



Çörekotu Tohumu Yağının *In Vitro* Ruminal Biyohidrojenasyonun Belirlenmesi

Araştırma Makalesi/Research Article

Atf İçin: Beyzi, S.B. (2024). Çörekotu Tohumu Yağının *In Vitro* Ruminal Biyohidrojenasyonun Belirlenmesi. Erciyes Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi, 7(2): 155-160

To Cite: Beyzi, S.B. (2024). Determination of *In Vitro* Ruminal Biohydrogenation of Black Cumin Seed Oil. Journal of Erciyes Agriculture and Animal Science, 7(2): 155-160

Selma Büyükkılıç BEYZİ

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Erciyes University, Kayseri, 38039, Turkey

*sorumlu yazar: sbuyukkilic@erciyes.edu.tr

Selma Büyükkılıç BEYZİ, ORCID No: 0000-0002-4622-0645

Yayın Bilgisi

Geliş Tarihi: 04.10.2024

Revizyon Tarihi: 13.10.2024

Kabul Tarihi: 14.10.2024

doi: 10.55257/ethabd.1560517

Anahtar Kelimeler

Çörekotu tohumu yağı,
Biyohidrojenasyon,
asitleri, Fermentasyon
Yağ

Keywords

Black Cumin seed oil,
Biohydrogenation, Fatty
acids, Fermentation

Özet

Bu çalışmada, doymamış yağ asitleri bakımından zengin çörekotu tohumu yağının rasyona farklı oranlarda ilavesi ile *in vitro* ruminal biyohidrojenasyonun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda çörekotu yağı 3 farklı dozda (%1, 2 ve 3) rasyona ilave edilerek 5 tekerrürlü olarak *in vitro* inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonda kullanılan rumen sıvısı 1:9 oranında yapay tükürük ile karıştırılarak inkübasyon sıvısı oluşturulmuştur. Elde edilen karışım hazırlanan yem üzerine ilave edilerek 39 °C'lik su banyosunda inkübe edilmiştir. Çalışmada 0, 3, 6, 12 ve 24. saatlerde inkübasyon sıvılarından örnekleme yapılarak yağ asidi profili ve fermentasyon parametreleri belirlenmiştir. Çalışma sonunda rumen sıvısı yağ asitleri, yemdeki başlangıç ve sonrasındaki yağ asitleri karşılaştırılarak yağ asidi profili değişimleri belirlenmiştir. Biyohidrojenasyonun belirlenmesinde C18:1, C18:2 ve C18:3 yağ asitleri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak yağ ilave edilen gruplarda C18:1 ve C18:2 yağ asitlerinin lineer olarak azaldığı, C18:3 yağ asidinin ise lineer olarak artış gösterdiği belirlenmiş ayrıca yağ ilave edilen gruplarda ruminal fermentasyon parametrelerinin etkilenmediği belirlenmiştir.

Determination of *In Vitro* Ruminal Biohydrogenation of Black Cumin Seed Oil

Abstract

Biohydrogenation is the saturation of unsaturated fatty acids in the rumen by microorganisms. The ratio of saturated fatty acids is high in the products obtained because of this biohydrogenation process in the rumen. However, intermediate products such as conjugated linoleic acid during saturation increase the quality of the products obtained. The aim of this study is to determine ruminal biohydrogenation in black cumin oil, which is rich in unsaturated fatty acids. In the study, black cumin oil was added to the diet in 3 different doses (1, 2, and 3%) for *in vitro* incubation with 5 replications. The incubation fluid was created by mixing rumen fluid and artificial saliva at a ratio of 1:9. The incubation liquid was mixed with the feeds and kept in a 39 °C water bath for 24 hours. Fatty acid profile and fermentation parameters were determined by sampling from this incubation liquid at 0, 3, 6, 12, and 24 hours. At the end of the incubation, fatty acids of the rumen fluid, starting fatty acids in the feed, and post-incubation fatty acids were compared, and it was determined which fatty acid changed. Here, the fatty acids that form the basis for determining biohydrogenation were evaluated individually. These are 18:1, 18:2, and 18:3 fatty acids. As a result, it was determined that C18:1 and C18:2 fatty acids decreased linearly in oil-added groups, while C18:3 fatty acids increased linearly. It was determined that the addition of black cumin seeds to the ration did not affect the ruminal fermentation parameters.

1. GİRİŞ

Ruminantlardan elde edilen ürünler, rumende lipoliz ve biyohidrojenasyon işlemleri yoluyla, rumende yağ asitlerinin doyurulması sonucu yüksek oranda doymuş yağ asitleri (YA) içerir. Rasyondaki YA profili çoğunlukla doymamış yağ asitlerinden oluşurken; rumenden ayrılan lipitlerin YA profili çoğunlukla doymuş yağ asitlerinden oluşmaktadır. Bu nedenle ruminantlardan elde edilen ürünlerde doymuş YA oranı yüksektir. Ancak doymamış YA'nin doyurulması sırasında konjuge linoleik asit (KLA) gibi bazı sağlık açısından oldukça faydalı bazı yağ asitleri de açığa çıkmaktadır. Ruminant ürünlerinde KLA konsantrasyonunun artırılmasında rasyonda yapılan değişiklikler en iyi yol olarak bilinmektedir. Bu bakımdan rasyonlarda farklı yağ asidi profiline sahip yağlar kullanılabilir. Ancak kullanılan yağ kaynakları ve miktarı rasyonun YA kompozisyonunu değiştirebilir ve rumende mikrobiyal popülasyonun biyohidrojenasyon aktivitesine karşı farklı cevaplar verebilir.

Önceki çalışmalar incelendiğinde; Kevin ve ark., (2012) ineklerde yaptıkları çalışmada, rasyona balık yağı ilavesinin (0-75-150-300g/gün) rumen biyohidrojenizasyonuna etkisi araştırılmış ve rumen biyohidrojenizasyon ara ürünlerinde tek veya çift bağ yapan trans yağ asitlerinde balık yağı katılmasında doza bağlı olarak artış sağlandığını tespit etmişlerdir. Donovan ve ark., (2000) rasyonda %1'den az balık yağı kullanıldığında süt veriminin arttığı, %2 kullanıldığında ise süt veriminin düşmesine karşın, en yüksek doymamış yağ asitleri ve KLA içeriğine ulaşıldığı gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde rasyona %1-4 arasında doymamış yağ asidi ilavesinin rumende veya in vitro olarak doymamış yağ asidi üretimi profilini etkilediği belirlenmiştir (Buccioni ve ark., 2015; Cozma ve ark., 2015; Pirondini ve ark., 2015; Bayat ve ark., 2018; Gómez-Cortés ve ark., 2019; Kliem ve ark., 2019). Dolayısıyla bu çalışmanın amacı doymamış yağ asidi bakımından zengin içeriğe sahip çörek otu yağının %1, 2 ve 3 düzeyinde ilavesinin ruminal yağ asitleri değişimi ve ruminal fermantasyon parametreleri üzerine etkileri belirlemektir.

2. MATERYAL VE METOT

Çalışmada kullanılan çörekotu tohumu serbest piyasadan temin edilmiş ve soğuk sıkım yağ cihazında (Sonkaya, SMYP1, Türkiye) yağı çıkarıldıktan sonra çalışmada kullanılmıştır. Yağ elde edildikten sonra yağ asitleri kompozisyonu belirlenmiştir. Ardından %1, %2 ve %3 düzeyinde yeme ilave edilerek substratın yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi amacıyla yağ asidi analizi yapılmıştır. Araştırmada kullanılan çörekotu (*Nigella sativa*) tohumu %32-40 ham yağ ve bu yağın %75-85'i ise doymamış yağ asidi içermektedir. Araştırmada substrat olarak kullanılan rasyon kuru maddede %8,6 arpa samanı, %45,9 yonca otu, %14,4 arpa, %12,9 ayçiçeği tohumu unu, %2,9 buğday kepeği, %15,1 mısır, %0,1 tuz ve %0,3 mineral içermektedir.

In Vitro İnkübasyon

Rumen sıvısı 4 adet geçmişi bilinen sağlıklı besi sığırının kesimi sonrası kesimhaneden rumen içeriği elde edilmiştir. Her hayvandan alınan rumen sıvısı eşit oranda karıştırılmıştır. Alınan rumen sıvısı 4 katlı bez peynir torbasından geçirildikten sonra 1:9 oranında yapay tükürük ile karıştırılmış ve inkübasyon sıvısı oluşturulmuştur. Bu inkübasyon sıvısından 0, 3, 6, 12 ve 24. saatlerde örnekleme yapılarak yağ asidi profili ve fermantasyon parametreleri belirlenmiştir.

250 ml'lik cam şişelere (pyrex) 300 mg yem örneği tartılmıştır. Üzerine hazırlanan inkübasyon sıvısından 200 ml ilave edilmiş ve 39 °C'de su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. 0, 3, 6, 12 ve 24. saatin sonunda yağ asidi profili ve fermantasyon parametrelerinin belirlenmesi amacıyla inkübasyon sıvısından örnek alınmıştır.

Hazırlanan şişeler karbondioksitle muamele edilip kapatıldıktan sonra özel yapılmış 60'lı su banyosuna konulmuştur. Gaz üretimine bağlı olarak her üç saatte bir gaz çıkışına müsaade etmek amacıyla kapaklar açılmış, tekrar karbondioksitle muamele edilerek kapak kapatılmıştır. İnkübasyonun ardından şişe içeriği sindirimin sonlandırılması amacıyla soğuk su banyosunda bulunan plastik tüplere aktarılmış ve kurutulana kadar derin dondurucuda (-18 °C) muhafaza edilmiştir. Kurutma işlemi için liyofilizatör (TRS, Teknosem, Türkiye) kullanılmıştır.

İnkübasyonun sonunda rumen sıvısı yağ asitleri, yemdeki başlangıç yağ asitleri ve inkübasyon sonrası yağ asitleri karşılaştırılarak yağ asidi profillerinin değişimi belirlenmiştir. Burada biyohidrojenasyonun

belirlenmesinde temel oluşturan yağ asitleri; C18:0, C18:1, C18:2 ve C18:3 ve KLA gibi ara ürünler değerlendirilmiştir. Biyohidrojenasyonun hesaplaması Sinclair ve ark. (2005) tarafından bildirilen yöntemle göre yapılmış ve her bir yağ asidi için aynı formül kullanılmıştır.

Yağ, Yem Ve Rumen Sıvısında Yağ Asitleri Kompozisyonu Analizi

Öncelikle tüm numuneler freze-dryer (liyofilizatör, TRS Teknosem; Türkiye) kullanılarak kurutulmuş ardından yağ ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu amaçla 0.375 g kurutulmuş örnek 15 ml kloroform-metanol (2:1 vol/vol) ve 375 µL saf su ile karıştırılmıştır (Folch ve ark., 1957). Daha sonra bu ekstraktlar süzülmüş ve 2.2 ml saf su ilave edilerek 800*g devirde santrifüj edilmiş ve üst fazdan örnekler alınmıştır. Alınan bu örneklerde tekrar yıkama işlemi yapılmıştır (30 ml kloroform, 480 ml metanol ve 470 ml NaCl solüsyonu (7.3 g/L su)). Yıkama işleminin ardından yağ içeren fazdan yaklaşık 3 ml alınarak diğer çözücülerin uzaklaştırılması amacıyla tekrar santrifüj edilmiş ve yağ saflaştırılmıştır. Ekstrakte edilen yağ numunelerinden 0,1 – 0,3 g arası tartılarak üzerine 0,5 ml 2N metanollü KOH çözeltisi eklenmiştir. Bu çözelti 10 ml'ye hekzan ile tamamlanmıştır. Daha sonra bu karışım santrifüj cihazında 4000 devirde 10 dk. boyunca santrifüj edilmiş sonrasında tüp içerisindeki çözeltinin üst fazından 1 ml alınarak viallere aktarılmıştır (Fritsche ve Steinhart, 1998). Yağ ekstraksiyonu yapılan ve esterleştirilerek viallere alınan tüm numuneler Gaz Kromatografisi (GC) cihazının otomatik örnekleme kısmına yerleştirilerek her bir vialden 1 µl çözelti GC'ye enjeksiyon yapılmış ve yağ asidi profili belirlenmiştir. Bu amaçla FAMES ve KLA (AOAC 996.06 Standard, FAME Mix cat. # 35077 ve KLA standart cat # 16413) standardı kullanılmıştır. Yağ asitleri analizi, Shimadzu GC 2010 Plus cihazında, alev iyonizasyon dedektörü (FID) ve kapiler kolon (100 m x 0.25 mm ID x 0.250 µm) kullanılarak yapılmıştır. Enjeksiyon: 2.0µL split (split ratio 200:1), 4mm inlet liner (cat.# 20814), enjeksiyon sıcaklığı: 225°C, Taşıyıcı gaz: Hidrojen, Akış hızı: 1.2mL/dk., Fırın sıcaklığı.: 100°C'den (4 dk) 240°C'ye (10 dk) 3°C/dk olarak ayarlanmıştır. GC analizi sonucu yağ asitleri kompozisyonu % olarak ifade edilmiştir.

Rumen Sıvısında Fermantasyon Parametrelerinin Belirlenmesi

İnkübasyon sırasında belirli saatlerde elde edilen rumen sıvıları hızlı bir şekilde pH ölçümünün ardından buzlu suya konularak sindirim işleminin durması sağlanmıştır. Daha sonra elde edilen sıvılar hemen süzülmüştür. Uçucu yağ asitleri konsantrasyonunun ölçülmesi için Erwin ve ark., (1961)'nin metodu kullanılmıştır. Buna göre her numuneden 5 ml alınarak iki damla doymuş HgCl₂ ilave edilerek fermentasyonu durdurulmuştur. Bundan sonra 1ml %25 lik metafosforik asit ilave edilerek iyice karıştırıldıktan ve on dakika bekletildikten sonra, dakikada 5,000 devir hızda 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra şırınga ucu filtreden (0.45 µ) geçirilerek viallere konulmuş ve Gaz Kromatografi cihazına enjekte edilinceye kadar buzlu suda muhafaza edilmiştir. Gaz kromatografide asetik, propiyonik, bütirik, valerik, izobütirik ve izovalerik asit standartları farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak standart eğri oluşturulmuştur. Daha sonra analiz sırasında tutulma zamanlarına göre isimlendirilmiş ve standart eğriden hesaplanan değerle karşılaştırılarak rumen sıvısında bulunan miktarlar hesaplanmıştır.

İstatistik Analizler

Çalışmada kontrol, %1, %2 ve %3 çörekotu ilavesi grupları ile toplamda 4 gruptan elde edilen 5 tekerrürlü sonuçlar one-way-anova ile SPSS (Ver. 22, 2013, Chicago) paket programı kullanılarak varyans analizi yapılmış, ortalamalar arasındaki farklılıkların tespiti için Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. İstatistik önem düzeyi P<0.05 kabul edilmiştir. Sonuçlar her bir örnekleme saati için ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

Rasyona farklı oranlarda katılan çörekotu tohumu yağının 24. saat in vitro ruminal biyohidrojenasyon oranları Tablo 1'de verilmiştir. C18:1 yağ asidi biyohidrojenasyon oranı %65.45 - 69.72 arasında değişmiş olup; kontrol grubu yağ katılan gruba oranla daha yüksek bulunmasına rağmen, yağ katılan grupların ise kendi arasında istatistik olarak benzerliği belirlenmiştir. C18:2 yağ asidinin ruminal biyohidrojenasyonu yağ katılan gruplarda kontrole göre daha düşük, en düşük doz ise %3 çörekotu tohumu yağı katılan grupta gözlenmiştir (P<0.001). C18: 3 yağ asidi bakımından ise, biyohidrojenasyon %85'in üzerinde tespit edilmiş ve en düşük oran

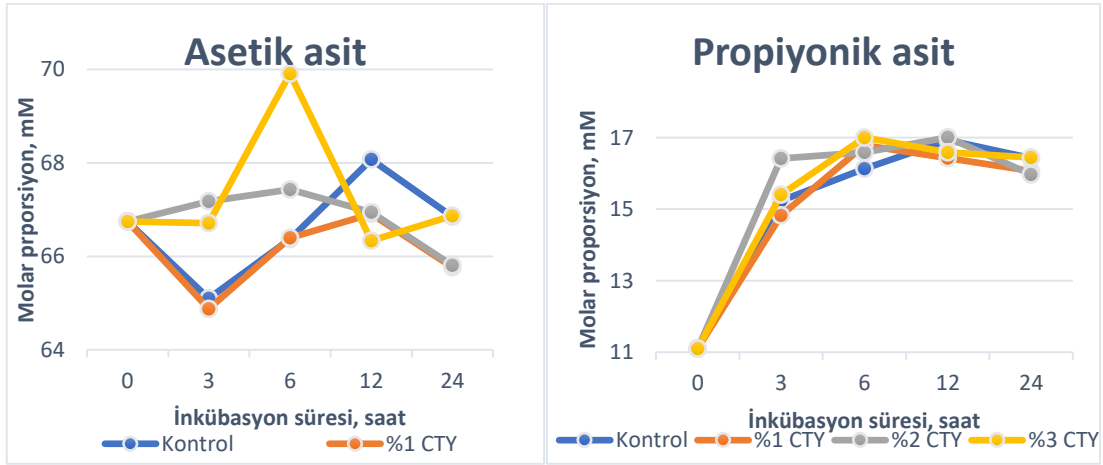
kontrol grubunda tespit edilmiştir (PL<0.001). Bu etkiler lineer olarak tespit edilmiş olup, kuadratik etkiler önemsiz bulunmuştur.

Tablo 1. Rasyon ilave edilen çörekotu tohumu yağının in vitro ruminal biyohidrojenasyona etkisi (24. saat)

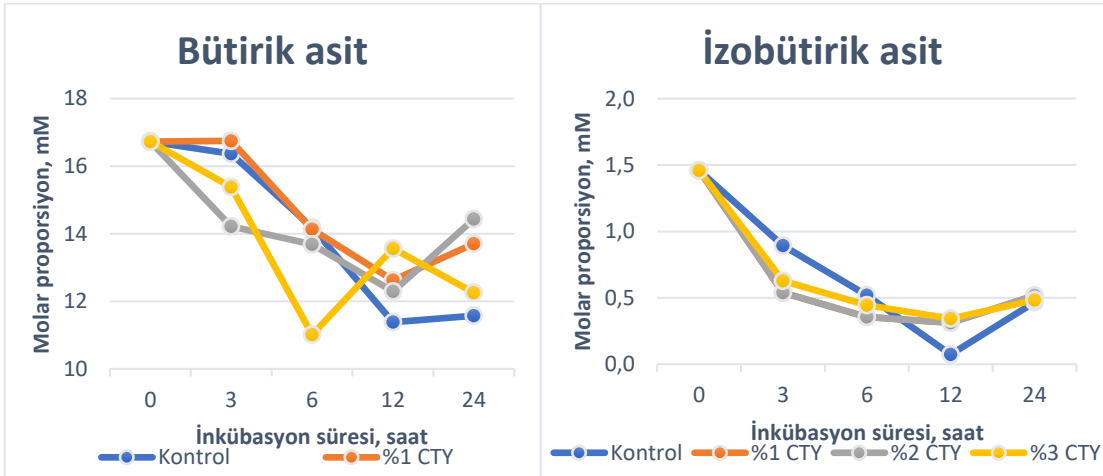
Yağ asitleri	Kontrol	Çörekotu tohumu yağı			SEM	P	
		1%	2%	3%		L	Q
C18:1 n-9	69.72 ^a	65.45 ^b	66.28 ^b	66.31 ^b	0.451	<0.01	0.345
C18:2 n-6	78.16 ^b	76.24 ^a	75.25 ^a	74.98 ^a	0.214	<0.01	0.415
C18:3 n-3	86.48 ^b	87.41 ^a	88.12 ^a	88.69 ^a	0.544	<0.01	0.554
KLA, c-9 t-11	0.285 ^c	1.692 ^a	1.430 ^b	1.637 ^a	0.090	<0.01	0.101

YA: yağ asitleri; KLA: konjuge linoleik asit; SEM: ortalamaların standart hatası; P: önem seviyesi; L: Lineer; Q: Kuadratik

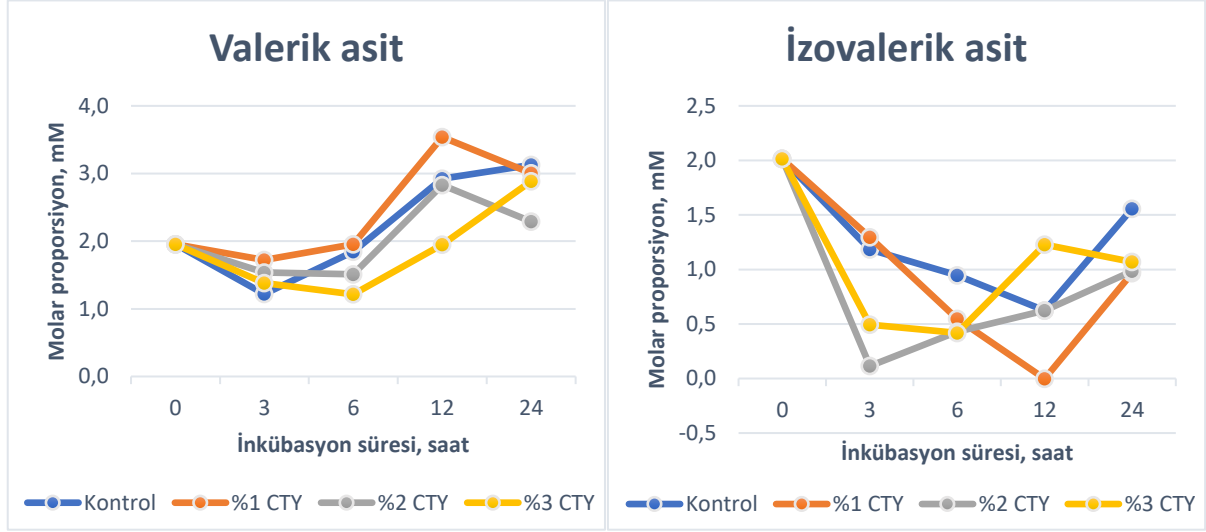
Grafik 1. Rasyona farklı oranlarda ilave edilen çörekotu tohumu yağının (CTY) ruminal asetat ve propiyonat üretimine etkileri



Grafik 2. Rasyona farklı oranlarda ilave edilen çörekotu tohumu yağının (CTY) ruminal bütirat ve izobütirat üretimine etkileri



Grafik 3. Rasyona farklı oranlarda ilave edilen çörekotu tohumu yağının (CTY) ruminal izovalerat ve valerat üretimine etkileri



SONUÇ VE ÖNERİLER

Ruminantlardan elde edilen ürünlerde kalitenin artırılması birçok faktöre bağlı olmakla birlikte bu ürünlerde yağ asidi profilinin sağlık açısından arzulan düzeyde (KLA, omega-3 yağ asitleri gibi) olması için yapılan çalışmalarda, doymamış yağ asitleri kullanımı yaygın olmakla birlikte, en etkili yöntemin çok uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin rasyona ilave edilmesi ile sağlanabileceği bildirilmiştir (Torral ve ark., 2012). Bu çalışma, çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengin olan çörekotu tohumu yağının farklı oranlarda rasyonda kullanımı ile rumen fermentasyonu ve ruminal biyohidrojenasyonu üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla in vitro olarak yürütülmüştür. Mevcut çalışmada yağ asitleri biyohidrojenasyon oranlarının %65-88 arasında değiştiği belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada bu oranın %56-94 arasında olduğu (Huyen ve ark., 2020), bir başka çalışmada ise %73-98.5 arasında değiştiği belirtilmiştir (Sterk ve ark., 2012). Bu çalışmada C18:1n-9'un rumende biyohidrojenasyonu ortalama %66.94; C18:2n-6'nin rumende biyohidrojenasyonu ortalama %76.16; C18:3n-3'ün rumende biyohidrojenasyonu ortalama %87.68 bulunmuştur. Diğer çalışmalarda C18:3n-3 ve C18:2n-6'nin rumende biyohidrojenasyonu ortalama sırasıyla %93 ve %85 olarak bildirilmiştir (Chilliard ve ark., 2007; Bernard ve ark., 2009).

Rasyona farklı oranlarda çörekotu tohumu yağı katılmasının rumen parametrelerini etkilemediği belirlenmiştir (Grafik 1-3). Rasyonda kullanılan yağ kaynağının bireysel ve toplam UYA oranları

üzerindeki etkisinin olmadığı bir çalışmada gösterilmiştir (Ding ve ark., 2017). Yapılan başka bir çalışmada rasyona 30 g/kg yağ ilavesinin ruminal pH, bireysel ve toplam UYA oranları oranlarını değiştirmedini bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2008). Bir başka çalışma ise rasyona yağ ilavesi ile rumen pH'sı ve asetat oranını düşürdüğü (P<0.05), toplam uçucu yağ asidi miktarını ve propiyonat konsantrasyonunun arttığını bildirmektedir (Kholif ve ark., 2018). Côttes ve ark., (2010), rasyonda %4.1 oranında yağ kullanımının toplam UYA konsantrasyonu ve bireysel UYA'ların molar oranları üzerinde hiçbir etkisi olmadığını; ancak, Gonthier ve ark., (2004), daha yüksek düzeyde yağ kullanımının (rasyonun % 12.5'i), asetat oranını azalttığını ve propiyonat oranlarını arttırdığını bildirmiştir. Bununla uyumlu olarak, Söder ve ark., (2013) kaba yem bazlı bir rasyona %10 yağlı bir tohum eklendiğinde asetat:propiyonat oranında bir düşüş bildirmiştir. Bu nedenle, rasyona yağlı tohum kullanım düzeyinin %10'dan fazla olmaması gerektiği önerilmektedir.

Yapılan çalışmada rasyona %1,2 ve 3 oranında çörekotu tohumu yağı katılmasının ruminal biyohidrojenasyonu değiştirdiği belirlenmiştir. Rumenden çıkan yağ asitlerinin elde edilen ürünlere aktarıldığı düşünüldüğünde, elde edilecek ürünlere (et, süt) omega 3 ve KLA gibi faydalı yağ asitlerinin konsantrasyonlarında artış sağlayabilecektir. Ayrıca rasyona ilave edilen çörekotu tohumu yağının (%1, 2 ve 3) rumen fermentasyon parametrelerini etkilemediği belirlenmiştir. Sonuç olarak rasyona ilave edilen çörekotu tohumu yağının %3'e kadar kullanımında ruminal fermentasyon parametrelerini

olumsuz etkilemeksizin, ruminantlardan elde edilecek ürünlerde yağ asidi kompozisyonunun değiştirilmesinde kullanılabilmesi belirlenmiştir. Ancak daha kesin sonuçlara ulaşabilmek için in vivo çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından finansal olarak desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Erciyes Üniversitesi'ne teşekkür ederim (Proje no: FHD-2021-11065).

KAYNAKLAR

- Bayat, A. R., Tapio, I., Vilkki, J., Shingfield, K. J., Leskinen, H. 2018. "Plant oil supplements reduce methane emissions and improve milk fatty acid composition in dairy cows fed grass silage-based diets without affecting milk yield" *Journal of Dairy Science*, 101, 1136-1151.
- Bernard, L., Bonnet, M., Leroux, C., Shingfield, K. J., & Chilliard, Y. (2009). Effect of sunflower-seed oil and linseed oil on tissue lipid metabolism, gene expression, and milk fatty acid secretion in alpine goats fed maize silage-based diets. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 6083-6094.
- Buccioni, A., Pauselli, M., Viti, C., Minieri, S., Pallara, G., Roscini, V., Mele, M. 2015. "Milk fatty acid composition, rumen microbial population, and animal performances in response to diets rich in linoleic acid supplemented with chestnut or quebracho tannins in dairy ewes" *Journal of Dairy Science*, 98, 1145-1156.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., Doreau, M. 2007. "Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat" *Eurep. J. Lip. Sci. Technol.* 109, 828-855.
- Cozma, A., Andrei, S., Pinte, A., Miere, D., Filip, L., Loghin, F., Ferlay, A. 2015. "Effect of hemp seed oil supplementation on plasma lipid profile, liver function, milk fatty acid, cholesterol, and vitamin A concentration in Carpathian goats" *Czech Journal of Animal Science*, 60, 289-301.
- Donovan, D. C., Schingoethe, D. J., Baer, R. J., Ryali, J., Hippen, A. R., Franklin, S. T. 2000. "Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows" *Journal of Dairy Science*, 83, 2620-2628.
- Erwin, E. S., Marco, G. J., Emery, E. M. 1961. "Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography" *Journal of Dairy Science*, 44, 1768-1771.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H. 1957. "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues" *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- Fritsche, J., Steinhart, H. 1998. "Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake" *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*, 206, 77-82.
- Gómez-Cortés, P., Cívico, A., de la Fuente, M. A., Sánchez, N. N., Blanco, F. P. Marín, A. L. M. 2019. "Short term evolution of nutritionally relevant milk fatty acids of goats fed a cereal-based concentrate enriched with linseed oil" *Innovative Food Science Emerging Technology*, 51, 107-113.
- Gonthier, C., Mustafa, A. F., Berthiaume, R., Petit, H. V., Martineau, R., & Ouellet, D. R. (2004). Effects of feeding micronized and extruded flaxseed on ruminal fermentation and nutrient utilization by dairy cows. *Journal of dairy science*, 87(6), 1854-1863.
- Huyen, N. T., Verstegen, M. W., Hendriks, W. H., & Pellikaan, W. F. (2020). Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage in dairy cow rations reduces ruminal biohydrogenation and increases transfer efficiencies of unsaturated fatty acids from feed to milk. *Animal Nutrition*, 6(3), 333-341.
- Kholif, A. E., Gouda, G. A., Olafadehan, O. A., & Abdo, M. M. (2018). Effects of replacement of *Moringa oleifera* for berseem clover in the diets of Nubian goats on feed utilisation, and milk yield, composition and fatty acid profile. *Animal*, 12(5), 964-972.
- Kliem, K. E., Humphries, D. J., Grandison, A. S., Morgan, R., Livingstone, K. M., Givens, D. L., Reynolds, C. K. 2019. "Effect of a whey protein and rapeseed oil gel feed supplement on milk fatty acid composition of Holstein cows" *Journal of Dairy Science*, 102, 288-300.
- Pirondini, M., Colombini, S., Mele, M., Malagutti, L., Rapetti, L., Galassi, G., Crovetto, G.M. 2015. "Effect of dietary starch concentration and fish oil supplementation on milk yield and composition, diet digestibility, and methane emissions in lactating dairy cows" *Journal of Dairy Science*, 98, 357-372.
- Sinclair, L. A., S. L. Cooper, J. A. Huntington, R. G. Wilkinson, K. G. Hallett, M. Enser, J. D. Wood. 2005. "In vitro biohydrogenation of n-3 polyunsaturated fatty acids protected against ruminal microbial metabolism" *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 579-596.
- Soder, K. J., Brito, A. F., & Rubano, M. D. (2013). Effect of oilseed supplementation of an herbage diet on ruminal fermentation in continuous culture. *Journal of dairy science*, 96(4), 2551-2556.
- Sterk, A., Van Vuuren, A. M., Hendriks, W. H., & Dijkstra, J. (2012). Effects of different fat sources, technological forms and characteristics of the basal diet on milk fatty acid profile in lactating dairy cows—a meta-analysis. *The Journal of Agricultural Science*, 150(4), 495-517.
- Toral, P. G., Belenguer, A., Shingfield, K. J., Hervás, G., Toivonen, V., & Frutos, P. (2012). Fatty acid composition and bacterial community changes in the rumen fluid of lactating sheep fed sunflower oil plus incremental levels of marine algae. *Journal of Dairy Science*, 95(2), 794-806.
- Zhang, C. M., Guo, Y. Q., Yuan, Z. P., Wu, Y. M., Wang, J. K., Liu, J. X., & Zhu, W. Y. (2008). Effect of octadeca carbon fatty acids on microbial fermentation, methanogenesis and microbial flora in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 146(3-4), 259-269.