

## Üzüm çekirdeği ekstraktının rumen mikroorganizmalarının fermentasyon aktivitesi üzerine *in vitro* etkileri

Hakan ÖZTÜRK<sup>1</sup>, Ahu DEMİRTAŞ<sup>1</sup>, Yasemin SALGIRLI<sup>1</sup>, Öğünç MERAL<sup>2</sup>, İlksin PİŐKİN<sup>1</sup>, Bahri EMRE<sup>1</sup>, Ulvi Reha FİDANCI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye, <sup>2</sup>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 04.02.2011, Kabul Tarihi / Accepted: 01.03.2011

**Özet:** Üzüm çekirdeği sahip olduğu fenolik bileşikler nedeniyle geniş bir yelpazede gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerine antimikrobiyal etkinlik göstermektedir. Bu araştırmanın amacı, Rumen Simülasyon Tekniğini (Rusitec) kullanarak üzüm çekirdeği ekstraktının rumen mikroorganizmalarının fermentasyon aktivitesi üzerine etkilerini belirlemektir. Rusitec sisteminde hacimleri 1000 ml olan sekiz adet fermenter kullanıldı. Her bir fermenterde günlük olarak 5 g arpa samanı ve 5 g konsantre yemden oluşan bir deneme yemi karışımı inkübe edildi. Araştırma 12 gün sürdü. Altı günlük adaptasyon fazından sonra üzüm çekirdeği ekstraktı ilgili fermenterlere 0, 15, 150 ve 1500 mg/gün dozlarında ilave edildi. Üzüm çekirdeği ekstraktının artan dozları ruminal pH, propiyonat üretimi, asetatın propiyonata oranı, toplam protozoon sayısı, amonyak azotu (NH<sub>3</sub>-N) konsantrasyonu ve yem kuru maddesi sindirilebilirliğinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. Hiçbir ilavenin yapılmadığı kontrol fermenterleri ile karşılaştırıldığında üzüm çekirdeğinin 1500 mg/gün dozu, toplam uçucu yağ asidi (UYA), asetat ve bütiratın günlük üretimlerinde artışa yol açtı ( $p < 0,05$ ). Sonuç olarak, bu araştırma koşullarında üzüm çekirdeği ekstraktının rumen mikroorganizmalarının fermentasyon aktivitesi üzerine minimal düzeyde etki ettiği gözlemlendi.

**Anahtar sözcükler:** Fermentasyon, rumen, üzüm çekirdeği ekstraktı.

### Effects of grape seed extract on *in vitro* fermentation activity of the rumen microorganisms

**Summary:** Grape seeds have phenolic compounds with wide-spectrum antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. The objective of this study was to investigate the effects of grape seed extract on fermentation activity of rumen microorganisms using the Rumen Simulation Technique (Rusitec). The rusitec system was equipped with eight fermenters, each with a capacity of 1000 ml. Each fermenter received daily 5 g barley straw and 5 g concentrate. The experiment lasted 12 days. After an adaptation period of 6 days, grape seed extract was added to the respective fermenters at levels of 0, 15, 150 or 1500 mg/day. Increasing level of grape seed extract had no effect on ruminal pH, propionate production, acetate/propionate ratio, total protozoa number, NH<sub>3</sub>-N concentration or dry matter digestibility. However, the addition of 1500 mg grape seed extract increased ( $p < 0.05$ ) the daily production of total volatile fatty acid, acetate and butyrate when compared with the unsupplemented control fermenters. In conclusion, under the conditions of this study, the addition of grape seed extract had only minor effects on the fermentation activity of rumen microorganisms.

**Key words:** Fermentation, grape seed extract, rumen.

### Giriş

Rumendeki mikrobiyal ekosistem üzerine araştırmalar yapan bilim insanları rumendeki mikrobiyal florayı değiştirerek hayvan verimliliğini artırmayı amaçlamaktadırlar. Bu amaçla, yaklaşık 30 yıldır monensin, lasalosid ve laidlomisin propiyonat gibi iyonofor grubu antibiyotikler başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Bu antibiyotikler genel olarak gram pozitif bakterilerde hücre zarını etkileyerek antimikrobiyal etkinlik gösterirler. Gram pozitif bakteriler, gram negatiflere kıyasla rumende daha

fazla amonyak, hidrojen ve laktik asit üretirler. Bu bakımdan gram pozitif bakterilerin baskılanması yem enerjisinin ruminant tarafından daha verimli kullanılmasına aracılık eder (21). Antibiyotiklerin hayvansal üretim sürecinde büyütme faktörü olarak kullanımı, bakterilerde antibiyotiklere karşı dirençlilik oluşturacağı ve hayvansal ürünlerde kalıntı bırakacağı gerekçesiyle 1 Ocak 2006 tarihinden itibaren Avrupa Birliği'ne üye ülkelerde yasaklanmıştır (18). Keza yine Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ile Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) 1997'den beri antibiyotiklerin büyütme faktörü

olarak kullanımlarının potansiyel tehlikesine dikkat çekmektedirler (10). Bu nedenle antibiyotiklere alternatif olabilecek daha güvenli antimikrobiyal maddeler üzerine yoğun bir ilgi oluşmuştur.

Üzüm (*Vitis vinifera*) çekirdeği (+)-kateşinler, (-)-epikateşin, (-)-epikateşin-3-O-galat ve dimerik, trimerik, tetramerik prosiyanidinler gibi monomeric fenolik bileşikler içermekte ve sahip olduğu bu bileşikler sayesinde antitumörjenik, antiviral, antioksidan özellikler göstermektedir (6). Yine yapılan araştırmalarda üzüm çekirdeğinin geniş bir yelpazede gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkinlik gösterdiği belirlenmiştir (15). Ancak üzüm çekirdeği ekstraktının rumendeki mikrobiyal floranın fermentasyon aktivitesi üzerine etkileri ile ilgili yeterli bilgi mevcut değildir.

Bu araştırmanın amacı, yarı-sürekli bir *in vitro* rumen tekniği olan Rusitec sistem ile üzüm çekirdeği ekstraktının artan dozlarına karşı rumen mikroorganizmalarının gösterdiği yanıtı temel fermentasyon parametrelerini belirleyerek ortaya koymaktır.

## Materyal ve Metot

**İnkübasyon tekniği:** Araştırmada yarı-sürekli kapalı bir inkübasyon metodu olan Rusitec (**Rumen Simulation Technique**) tekniği Czerkawski ve Breckenridge'in (11) tanımladığı şekilde uygulandı. Rusitec sisteminde hacimleri 1000 ml olan 8 adet fermenter kullanıldı. Bu fermenterlerde inokulum olarak kesimhanede kesilmiş canlı ağırlıkları yaklaşık 400 kg olan iki sığırdan elde edilen rumen içerikleri kullanıldı. Rumen içerikleri yaklaşık 30 dakikada termo-kaplar içerisinde laboratuara ulaştırıldı. Donör hayvanlar kesim öncesi en az üç hafta boyunca günde 1,8 kg arpa samanı ve 7,2 kg konsantre yem ile beslendiler. Bu rasyon aynı zamanda Rusitec sisteminde de deneme yemi olarak kullanıldı. Tablo 1'de deneme yeminin kimyasal bileşimi verilmiştir. İki sığırdan alınan taze rumen içerikleri laboratuarda karıştırıldıktan sonra 3 katlı steril gazlı bezden süzülerek sıvı ve katı fraksiyonlarına ayrıldı. Çalışmanın ilk günü taze katı rumen içeriğinin 80 gramı ve 5 g arpa samanı ile 5 g konsantre yemden oluşan deneme yemi karışımı, 150 µm por genişliğine sahip 2 adet naylon keseye konuldu. Bu iki kese Rusitec fermenterlerindeki delikli iç kaplara yerleştirildi. Katı rumen içeriği bulunan naylon kese 24 saat sonra deneme yemi karışımı içeren başka bir kese ile değiştirildi. Sistem fermenterlerinde her

zaman 2 adet yem kesesi bulunduruldu ve bunlar 48 saat fermentasyona bırakıldı. Yem keselerinin değişimi sırasında anaerobik şartların devamı için fermenterlere CO<sub>2</sub> gazı uygulandı. *In vitro* inkübasyonun mümkün olduğunca *in vivo* rumen şartlarına benzemesi için Rusitec sistemin fermenterleri sürekli 39°C'lik sabit sıcaklıkta tutuldu ve Tablo 2'de bileşimi verilen, pH'sı 7,40 ve ozmolalitesi 293 mosmol/l olan suni tükürük (tampon solüsyon) ile sıvı döngüsü (*liquid turnover*) sağlandı. Elektrikli motorlar yardımıyla fermenterlerin içindeki delikli iç kaplara dakikada 6 kez piston hareketi yaptırılarak rumen kontraksiyonları taklit edildi ve Rusitec fermenterlerindeki katı ve sıvı fazlar arasında değişim sağlandı. Fermentasyon gazları fermenterlere bağlı gaz keselerinde ve fermenterlerden uzaklaşan rumen sıvıları ise kuru buza yerleştirilmiş erlenmayerlerde toplandı.

**Tablo 1.** Deneme yeminin kimyasal bileşimi.

Besin Maddeleri	Arpa samanı (%)	Konsantre yem (%)
Kuru madde	92	91
Ham protein	4	15
Ham yağ	1	3
Ham selüloz	31	13
Ham kül	7	9

**Tablo 2.** Tampon solüsyonun kimyasal bileşimi.

Kimyasallar	mmol/l
NaCl	28,00
KCl	7,69
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,22
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,63
NH <sub>4</sub> Cl	5,00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	10,00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10,00
NaHCO <sub>3</sub>	97,90

**Deney kurgusu:** Araştırma 12 gün sürdü ve bu süreçte Rusitec sisteminde 8 fermenter eşzamanlı olarak çalıştırıldı. Bu sürenin ilk 6 günü adaptasyon fazı olup bu fazda rumen mikroorganizmalarının *in vitro* şartlara alışması sağlandı. İkinci 6 günlük süre

(7-12. günler) araştırmanın deneme fazını oluşturdu. Bu fazda Rusitec sistemin 8 fermenteri 4 gruba ayrıldı. İlk iki fermentere günde 15 mg, ikinci iki fermentere günde 150 mg ve üçüncü iki fermentere ise günde 1500 mg üzüm çekirdeği ekstraktı ilave edildi. Son iki fermentere hiçbir ilave yapılmayıp kontrol fermenterleri olarak kullanıldı. Araştırmada ticari bir firmadan elde edilen ve gramında 66,7 mg fenolik madde içeren üzüm çekirdeğinin katı ekstraktı kullanıldı.

**Numune toplanması ve analizler:** Araştırmanın deneme fazı boyunca her gün fermenterlerdeki rumen sıvılarının pH değerleri bir pH elektrotu (WD-35801-00, Oakton) ve bağlı olduğu pH metre (Ion 6, Acorn series, Oakton) yardımıyla ölçüldü. Rumen sıvılarının toplandığı erlenmayerlerden  $\text{NH}_3\text{-N}$  ve UYA'ların miktarlarını belirlemek için numuneler alındı.  $\text{NH}_3\text{-N}$  analizi için alınan rumen sıvısı örnekleri doğrudan  $-20^\circ\text{C}$ 'ye konulurken, UYA'ların analizi için alınan 5'er ml rumen sıvıları, 12 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 'den 90  $\mu\text{l}$  eklendikten sonra  $-20^\circ\text{C}$ 'ye konuldu.

$\text{NH}_3\text{-N}$  analizi için alınan numuneler  $4^\circ\text{C}$ 'de çözdürüldükten sonra  $\text{NH}_3\text{-N}$  konsantrasyonu indofenol mavisi yöntemi ile spektrofotometrik olarak belirlendi (9). Bu yöntemde sodyum nitroprusit varlığında amonyak ve fenol sodyum hipoklorit ile okside edilmekte ve mavi renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Oluşan mavi rengin yoğunluğu ise numunedeki  $\text{NH}_3\text{-N}$  konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Uçucu yağ asitleri için alınan numuneler yine  $4^\circ\text{C}$ 'de çözdürüldükten sonra 30 dakika 13000 g'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar, gözenek çapı 0,2  $\mu\text{m}$  olan naylon filtrelerden geçirildi ve 20  $\mu\text{l}$  sıvı HPLC sistemine (Dionex Summit P680, ASI100, UVD170) enjekte edilerek 210 nm'de okundu. HPLC sisteminde asetik, propiyonik ve bütirik asitlerin seperasyonu için Rezex ROA organik asit kolonu (300x7,8 mm, Phenomenex) ve Rezex ROA organik asit koruyucu kolonu (50x7,8 mm, Phenomenex) kullanıldı. Mobil faz olarak 0,005 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  kullanıldı. Kolon ısısı  $60^\circ\text{C}$ 'de sabit tutularak akış hızı dakikada 0,6 ml olarak ayarlandı. Asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asidin 50 mmol/l'lik standartları kullanılarak kalibrasyon yapıldı ve Dionex Chromeleon yazılımı yardımıyla integrasyon yapılarak sonuçlar elde edildi (19). UYA'ların günlük üretim miktarları ise konsantrasyon değerlerinin

erlenmayerlerde biriken günlük miktarları ile çarpılmasıyla hesaplandı.

Protozoon sayısı için fermenterlerden alınan 1 ml rumen sıvısı 1 ml protozoon sayım çözeltisiyle (0,6 g metil yeşili, 8 g NaCl, 100 ml %37'lik formaldehit 1 litrelik balon jojeye konarak üzeri 1000 ml çizgisine kadar distile su ile tamamlanır) karıştırıldı. Işık mikroskobu ve Fuchs-Rosenthal lamı (derinlik: 0,2 mm, küçük kare alanı: 0,0625  $\text{mm}^2$ ) yardımıyla protozoon sayımı yapıldı (14).

Yem kuru maddesi sindirilebilirlik oranı yem maddelerinin fermantasyon öncesi ve sonrası içerdikleri kuru madde miktarları belirlenerek hesaplandı. Bunun için fermantasyona bırakılmamış yem numunesinin nemi  $60^\circ\text{C}$ 'lik etüvde 48 saat bekletilerek uzaklaştırıldı ve kuru madde miktarı belirlendi. Rusitec sisteminde 48 saat fermantasyona bırakılan yem numunelerinin kuru madde miktarları yine aynı biçimde  $60^\circ\text{C}$ 'lik etüvde 48 saat bekletildikten sonra tartılarak bulundu. Kuru madde miktarları arasındaki fark sindirilebilirlik oranı olarak kabul edildi (20).

**İstatistiksel değerlendirme:** İstatistiksel değerlendirme SigmaStat 3.1 (Jandel Scientific, Erkrath, Almanya) istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Çalışmadan elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile analiz edildi. Varyans analizi sonucunda gruplar arasında fark tespit edildiğinde, farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulandı.  $P < 0,05$  anlamlı olarak kabul edildi. Tablo 3'te sonuçlar aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde verildi.

## Bulgular

Tablo 3'te üzüm çekirdeğinin artan dozlarının rümal mikrobiyal fermantasyonun temel parametreleri üzerine olan etkileri görülmektedir. Üzüm çekirdeği ekstraktının artan dozları rümal pH, propiyonat üretimi, asetatın propiyonata oranı (C2:C3), toplam protozoon sayısı,  $\text{NH}_3\text{-N}$  konsantrasyonu ve yem kuru madde sindirilebilirliğinde istatistiksel bir değişime neden olmadı. Ancak üzüm çekirdeği ekstraktının 1500 mg/gün dozu hiçbir ilavenin yapılmadığı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında toplam UYA, asetat ve bütiratın günlük üretim miktarlarında sırasıyla %11, %12 ve %22'lik artışlara ( $p < 0,05$ ) yol açtı.

**Tablo 3.** Üzüm çekirdeği ekstraktının ruminal mikrobiyal fermantasyon parametreleri üzerine *in vitro* etkileri.

Parametreler	Uygulama grupları			
	0 mg	15 mg	150 mg	1500 mg
pH	6,73±0,03	6,74±0,04	6,73±0,03	6,70±0,04
Toplam UYA (mmol/gün)	23,32±1,99 <sup>a</sup>	23,78±3,06 <sup>a</sup>	22,33±1,40 <sup>a</sup>	25,85±2,37 <sup>b</sup>
Asetat	12,24±1,18 <sup>a</sup>	12,64±1,81 <sup>a</sup>	12,01±0,83 <sup>a</sup>	13,73±1,28 <sup>b</sup>
Propiyonat	7,29±0,78	7,13±0,88	6,61±0,60	7,45±0,89
Bütirat	3,79±0,52 <sup>a</sup>	4,01±0,56 <sup>a</sup>	3,70±0,36 <sup>a</sup>	4,63±0,48 <sup>b</sup>
C2:C3	1,69±0,11	1,77±0,33	1,83±0,07	1,85±0,07
Toplam protozoon (x10 <sup>3</sup> /ml)	2,86±0,90	3,28±1,10	3,75±1,00	3,44±0,86
NH <sub>3</sub> -N (mmol/l)	6,19±0,95	6,19±0,47	6,16±1,05	5,76±0,83
KMS (%)	49,92±4,25	50,24±6,75	46,45±4,58	45,91±3,18

Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel farkı ( $p < 0,05$ ) göstermektedir, değerler aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapmadır, C2:C3: asetatın propiyonata oranı, KMS: kuru madde sindirilebilirliği.

## Tartışma ve Sonuç

Üzüm çekirdeği ekstraktı içerdiği fenolik bileşikler nedeniyle geniş bir yelpazede gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkinlik göstermektedir (15). Bu antimikrobiyal etkinlikten sorumlu asıl bileşenin galik asit (galat) olduğu bildirilmiştir (22). Fenolik bileşikler antimikrobiyal etkinliklerini bakteri hücrelerinde sitoplazmik membranın yapısını bozarak, protonların (H<sup>+</sup>) hücre dışına çıkışını baskılayarak, aktif transport sürecinde iyon hareketlerini engelleyerek ve hücre içeriğini pıhtılaştırarak gerçekleştirirler (4).

Sunulan çalışmada, üzüm çekirdeği ekstraktının artan dozları ruminal pH'da istatistiksel bir değişime neden olmamış ve Rusitec sistemin fermenterlerinde ruminal pH değerleri fizyolojik sınırlar içinde küçük dalgalanmalar göstermiştir (Tablo 3). Yapılan literatür taramalarında üzüm çekirdeği ekstraktının rumen mikrobiyal fermantasyonu üzerine etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Ancak yine fenolik yapıda olan ögenol ve karvakrol bileşiklerinin 3, 30, 300 ve 3000 mg/l dozlarından 3 ve 30 mg/l dozları *in vitro* ruminal pH'da bir değişime neden olmazken, karvakrolün 300 ve 3000 mg/l, ögenolün ise 3000 mg/l gibi yüksek dozları ruminal pH'da yükselişe neden olmuştur (5). Araştırmacılar fenolik bileşiklerin yüksek dozlarında gözlenen pH artışını uçucu yağ asitlerinin üretimindeki azalmaya bağlamışlardır. Bu azalma, fenolik bileşiklerin rumen florasını

baskılayarak yem maddelerinin fermantasyonunu sınırlandırmasından kaynaklanmaktadır (1, 12). UYA'ların ruminantın günlük metabolik enerji ihtiyacının yaklaşık %70'ini karşıladığı düşünüldüğünde (23), mikrobiyal UYA üretimindeki bu azalma *in vivo* şartlarda hayvan verimliliği açısından çok da avantajlı olmayacaktır. Mevcut çalışmada, üzüm çekirdeği ekstraktının 1500 mg'luk dozu yem kuru maddesi sindirilebilirliğinde istatistiksel bir fark oluşturmasına rağmen, toplam UYA, asetat ve bütirat üretimlerinde artışa neden olmuştur. Bu durum üzüm çekirdeği ekstraktının rumen ortamında yeterli antimikrobiyal etkinlik gösteremediğine ve ilave edilen 1500 mg üzüm çekirdeği ekstraktının rumen mikroorganizmaları tarafından ek bir substrat olarak kullanıldığına işaret etmektedir. Yaptığımız analizler üzüm çekirdeği ekstraktının yaklaşık %74 oranında organik madde içerdiğini göstermiştir. Bu da günlük olarak ilave edilen 1500 mg ekstrakt ile Rusitec sistemin fermenterlerine deneme yemi dışında günde yaklaşık 1125 mg organik madde ilavesi anlamına gelmektedir.

Bitki ekstraktları ve eterik yağlarının rumendeki mikrobiyal popülasyon üzerine etkileri ile ilgili bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada üzüm çekirdeği ekstraktının hiçbir dozu toplam protozoon sayısında istatistiksel bir değişime neden olmamıştır. Benzer şekilde Newbold ve ark. (17) ile Benchaar ve ark. (3) bitkisel bir eterik yağ karışımının (Crina ruminants, İsviçre) 110 mg/gün ve 750 mg/gün doz-

larının koyunlarda ve süt ineklerinde toplam protozoon sayısını değiştirmedini bildirmişlerdir.

Sunulan araştırmada,  $\text{NH}_3\text{-N}$  konsantrasyonu üzüm çekirdeğinin artan dozlarından etkilenmemiştir. Daha önce yapılan araştırmalarda bitki ekstraktlarının  $\text{NH}_3\text{-N}$  konsantrasyonu üzerine etkileri ile ilgili çelişkili bildirimlere rastlanmıştır. Genel olarak kısa süreli *in vitro* çalışmalarda (24-48 saatlik) bitkisel eterik yağların  $\text{NH}_3\text{-N}$  konsantrasyonunu azalttığı (16, 17), buna karşın mevcut araştırmadaki gibi uzun süreli *in vitro* (7) ve *in vivo* çalışmalarda ise (2, 17) herhangi bir değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir. Araştırmacılar bu sonucu, rumen mikroorganizmalarının eterik yağlara adaptasyon sağlamlarına bağlamışlardır (3). Araştırma prosedürlerinin yanı sıra çalışmalarda kullanılan farklı dozlar da bitki ekstraktlarının  $\text{NH}_3\text{-N}$  konsantrasyonu üzerine olan çelişkili etkilerinden sorumlu olabilir. Örneğin Castillejos ve ark. (8) 24 saatlik bir *in vitro* inkübasyonda ögenolün 5000 mg/l dozunun  $\text{NH}_3\text{-N}$  konsantrasyonunu azalttığını, ancak 5, 50 ve 500 mg/l dozlarının  $\text{NH}_3\text{-N}$  konsantrasyonunu değiştirmedini bildirmişlerdir. Bu durum bitki ekstraktlarının etkilerinin doza bağımlı olduğuna ve ancak yüksek dozlarda etkilerin belirgin bir şekilde gözlemlendiğine işaret etmektedir. Göktürk Baydar ve ark. (13), üzüm çekirdeği ekstraktının %4-20 yoğunluklarda antimikrobiyal bir ajan olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Sunulan araştırmada ise Rusitec sistemin fermenterlerinde (1000 ml hacimli) kullanılan en yüksek üzüm çekirdeği ekstraktının dozu sadece %0,15'lik konsantrasyona tekabül etmektedir. Mevcut araştırmada kullanılan 1500 mg/gün ve yukarıdaki araştırmada kullanılan 5000 mg/l dozları yetişkin bir sığırın rumen hacmi göz önüne alındığında (ortalama 70 litre) 105-350 g/gün gibi yüksek miktarlara denk gelmektedir. Bu durum hem maliyetlerin yükselmesi, hem de uygulanabilirliğinin zor olması açısından üzüm çekirdeği ekstraktının yüksek dozlarının hayvan besleme alanında kullanımı için sınırlayıcı bir faktör olarak göze çarpmaktadır.

Sonuç olarak bu araştırmadan elde edilen bulgular, üzüm çekirdeği ekstraktının yüksek dozlarda dahi rumen florasında yeterli antimikrobiyal etkinlik göstermediğini ve mikroorganizmaların fermentatif aktiviteleri üzerinde minimal etkiler oluşturarak arzu edilen değişiklikleri (toplam UYA ve propiyonat üretiminde artma, asetat/propiyonat oranında azalma, yem sindirilebilirliğinde yükselme

gibi) meydana getiremediğini göstermiştir. Ancak, üzüm çekirdeği ekstraktının ruminantlarda kullanımını oldukça yeni bir konu olması bakımından farklı dozlar ve besleme şartlarında yapılacak *in vitro* ve *in vivo* araştırmalar literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.

## Kaynaklar

1. **Acamovic T, Brooker JD**, (2005). *Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals*, Proc Nutr Soc. 64, 403-412.
2. **Benchaar C, Petit HV, Berthiaume R, Whyte TD, Chouinard PY**, (2006). *Effects of dietary addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation characteristics, milk production, and milk composition in dairy cows*, J Dairy Sci. 89, 4352-4364.
3. **Benchaar C, Petit HV, Berthiaume R, Ouellet DR, Chiquette J, Chouinard PY**, (2007). *Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage*, J Dairy Sci. 90, 886-897.
4. **Burt S**, (2004). *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review*, Int J Food Microbiol. 94, 223-253.
5. **Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C**, (2006). *Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation*, J Dairy Sci. 89, 761-771.
6. **Carpenter R, O'Grady MN, O'Callaghan YC, O'Brien NM, Kerry JP**, (2007). *Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork*, Meat Sci. 76, 604-10.
7. **Castillejos L, Calsamiglia S, Ferret A, Losa R**, (2005). *Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system*, Anim Feed Sci Technol. 119, 29-41.
8. **Castillejos L, Calsamiglia S, Ferret A**, (2006). *Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems*, J Dairy Sci. 89, 2649-2658.
9. **Chaney AL, Marbaeh EP**, (1962). *Modified reagents for determination of urea and ammonia*, Clin Chem. 8, 130-132.
10. **Chaves AV, Stanford K, Dugan MER, Gibson LL, McAllister TA, Van Herk F, Benchaar C**, (2008). *Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs*, Livest Sci. 117, 215-224.
11. **Czerkawski JW, Breckenridge G**, (1977). *Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec)*, Br J Nut. 38, 371-384.
12. **Fraser GR, Chaves AV, Wang Y, McAllister TA, Beauchemin KA, Benchaar C**, (2007). *Assessment of the effects of cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems*, J Dairy Sci. 90, 2315-2328.

13. Göktürk Baydar N, Özkan G, Sağdic O, (2004). *Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (Vitis vinifera L.) extracts*, Food Control. 15, 335-339.
14. Harmeyer J, (1965). *Zur Methodik experimenteller Untersuchungen an Pansenprotozoen*, Zbl Vet Med A. 12, 9.
15. Jayaprakasha GK, Selvi T, Sakariah KK, (2003). *Antibacterial and antioxidant activities of grape (Vitis vinifera) seed extracts*, Food Res Int. 36, 117-122.
16. McIntosh FM, Williams P, Losa R, Wallace RJ, Beever DA, Newbold CJ, (2003). *Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism*, Appl Environ Microbiol. 69, 5011-5014.
17. Newbold CJ, McIntosh FM, Williams P, Losa R, Wallace RJ, (2004). *Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation*, Anim Feed Sci Technol. 114, 105-112.
18. Oeztuerk H, Sagmanligil V, (2009). *Role of live yeasts on rumen ecosystem*. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 116, 244-248.
19. Oeztuerk H, Emre B, Sagmanligil V, Piskin I, Fidanci UR, Pekcan M, (2010). *Effects of nisin and propolis on ruminal fermentation in vitro*, J Anim Vet Adv. 9, 2752-2758.
20. Ørskov ER, Hovell FDB, Mould F, (1980). *The use of the nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs*, Trop Anim Prod. 5, 195-213.
21. Russell JB, Strobel HJ, (1989). *Mini-Review: The effect of ionophores on ruminal fermentation*, Appl Environ Microbiol. 55, 1-6.
22. Shoko T, Soichi T, Megumi MM, Eri F, Jun K, Michiko W, (1999). *Isolation and identification of an antibacterial compound from grape and its application to foods*, Nippon Nogeikagaku Kaishi. 73, 125-128.
23. Yang MG, Monoharan K, Mickelsen O, (1970). *Nutritional contribution of volatile fatty acids from the cecum of rats*, J Nutr. 100, 545-550.