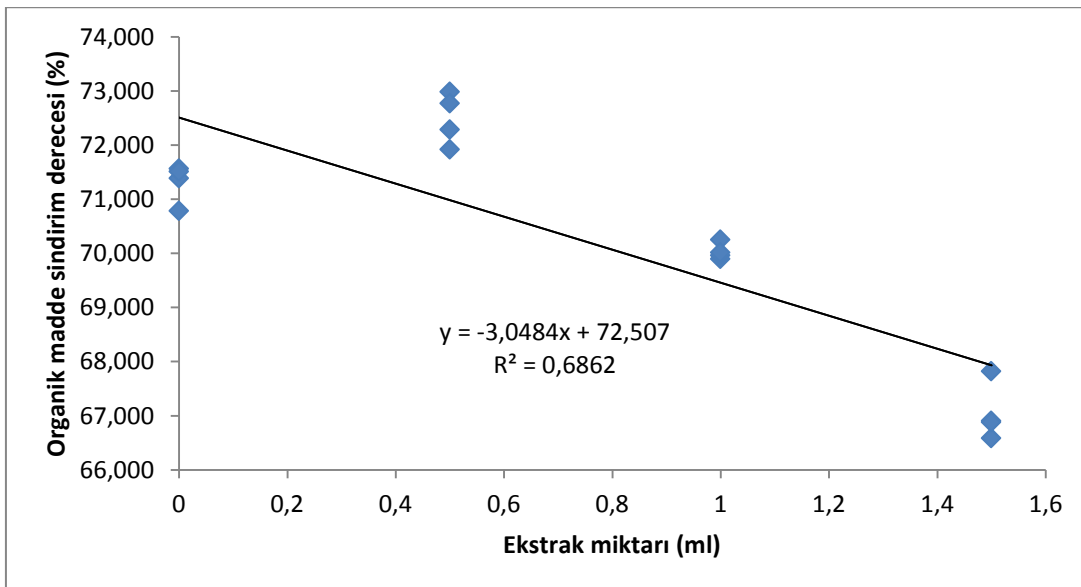
Metabolik enerji içeriği 9.06 ile 9.71 MJ/ kg KM arasında değişmiş olup yüksek metabolik enerji değeri 0.5 ml sığla ekstraktı uygulanan grupta bulunmuştur. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla metabolik enerji içeriği arasında ilişki Çizelge 7'de verilmiştir. Görüldüğü gibi bir birim ekstraktın artmasıyla birlikte metabolik enerji içeriğinde 0.465 birimlik azalma meydana gelmiştir.



Çizelge 7. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla metabolik enerji içeriği arasında ilişki

4.8. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla organik madde sindirim derecesi arasında ilişki

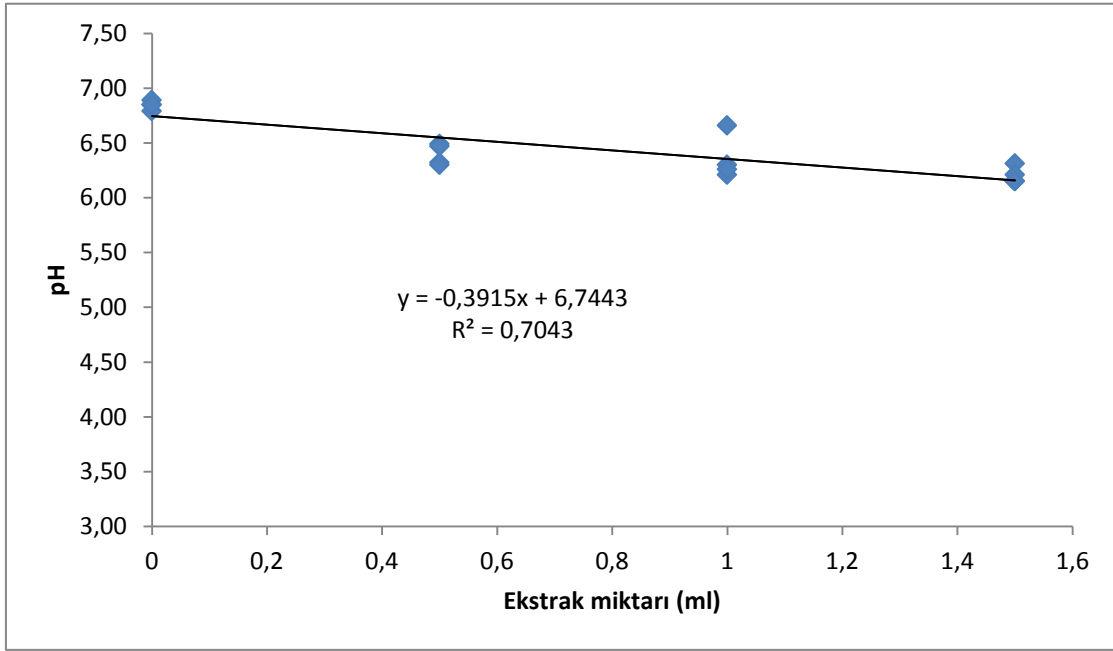
Organik madde sindirim derecesi % 67.05 ile 71.31 arasında değişmiş olup yüksek organik madde sindirim derecesi 0.5 ml sığla ekstraktı kullanılan grupta bulunmuştur. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla organik madde sindirim derecesi arasında ilişki Çizelge 8’de verilmiştir. Görüldüğü gibi bir birim ekstraktın artmasıyla birlikte organik madde sindirim derecesi 3.048 birimlik azalma meydana gelmiştir



Çizelge 8. Sığla yaprağı ekstrak dozuyla organik madde sindirim derecesi arasında ilişki

4.9. Sığla ekstraktının katkı oranı ile tampon çözeltisinin pH'sı arasındaki ilişki

Tampon çözeltisinin pH'sı 6.20 ile 6.484 arasında değişmiş olup en yüksek pH değeri kontrol grubunda bulunmuştur. Sığla ekstraktının katkı oranı ile tampon çözeltisinin pH'sı arasındaki ilişki Çizelge 9'da verilmiştir. Görüldüğü gibi bir birim ekstraktın artmasıyla birlikte tampon çözeltisinin pH değerinde 0.391 birimlik azalma meydana gelmiştir.



Çizelge 9. Sığla ekstraktının katkı oranı ile tampon çözeltisinin pH'sı arasındaki ilişki

Bu çalışmada 0.5 ml sığla ekstraktı kullanılmasıyla gaz üretiminde artış olmasına rağmen 1 ve 1.5 ml sığla ekstraktı kullanımı gaz üretimin azaltmıştır. Bununla birlikte üretilen gazın metan içeriği lineer olarak hem mutlak olarak hem de nispi olarak (%) artmıştır. Başlangıçtaki gaz üretimindeki artış büyük bir ihtimalle ekstraksiyondaki suda çözünebilir karbonhidrattan kaynaklandığı düşünölmektedir. Dozun artmasıyla birlikte gaz üretimindeki azalmasının sebebi ekstraksiyon içerisindeki tanen ve esansiyel yağdan kaynaklandığı düşünölmektedir. Diğer taraftan üretilen gazın metan içeriğinin artmasının sebebi ekstraksiyonda bulunan metanol ve etanoldan kaynaklandığı düşünölmektedir. Spesifik körler oluşturularak metanol ve etanoldan kaynaklanan metan üretimlerinin etkisi bertaraf edilmesine rağmen bütün dozlarda metan üretimleri kontrol gruplarına göre yüksek bulunmuştur. Benzer durum Selçuk (2020) biberiye ekstraktıyla yaptığı çalışmada da rastlanmıştır Metan üretimleri biberiye ekstraktının kullanımına bağlı olarak arttığı

bildirilmiştir. Bu durumun, ekstraksiyon içerisinde bulunan metanol ve etanolun başlangıçta mikrobiyal kompozisyonda arkealar lehine meydana getirdiği fark daha sonra kapatılmamış, spesifik körler muamele grubundan düşürülse bile daha fazla metan üretimine neden olmuştur. Metanol ve etanola bağlı olarak arkealarda ki hızlı bir artış fermentasyonu sırasında açığa çıkan başta asetik asit olmak üzere diğer asitlerin metan üretiminde kullanıldığı göstermektedir. Bu çalışmada, fermentasyon sonunda mikrobiyal kompozisyon ve uçucu yağ asitlerinin kompozisyonları belirlenmiş olsaydı, gaz üretimindeki azalmanın ve metan üretimindeki bu artmanın sebebi daha doğru bir şekilde belirlenebilirdi. Ayrıca bu tip çalışmalarda bitki ekstraksiyonu sonucunda elde edilen solüsyon içerisindeki metanol ve etanol ortamdan tamamen uzaklaştırılması ekstraksiyonların etkilerin daha doğru bir şekilde test edilmesine olanak sağlayacaktır. Ayrıca bu çalışma spesifik körlerin etkisinin bile muamele gruplarından çıkarılmasının yeterli olmadığını ortaya koyması açısından önemlidir. Bu tip çalışmalarda yeni bir düzenlemenin yapılmasının şart olduğu kanısındayız. Çözücü olarak kullanılan metanol ve etanol kontrol grubuna muamele gruplarında olduğu kadar ilave edilmiş olsaydı sadece bitki ekstraktının etkisi test edilmiş olabilirdi. Ayrıca bundan sonraki çalışmalarda bitki ekstraktı elde etmek için çözücü olarak kullanılan kimyasalların rumen mikroorganizmaların özellikle arkealar üzerindeki etkileri test edilmelidir. Rumen mikroorganizmalar üzerinde çok ciddi etkileri olan çözücüler ekstraksiyon içerisinde *in vitro* inkübasyondan önce mutlaka uzaklaştırılmalıdır. Araujo ve ark. (2011), yaptığı çalışmada bitki ekstraktların *in vitro* gaz ve metan üretimine etkisini incelerken spesifik kör oluşturulması gerektiğini, çünkü bu ekstraktların içerisinde fermente olma özelliğine sahip olduğunu ve gaz üretiminin artmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da görüldüğü gibi spesifik körün oluşturulması bile yeterli olmamıştır.

Ruminant hayvanlar tarafından alınan proteinlerin bir kısmı rumende amonyağa kadar parçalanmakta ve mikrobiyal protein sentezinde kullanılmaktadır. Rumende parçalanmayan proteinler ise ince bağırsakta amino asit olarak absorbe edilmektedir. Ruminant hayvanlar protein ihtiyacını mikrobiyal protein ve bypass proteinden karşılamaktadır. Mikrobiyal protein ve bypass protein metabolize olabilir proteini oluşturmaktadır. Amonyanın yanında, mikrobiyal protein miktarını belirleyen en önemli faktörlerden biri de fermentasyon sırasında açığa çıkan ATP formunda enerjidir. Yeterli enerji olmadığında rumende mikrobiyal protein sentezleme etkinliği düşmektedir. Rumende fazla açığa çıkan amonyak idrarla dışarı atılmaktadır. Bu durumda hem proteinler boşuna parçalanmakta hem de çevre kirliliğine neden olmaktadır. Bundan dolayı

bu çalışmada kullanılan sığla ekstraktı proteinlerin aşırı parçalanmasını engellemesi açısından önemli olduğu kanısındayız. Çünkü *in vitro* denemede sığla ekstraktı dozuna bağlı olarak amonyak miktarının azaldığı görülmektedir. Bundan dolayı ruminant rasyonlarında sığla ekstraksiyonun kullanılması durumunda proteinlerin rumende parçalanması önlenebileceğini destekler niteliktedir. *In vitro* deneme sonuçları, sığla ekstraktında bulunan bileşikler proteolitik bakteriler üzerinde negatif etkisinin olduğunu destekler niteliktedir.

Diğer taraftan sığla ekstraktının hem ME hem de OMSD üzerindeki olumsuz etkisi hayvan besleme açısından ele alınması gereken önemli bir husustur. Söz konusu iki parametrede gözlenen bu olumsuzluk hayvanlar tarafından tolere edilebilir seviyede olup olmadığı test edilmelidir. Eğer ruminant hayvanlar ME ihtiyaçlarını karşılamak için yem tüketimini biraz artırarak karşılayabilirse, sığla ekstraktı ruminant hayvanlarda bypass proteini artırmak için kullanılabilir. Unutulmaması gereken diğer bir hususta sığla ekstraktı kullanımıyla birlikte metan üretimi önemli derecede yükseltmesidir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sığla ekstraktının anti-metanojenik etkisinin olmamasına rağmen, anti-proteolitik etkisinin olduğu; bu nedenle ruminant hayvanların rasyonlarındaki proteinlerin rumende aşırı parçalanmasını önlemek için kullanılabilir. Fakat geniş çaplı uygulama yapılmadan sığla ekstraktının *in vivo* hayvan denemeleriyle test edilmesi gereklidir.



KAYNAKLAR

- Aksoy, A., Macit, M., Karaoğlu, M., 2000. Hayvan Besleme Ders Kitabı, Enerji Metabolizması, *Atatürk Üniversitesi Yayınları* No: 220, Erzurum
- Alan, M., Velioğlu, E., Ezen, T., Şıklar, S., Öztürk, H., 2018. Anadolu sığla ağacı (*Liquidambar orientalis Mill.*) beş yaşlı fidanlarında bazı kantitatif karakterlerin çeşitliliği. *Ormanlık Araştırma Dergisi*, 5(1), 74-81 DOI:10.17568/ogmoad.394156
- Alçıçek, A. 1995. Silo yemi; önemi ve kalitesini etkileyen faktörler. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi Yayını*, No. 22.İzmir.
- Alçıçek, A., 2001. Süt ineklerinin yemlenmesinde yeni teknikler. *Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları*, No: 100.
- Agarwal N., Shekhar C., Kumar R., Chaudhary L.C., Karma D.N. Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Animal Feed Science and Technology*, 2009;148: 321–327
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. *15th edition Association of Official Analytical Chemists*, Washington, DC. US.
- Araujo RC., Pires AV, Mourao GB, Abdalla A.I, Sallam SMA. 2011. Use of blank to determine *in vitro* net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers. *Animal Feed Science and Technology*, 166-167:155-162.
- Asanuma, N., Iwamoto, M., Hino, T., 1999. Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 82: 780-787.
- Avcioğlu, R., Soya, H., Açıkgöz, E., Tan, A., 2000. Yem bitkileri üretimi. *Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi*, 1. Cilt, 17-21.01.2000, Milli Kütüphane Ankara, s:567-585.
- Baytok E, Aksu T, Karşlı MA, Muruz H. 2005. The effects of formic acid, molasses and inoculant as silage additives on corn silage composition and ruminal fermentation characteristics in sheep. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29: 469- 474.
- Bento MHL, Acamovic T, Makkar HPS, 2005: The influence of tannin, pectin and

- polyethylene glycol on attachment of 15N-labelled rumen microorganisms to cellulose. *Animal Feed Science and Technology*, 122, 41–57.
- Beauchemin K.A., McGinn S.M. Methane Emissions From Feedlot Cattle Fed Barley or Corn Diets. *Journal of Animal Science* 2005, 83: 653-661.
- Beauchemin, K.A., and McGinn, S., 2006. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *Journal of Animal Science*, 84: 1489.
- Beever DE, Camrnell SB, Sutton JD, Spooner MC, Haines MJ, Harland JI, 1989. The effect of concentrate type on energy utilization in lactating cows. *Proceedings of the 11th International Symposium*.
- Bhatta, R., Saravanan, M., Baruah, L., Sampath, K. and Prasad, C. 2013. Effect of plant secondary compounds on *in vitro* methane, ammonia production and ruminal protozoa population. *Journal of Applied Microbiology*, 115: 455-465.
- Bilgen, H., Alçiçek, A., Sungur, N., Eichhorn, H., Walz, O.P. 1996. Ege bölgesi koşullarında bazı slajlık kaba yem bitkilerinin hasat teknikleri ve yem değeri üzerine araştırmalar. *Hayvancılık'96 Ulusal Kongresi*, Cilt 1, 781-789.
- Blaxter K L, 1989. Energy metabolism in animals and man. *Cambridge University Press*, New York
- Bodas R, López S, Fernández M, García-González R, Rodríguez AB, Wallace RJ, González JS, 2008. *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 245-58.
- Bodas R., López S., Fernández M., García-González R., Wallace R. J., González J. S. (2009). Phytogetic additives to decrease *in vitro* ruminal methanogenesis. In : Papachristou T.G., Parissi Z.M., Ben Salem H., Morand-Fehr P. *Nutritional and foraging ecology of sheep and goats*. Zaragoza: CIHEAM / FAO / NAGREF. p. 279-283
- Breves, G., Leonhard-Marke, S., 2000. Verdauungsvorgänge in den Vormägen, in: W. V. Engelhardt and G. Breves. *Physiologie der Haustiere*. Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart, 345-354
- Busquet, S. Calsamiglia, A. Ferret, C. Kamel, 2006. Plant Extracts Affect *In Vitro* Rumen Microbial Fermentation, *Journal of Dairy Science*, Volume 89, Issue 2.

- Canbolat Ö., Kalkan H., Karaman Ş. Filya İ. Esansiyel yağların sindirim, rumen fermentasyonu ve mikrobiyal protein üretimi üzerine etkileri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2011; 17(4): 557-565.
- Carulla, J. E., Kreuzer, M., Machmuller, A., Hess, H. D. (2005). Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56. p. 961-970
- Chenost, M., Aufrere, J., Macheboeuf, D. 2001. The gas-test technique as tool for predicting the energetic value of forage plants. *Animal Research*, 50: 349–364.
- Chun-Long, L., Zhong – Qiu., L., Juan, Du., and An-Shad, S., 2007. The Effect of *Yucca schidigera* Extract on Ruminant Fermentation and Parameters Traits. *Sheep Agricultural Sciences in China*, 6(1): 121-128.
- Cone, J.W., Van Gelder, A.H., Soliman, I.A., De Visser, H., Van Vuuren, A.M. 1999. Different techniques to study rumen fermentation characteristics of maturing grass and grass silage. *Journal of Dairy Science*, 82: 957–966.
- Denek, N , Avcı, M , Can, A , Daş, B , Aydın, S , Savrunlu, M . (2014). Kimi Kaba Yemlerde Farklı Bitki Yapraklarının *In Vitro* Metan Üretimi Üzerine Etkisi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 3 (2) , 59-66.
- Djordjevic N, Grubic G, Popovic Z. 2005. Effects of the use of formic acid in different doses as the conservant in lucerne ensiling. *Journal of Dairy Science*, 50: 123-129.
- Doane, P.H., Schofield, P., Pell, A.N. 1997. Neutral detergent fiber disappearance and gas and volatile fatty acid production during the *in vitro* fermentation of six forages. *Journal of Animal Sciences*, 75: 3342–3352.
- Dong, G. Z., Wang, X. J., Liu, Z. B., Wang, F. (2010). Effects of phytogetic products on *in vitro* rumen fermentation and methane emission in goats. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 19, 218-229.
- Evans J.D., Martin S.A. Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Current Microbiology*, 2000; 41: 336-340.
- Filya, İ., Karabulut, A., Canbolat, Ö., Değirmencioğlu, T., Kalkan, H. 2002. Bursa bölgesinde yetiştirilen yem hammaddelerinin besleme değeri ve hayvansal organizmada optimum değerlendirme koşullarının *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerle saptanması üzerinde araştırmalar. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bilimsel araştırmalar ve incelemeler serisi*. No:25, Bursa, 1-16s.

- Foley, P.A., Kenny, D.A., Callan, J.J., Boland, T.M., O'Mara, F.P., 2009. Effect of DL-malic acid supplementation on feed intake, methane emission, and rumen fermentation in beef cattle. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 87: 1048-1057.
- Getachew, G., Blümmel, M., Makkar, H.P.S., Becker, K. 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assesment of nutritional quality of feeds: a review. *Journal of Animal Feed Science and Technology*, 72: 261–281.
- Getachew, G., Depeters, E.J., Robinson, P.H. 2004. *In vitro* gas production provides effective method for assessing ruminant feeds. *California Agriculture*, 58(1):54- 58.
- Giger-Reverdin, P. Morand-Fehr, G. Tran, 2003. Literature survey of the influence of dietary fat composition on methane production in dairy cattle, *Livestock Production Science*, Volume 82, Issue 1, Pages 73-79, 0301-6226.
- Giuburuncă, M., Cristel, A., Cocan, D., Constantinescu, R., Răducu, C., 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): 78-82.
- Goel, G. ; Makkar, H. P. S. ; Becker, K., 2008. Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and fenugreek (*Trigonella foenum-graecum L.*) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. *Journal of Animal Feed Science and Technology*, 147 (1-3): 72-89
- Görgülü, M., Koluman Darcan, N., Göncü, S., 2009. Hayvancılık ve küresel ısınma. V. Ulusal Hayvan Besleme Kongresi, 30 Eylül-3 Ekim, Çorlu
- Hariadi, B.T. and Santoso, B. (2010), Evaluation of tropical plants containing tannin on *in vitro* methanogenesis and fermentation parameters using rumen fluid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90: 456-461.
- Hart, K. J., Yanez-Ruiz, D. R., Duval, S. M., McEwan, N. R., Newbold, C. J. (2008). Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 147, 8–35.
- Hetta M, Cone JW, Gustavsson AM, Martinsson K. 2003. The effect of additives in silages of pure timothy and timothy mixed with red clover on chemical composition and *in vitro* rumen fermentation characteristics. *Grass Forage Sciences*, 58: 249-257.
- Hess HD, Valencia FL, Monsalve LM, Lascano CE, Kreuzer M, 2004. Effects of tannins in

- calliandra calothyrsus and supplemental molasses on ruminal fermentation *in vitro*. *Journal of Animal Feed Sciences*, 13, 95- 8.
- IPCC, Climate Change 2001: The Scientific Basic Contribution of Working Group I to The Third Assesment Report of The Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), *Cambridge University Press*, Cambridge, 2001 a.
- Johnson, K.A., Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73: 2483-2492.
- Kamalak, A., Canbolat, O., Gurbuz, Y., Erol, A., Ozay, O. 2005a. Effect of maturity stage on chemical composition, *in vitro* and *in situ* dry matter degradation of tumbled hay (*Gundelia tournefortii* L). *Small Ruminant Research*, 58:149-156.
- Kamalak, A., Canbolat, O., Gurbuz, Y., Özkan, C.Ö., Kizilsimsek, M. 2005b. Determiration of nutritive value of wild mustard, *Sinapsis arvensis* harvested at different maturity stages using *in situ* and *in vitro* measurements. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 18(9): 1249–1254.
- Kujawa MA, 1994. Energy partitioning in steers fed cottonseed hulls and beet pulp. Ph.D. Thesis, Colarado State University Fort Collins, Colorado.
- L. Castillejos, S. Calsamiglia, A. Ferret, 2006. Effect of Essential Oil Active Compounds on Rumen Microbial Fermentation and Nutrient Flow in *In Vitro* Systems, *Journal of Dairy Science*, Volume 89, Issue 7.
- Lana, R.P., Russell, J.B., Van Amburgh, M.E., 1998. The role of pH in regulating methane and ammonia production, *Journal of Dairy Science*, 76: 2190–2196.
- Laurent-Philippe Broudiscou, Yves Papon, Anne F Broudiscou, 2000. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes, *Animal Feed Science and Technology*, Volume 87, Issues 3–4.
- Lorenzo BF, O’Kiely P. 2008. Alternatives to formic acid as a grass silage additive under two contrasting ensilability conditions. Irish. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 47: 135-149.
- Macheboeuf, D., Coudert, L., Bergeault, R., Laliere, G., Niderkorn, V. 2014. Screening of plants from diversified natural grassland for their potential to combine high digestibility and low methane and ammonia production. *Animal Research*, 8(1):1797-1806.

- Martin, S.A., Sullivan, H.M., Evans, J.D., 2000. Effect of sugars and malate on ruminal microorganisms. *Journal of Dairy Science*, 83: 2574-2579.
- McGinn, S.M., Beauchemin, K.A., Coates, T., Colombatto, D., 2004. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *Journal of Animal Science*, 82: 3346-3356.
- Menke, K.H., Steingass, H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research Development*. 28:7-55.
- Meo, P.W., and Tyrell, H.F., 1979. Methane production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 62: 1583–1586.
- Mould, F.L., Smith, T., Owen, E., Phipps, R.H. 1999. The relationship between DOMD and gas release estimated *in vitro* using the reading pressure technique system for maize silages of different maturity. *Proceedings British Society Animal Science*, p. 150.
- McSweeney CS, Palmer B, Bunch R, Krause DO, 2001: Effect of the tropical forage Calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 78–88.
- Norton, B.W. 2003. The nutritive value of tree legumes. <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Pub/licat/Gutt-shel/x5556e0j.htm>, pp. 1–10, (23.10.2003).
- Odongo, N.E., Or-Rashid, M.M., Kebreab, E., France, J., McBride, B.W., 2007. Effect of supplementing myristic acid in dairy cow rations on ruminal methanogenesis and fatty acid profile in milk. *Journal of Dairy Science*, 90(4): 1851-1858.
- Qrskov, E.R. 1994. Recent advances in understanding of microbial transformation in ruminants. *Livestock Production Science*, 39: 53–60.
- Öztürk, H., 2008. Ruminant beslemesinde probiyotik mayalar. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 79:3 37-42.
- Owensby, C.E., Cochran, R.C., Auen, L.M. 1996. Effect of elevated carbon dioxide on forage quality for ruminants. In *Carbon Dioxide, Populations, and Communities*, (edited by Körner, C. Et al.) San Diego: *Academic Press*, pp. 363–371.
- Özkan, Ç , Kamalak, A , Şahin, M , Canbolat, Ö . (2018). Farklı Dönemlerinde Hasat

Edilen Bazı Baklagil Yem Bitkilerinin Sindirim Derecesinin ve Metabolik Enerji Değerlerinin *In Vitro* Gaz Tekniği İle Belirlenmesi. *Black Sea Journal of Agriculture*, 1 (1) , 15-19.

Patra A.K., Karma D.N., Agarwal N. Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*, 2006; 128: 276-291.

Piacente S, Coratza P, 2005: L'associazione Nazionale "Geologia & Turismo". Per una nuova Prospettiva di sviluppo culturale e sociale del turismo in Italia. Atti del Convegno "Giornate del turismo 2003". Novara. 7-8 maggio 2003, 383-390.

Reynolds, C.K., Tyrrell H.F., Reynolds, P.J., 2001. Effects of diet forage to concentrate ration and intake on energy metabolism in growing beef heifers: whole body energy and nitrogen balance and visceral heat production, *The Journal of Nutrition*, 121: 994-1003.

Rowghani, E.brahim & Zamiri, Javad & Seradj, Ahmad. (2008). The chemical composition, rumen degradability, *in vitro* gas production, energy content and digestibility of olive cake ensiled with additives. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 9. 213-221.

Russell, J.B. 1987. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: Effects on ion flux and protonmotive force. *Journal of Animal Science*, 64, 1519-1525.

Sanderson, R., Lister, S.A.S., Dhanoa, M. 1997. Effect of particle size on *in vitro* fermentation of silages differing in dry matter content. *Proceedings British Society of Animal Science*. Scarborough, p. 197.

Sarıpınar, D., Sulu, N., 2005. Ruminantlarda probiyotiklerin kullanımı ve rumene etkileri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 11(1): 93-98.

Selçuk, Bilal. Biberiye yaprağı ekstraktının yonca otunun fermentasyonuna ve metan üretimine etkisi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi*, 2020.

Sahoo, B.,Saraswat, M.L., Haque, N., and Khan, M.Y., 1999. Energy balance and methane production in sheep fed chemically treated wheat straw. *Small Ruminant Research*, 35:13-39.

Şehu, A., 2001. Yemlerin tanımı, sınıflandırılması ve değerliliğini etkileyen faktörler.

Yemler, Yem Hijyeni ve Teknolojisi (Eds. Ergün, A., Çolpan, İ., Yıldız, G., Küçükersan, S., Tuncer, Ş.D., Yalçın, S., Küçükersan, M.K., Şehu, A.). ss.1-11.

Shinka, T., Mitsumori M., Enishi O., Takenaka A. and Kobayashi Y. Monitoring of methane and hydrogen production from the rumen of cows fed cashew (*Anacardium occidentale*) nut shell liquid. *Green house Gases and Animal Agriculture (GGAA) Conference*, Banff, Canada. 2010; p. 152

Tavendale MH, Meagher LP, Pacheco D, Walker N, Attwood GT, Sivakumaran S, 2005: Methane production from *in vitro* rumen incubation with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa* and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*, 123/124, 403–419.

Van Nevel CJ, Demeyer DI. Effect of monensin on rumen metabolism *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1977 Sep;34(3):251-257. DOI: 10.1128/aem.34.3.251-257.1977.

Wolin, M.J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *Journal of Dairy Science*, 43: 1452–1459.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı soyadı : Salih EVLİCE
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 20.05.1984
Medeni hali : Evli
Telefon : 0541 826 7741
E-posta : salihevlic@gmail.com.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	KSÜ / Zootečni Bölümü	2021
Lisans	KSÜ / Zootečni Bölümü	2017
Lisans	ÇÜ / Karataş Turizm İşletmeciliği Ve Otelcilik Yüksekokulu	2012
Önlisans	AÖF/Laborant ve Veteriner Sağlık	2010
Lise	Andırın Ç.P.L.	2003

Staj

Göçer Yem / Pazarcık (Haziran – Ağustos 2016)

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Özkan, Ç. Ö., Cengiz, T., Yanık, M., **Evlice, S.**, Selçuk, B., Ceren, B., ve Kamalak, A. (2020). Determination of *In Vitro* Gas Production, Methane Production, Digestibility and Microbial Protein Production of Some Forages and Concentrates Used in Ruminant Animal. *Black Sea Journal of Agriculture*, 23-24.

Hobiler

Futbol, müzik, kitap okumak