

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KABA YEMLERİN PROTEİN PARÇALANABİLİRLİĞİNİN İN VİTRO  
ÖLÇÜMÜNDE ENZİM KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ**

**Mehmet Salih BÜYÜKKILIÇ**

**ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA  
2010**

Doç. Dr. Abdullah CAN danışmanlığında, Mehmet Salih BÜYÜKKILIÇ'ın hazırladığı "Kaba Yemlerin Protein Parçalanabilirliğinin *In Vitro* Ölçümünde Enzim Konsantrasyonunun Belirlenmesi" konulu bu çalışma 18/01/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Zootekni Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Abdullah CAN



Üye: Doç. Dr. Nihat DENEK



Üye: Yrd. Doç. Dr. Şahin ÇADIRCI



**Bu Tezin Zootekni Anabilim Dalında Yapıldığı ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.**

**Prof. Dr. Mehmet CİCİ**  
Enstitü Müdürü

**Bu Çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir.**  
Proje No:930

**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.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	v
1.GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	6
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	10
3.1. Materyal.....	10
3.1.1. Yem Materyali.....	10
3.1.2. Hayvan Materyali.....	11
3.2. Yöntem.....	11
3.2.1. Yem örneklerinin hazırlanması.....	11
3.2.2. <i>In situ</i> ölçümler.....	11
3.2.3. Enzim tekniği.....	11
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	13
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	18
5.1. Sonuçlar.....	18
5.2. Öneriler.....	18
KAYNAKLAR.....	19
ÖZGEÇMİŞ.....	25
ÖZET.....	26
SUMMARY.....	27

ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

KABA YEMLERİN PROTEİN PARÇALANABİLİRLİĞİNİN İN VİTRO ÖLÇÜMÜNDE  
ENZİM KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ

Mehmet Salih BÜYÜKKILIÇ

Harran Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Zootečni Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Abdullah CAN  
Yıl: 2010, Sayfa : 27

Bu çalışma, bazı kaba yemlerin by-pass (BP) değerlerinin *in vitro* enzim tekniği ile belirlenmesinde kullanılacak en uygun enzim konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Araştırmada yem materyali olarak 7 farklı kaba yem kaynağı kullanılmıştır. Bu yemler; fiğ kuru otu (F), buğday silajı (BSL), mercimek samanı (MS), buğday kuru otu (BKO), tritikale otu (T), yonca kuru otu (Y) ve mısır silajı (MSL)'dan oluşmuştur.

Fiğ kuru otu, buğday kuru otu ve mısır silajının *in situ* BP değerleri ile *in vitro* BP değerleri istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ( $P>0.05$ ). Buğday silajı, mercimek samanı ve yonca otunun *in vitro* BP değerleri *in situ* değerlerinden farklı bulunmuştur ( $P<0.05$ ). *In vitro* teknikte inkübasyon süresinin 72 saate çıkarılması sadece fiğ ve yonca otunun BP değerlerini etkilerken ( $P=0.01$ ), diğer 5 kaba yemin BP değerleri üzerine etkisi bulunmamıştır ( $P>0.10$ ). Yine benzer şekilde, enzim konsantrasyonunun artırılmasının BP değerleri üzerine etkisi tüm kaba yemler için aynı olmamıştır. Bundan dolayı her yem için ayrı ayrı inkübasyon süresi ve enzim konsantrasyonunun *in vivo* ve *in situ* veriler esas alınarak, belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

**ANAHTAR KELİMELER:** *In situ* metot, enzim tekniği, enzim konsantrasyonu, by-pass protein

## ABSTRACT

Msc. Thesis

### DETERMINING THE ENZYME CONCENTRATION FOR MEASURING BY-PASS PROTEIN VALUE OF FORAGES VIA ENZYMATIC IN VITRO TECHNIQUE

Mehmet Salih BÜYÜKKILIÇ

Harran University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Animal Science

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Abdullah CAN  
Year : 2010, Page: 27

This study was conducted to determine the optimum enzyme concentration of protease solution in *in vitro* method for determining by-pass protein value of roughages. Total 7 roughages were used as roughage sources. These roughages included vetch hay, wheat silage, wheat hay, lentil straw, triticale hay, alfalfa hay and corn silage.

By pass protein values of vetch hay, wheat hay and corn silages were found similar in both *in vivo* and *in vitro* enzyme technique ( $P>0.05$ ). However, other roughages had differed BP values according to technique ( $P<0.05$ ). While increasing incubation length from 48 h to 72 h affected BP values of alfalfa hay and vetch hay ( $P=0.01$ ), BP values of other roughages were not affected ( $P>0.10$ ). Similarly, increasing enzyme concentration did not changed BP values of all roughages. Therefore, future studies should be focused on enzyme concentration and incubation length for separately for each roughages using *in vivo* and *in situ* procedure as a standard.

**KEY WORDS:** In situ technique, enzyme technique, enzyme concentration, by-pass protein.

## TEŐEKKÖR

Tez konumun seçimi, denemenin planlanması ve yürütülmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve bu tezin yazım aşamasında her türlü yardımcı ile bana yol gösteren danışmanım Doç. Dr. Abdullah CAN'a, jüri üyelerim Doç.Dr.Nihat DENEK'e , Yrd.Doç.Dr. Şahin ÇADIRCI' ya ve tüm hatım boyunca beni destekleyen anneme, babama, kardeşlerime, Asuman BÜYÜKKILIÇ'a eşim Tuba BÜYÜKKILIÇ' a ve çalışmalarımnda emeği geçen herkese teşekkür ederim.

## ÇİZELGE DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Çizelge 3.1. Denemede kullanılan yemlerin besin madde kompozisyonu.....	10
Çizelge 4.1. Denemede kullanılan yemlerin in situ ve in vitro BP değerleri (%)......	16

## SİMGELER DİZİNİ

MOP	Metabolize Olabilir Protein
BP	By pass Protein
RPP	Rumende Parçalanabilir Protein
KM	Kuru Madde
Y	Yonca
MSL	Mısır silajı
T	Tritikale
BKO	Buğday Kuru Otu
MS	Mercimek Samanı
BSL	Buğday Silajı



## 1. GİRİŞ

Ruminantlar tarafından tüketilen yemler bu hayvanların rumeninde mikrobiyal parçalanmaya maruz kalırlar. Bu parçalanma işlevi sonrasında amonyak, amino asitler, peptitler ve uçucu yağ asitleri son ürün olarak ortaya çıkarak, mikrobiyal biokütle sentezinde kullanılmaktadır. Rumende mikrobiyal parçalanmadan kurtulan yemler, endojen kaynaklı protein ve mikrobiyal biokütle ince bağırsaklara ulaşarak ruminant dokuları için protein ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Sonuç olarak, yemlerin besinsel değerleri onların besin madde kompozisyonu, rumende parçalanabilirliği ve özellikle rumende parçalanmayan proteinlerin ince bağırsaklarındaki sindirimiyle ilişkilidir. Ruminant hayvanlar rumende mikrobiyal biokütle sentezi ve mikrobiyal aktivitenin devamlılığı için yemlerden protein, şeker, nişasta ve yapısal olmayan polisakkaritler sağlanmasına gereksinim duyarlar. Hayvanların besinsel statülerini belirlemek için onların tükettikleri yemlerin rumen parçalanabilirliklerinin tahminine ihtiyaç vardır. Hayvanın besinsel statüsünün iyi olması demek; hayvanın günlük besin madde ihtiyaçları ile günlük besin madde alımının dengelenmesi gerekmektedir. Bu amaç için hayvan yemlerinin rumende parçalanabilirliğinin ölçülmesini sağlayacak rutin tekniklere ihtiyaç vardır (Mohamed and Chaudhry, 2008).

Ruminant yemlerinin içermiş olduğu metabolize olabilir protein (MOP) içeriklerinin belirlenmesinde kullanılan güncel yöntemler incebağırsaklara ulaşan yem kaynaklı amino asitler üzerine yoğunlaşmaktadır. Ruminantların ince bağırsağına ulaşan amino asitler ya mikrobiyal yada rumende mikrobiyal parçalanmaya uğramadan geçen yem kaynaklı protein yani by pass proteinden sağlanmaktadır. Her yemin sağlamış olduğu by pass ve mikrobiyal protein miktarının doğru olarak belirlenmesi yemlerin MOP değerlerini belirlemede ve hayvanın amino asit ihtiyacının belirlenmesinde çok önemlidir (NRC, 1996). Ham proteinin sindirilebilirliğinin belirlenmesi ruminantlar için çok az önem teşkil eder. Çünkü yem proteini sindirim kanalında hem amonyak hem de amino asit olarak emilir bu da yem proteininin rumen de parçalanma oranına ve mikroorganizmaların azot ihtiyaçlarına

bağlı olarak değişim gösterir. Kısacası ruminant hayvanların protein beslenmesi çok komplekstir.

Kaba yemlerin rumendeki protein parçalanmasının kapsam ve oranının belirlenmesinde nitrojen çözünebilirliği (Crooker ve ark., 1978), ticari proteazlar (Mahadevan ve ark., 1987; Luchini ve ark., 1987) ve inhibitörlerin kullanıldığı *in vitro* yöntemler geliştirilmiştir (Broderick, 1987). Azot çözünebilirliğini esas alan sonuçlar çözücünün tipine bağlı olup (Crooker ve ark., 1978), parçalanmış ve parçalanmamış protein arasındaki farklılık göstermemektedir (Hristov ve Broderick, 1994). Proteazların kullanımına dayalı yöntemlerde (Mahadevan ve ark., 1987), ruminal inkübasyonlarda amino asit ve amonyağın birikimi, protein parçalanma düzeyini göstermek açısından yanıltıcı olabilir; çünkü, protein yıkımı ve mikrobiyal protein sentezi eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir (Hristov ve Broderick, 1994).

Ruminantların beslenmesinde kullanılan kaba yemlerin sindirilebilirlikleri *in vivo*, *in vitro* ve *in situ* teknikler kullanılarak belirlenir. Bu metotlar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında avantaj ve dezavantajlara sahiptirler (Can, 1998).

*In vivo* standart teknik olarak kabul edilmektedir. Fakat mikrobiyal protein ayrışması ve yemlerden alınan endojen protein değerlerinin hesaplanmasında bazı hatalar vermektedir.

Kaba yemlerin yapısındaki RPP miktarını hesaplamak için bir çok yöntem bulunmakla birlikte, *In vivo* yöntemler yemlerin rumende parçalanmasını ölçmede kullanılan en sağlıklı yöntemdir. Bunun için retikula-rumen ve abomusuma veya duodenuma kanül takılmış hayvanlara ihtiyaç vardır (Stern ve ark., 1994). Ayrıca, sindirim kanalı içeriğinin akış hızının tespiti ve mikrobiyal protein ile yem kaynaklı by-pass proteininde ayırt edilmesi için metotlara ihtiyaç vardır. Bu yöntemler çok işçilik ve önemli miktarda yatırım gerektirmektedirler. Hayvan refahına ile ilgili faktörler bu yöntemlerin uygulanabilirliğini sınırlayan bir diğer etkidir. Bu nedenlerden dolayı *in vivo* ölçümlerde birkaç sınırlı hayvan kullanımı tekerrürler arasındaki varyasyon nedeniyle sonuçların güvenilirliğini azaltmaktadır (Stern et al., 1997). Yöntemde hayvanın KM bazında günlük yem tüketiminin ve mide veya ince barsakta sindirilmeyen yem maddelerinin günlük akış miktarının tespiti gerekmektedir. Bunun için toplam kanal içeriğinin alınması yada az miktarda indikatörlü örnek alınması akışın tespiti için yeterli olmaktadır (Zinn ve Owens,

1986). By pass protein miktarı, toplam tüketilen protein miktarından abomasuma yada ince barsağa ulaşan endojen ve mikrobiyel kaynaklı protein miktarlarının toplamının çıkarılması sonucu elde edilir.

Mikrobiyal proteini belirlemek için bazı mikrobiyal indikatörler kullanılmaktadır. Bunlar mikroorganizmaların yapısında bulunan diaminopimelik asit, aminoetilfosforik asit ve nükleik asitler (DNA veya RNA) olabileceği gibi internal idikatörler veya rumene sonradan mikroorganizmaları işaretlemek için eklenen <sup>35</sup>S, <sup>15</sup>N, <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H ve <sup>32</sup>P gibi external indikatörler olabilirler. Çok sayıda indikatör olmasına rağmen rumende gerçek mikrobiyal protein miktarını ölçen ideal tek bir indikatör yoktur (Broderick ve Merchen, 1992). Yöntemde hayvanın KM bazında günlük yem tüketimi ile mide veya ince barsakta sindirilmeyen yem maddelerinin günlük akış miktarının tespiti gerekmektedir. Bunun için toplam kanal içeriğinin alınması yada az miktarda indikatörlü örnek alınması akışın tespiti için yeterli olmaktadır (Zinn ve Owens, 1986).

Carulla ve ark. (1994), kaba yemlerin protein içeriklerinin rumende parçalanabilirliğini belirlemek için omasum örnekleme metodunu geliştirmiştir. Bu metotta sadece rumene bir kanül açılması yeterli olmakta, rumen içeriğinin elle boşaltılmasını takiben omasuma elle ulaşılmaktadır. İki parmak aracılığıyla omasuma girilerek örnek alınmakta ve örnekte bakteriyel ve toplam azot tayini yapılarak rumende parçalanmayan protein miktarı hesaplanmaktadır.

İn situ teknik ilk kez Quin ve ark., (1938) tarafından kullanılmış ve o tarihten itibaren de bir çok kaba ve konsantre yemin yem değerini belirlemede kullanılmıştır. Mehrez ve Orskov (1977) tarafından KM ve protein parçalanabilirliği üzerine etkili olan faktörlerin eleştirel olarak ortaya konulmasından sonra bu tekniğe olan ilgi artmaya başlamıştır. Kullanılan naylon torbaların içerisindeki yemin hareketine imkân sağlayacak durumun olması halinde bu tekniğin besin maddelerinin rumende parçalanma hızı ve oranını tayin etmede çok yararlı olacağını bildirmişlerdir. Bu teknik, KM ve protein parçalanabilirliğinin ölçümünde kullanılan çok iyi bilinen basit ve güvenilir bir tekniktir (Mehrez ve Orskov 1977; ARC, 1984; AFRC, 1993; Thomas 2004). Ham protein parçalanabilirliği için Orskov ve McDonald (1979)' ın geliştirdikleri eksponensiyel modelin yardımı ile geniş ölçüde kullanılmaya başlanmıştır. Orskov (1985), *in situ* yöntemde kullanılan keselerin rumendeki

inkübasyon sürelerinin parçalanma eğrilerini şekline bağlı olarak değiştiğini, dolayısıyla kesin bir inkübasyon süresinin verilemeyeceğini belirterek, kuru ot, saman ve diğer kaba yemler için keseleri 12, 24, 48 ve 72 saat sürelerde rumende bırakmanın uygun olacağını bildirmektedir.

*In situ* teknikten rumen kanülü açılmış hayvanlar kullanımını gerektirdiği için ticari laboratuarlarda rutin kullanımı sınırlıdır. Bununla beraber ölçüm sayısının azlığı, kısmi olarak az işçilik ihtiyacı ve ucuz oluşu nedeniyle *in vivo* tekniğe göre avantajları vardır. Bu teknikte yem örnekleri naylon, polyester veya dacron torbalar içerisine konularak ağzı kapatılır ve torbalar sığır veya koyun rumeninde farklı sürelerde bekletilir. Yıkama sonrası torbalarda kalan numuneler KM ve protein parçalanabilirliğin ölçümünde kullanılır. Teknik, yemlerin rumen ortamında (pH, Sıcaklık ve CO<sub>2</sub>) yemlerin inkübe olmasını sağlamasına karşın yemler çiğneme ve ruminasyon olaylarına maruz kalmaz (Mohamed ve Chaudhry, 2008).

*In situ* teknikte KM ve protein sindirimi üzerine torba içerisine mikrobiyal kontaminasyon yanı sıra bir çok etmen hatalı değerler elde edilmesine yol açmaktadır. Bullis ve ark. (1967) tarafından naylon torba içerisine konulan örnek miktarının artırılmasının KM sindirimini azalttığı bildirilmiştir. Aynı doğrultuda Van Keuren ve Heineman (1962) torba içerisindeki örnek ağırlığının artırılması özellikle kısa süreli inkübasyonlarda KM sindirimini azaltırken, sürenin uzun olması bu etkiyi ortadan kaldırdığını bildirmişlerdir. Silaj örneklerinin yüksek sıcaklıkta kurutma dolaplarında kurutulmasının bu örneklerin protein içeriklerinin parçalanma ve çözüm özelliklerini azaltığı tespit edilmiştir (Lopez ve ark., 1995). Noziere ve Michalet-Doreau (2000) öğütme ve inkübasyon öncesi örneklerin ıslatılmasının artan mikrobiyal kolonizasyondan dolayı parçalanma hızlarını azalttığını gözlemlemişlerdir. Huntington ve Givens (1995) naylon torba gözenek çapının 15 µm'den küçük olması durumunda mikrobiyal kolonizasyon miktarı ve çeşidinin azalması yanı sıra, torba içerisinde gazların çıkışının engellenmesine neden olarak parçalanmayı azalttığını belirlemişlerdir. Torba gözenek çapının 40 µm'den geniş olmasının ise parçalanmayan partiküllerin kaybına neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, hayvan ve inkübasyon sıralamasının da, laboratuvarlar arası sonuçların farklı olmasına neden olduğu belirtilmektedir (Nocek, 1988). Ayrıca

torbaların yerleştirildiği hayvanın tüketmiş olduğu yemde KM sindirimi üzerine etkilidir.

Naylon torba içerisindeki pH özellikle küçük gözenekli torba kullanılması durumunda dış ortam pH'sından düşük olduğu saptanmıştır (Marinucci ve ark., 1992). Aynı biçimde, torba içerisindeki mikrobiyal popülasyon miktar ve çeşit yönünden torba dışından farklılık göstermekte, ayrıca protozoa ve bakteri popülasyonunun torba içerisinde daha az olduğu bildirilmektedir (Meyer ve Mackie, 1986; Marinucci ve ark., 1992). Torba içerisindeki bazı besin maddelerinin sindirime uğramadan da torbayı terk ettikleri de bilinmektedir. Belirtilen bu dezavantajlarına rağmen hala bu *in situ* tekniği bir çok ülkede referans teknik olarak kabul görmektedir. Bunun nedenleri; sindirimin rumen ortamında yapılması ve bu açıdan *in vitro* yöntemlere göre biyolojik açıdan daha güvenilir olmasıdır (Hvelplund ve Weisbjerg, 1998). Ancak, *in vivo* ve *in situ* yöntemlerde kanüllü hayvanlara ihtiyaç duyulması bu tekniklerin yemlerin rutin olarak değerlendirilmesinde kullanımını zorlaştırmaktadır. Bundan dolayı yemlerin rumende parçalanabilirliğini doğru tahmin etmek için *in vitro* metotlara ihtiyaç vardır (Mohamed ve Chaudhry, 2008).

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Geçmişte çok sayıda *in vitro* yöntem *in situ* ve *in vivo* yöntemlere alternatif olarak kullanılmıştır. Bu yöntemler; tamponlar, kimyasal çözücüler, rumen sıvısı yada rumen sıvısından ekstrakte edilen veya ticari enzim preparatlarıdır. Yem maddelerinin *in vitro* sindirim değerlerinin belirlenmesinde bir diğer endirekt yöntem ise Gaz üretim tekniğidir. *In vitro* yöntemler *in vivo* ve *in situ* yöntemlere göre daha ucuzdur. *In vitro* yöntemler yem sindirimini etkileyen faktörlerin (mikroorganizmalar, donör hayvan ve çevre) kontrolüne izin vererek, daha standart KM ve protein sindirim değerleri elde edilmesini sağlamaktadır (Mohamed ve Chaudhry, 2008).

Yemler arasında protein çözünürlüğü büyük varyasyon göstermektedir. Örneğin, alkol üretimi sonrası tahıl yan ürünlerinin protein çözünürlüğü borat-fosfat çözeltilinde %3 iken yulaf proteininin çözünürlüğü %55 dir (Krishnamoorthy ve ark., 1983). Tampon çözeltide çözünen N; amonyak, üre, nitratlar, amino asit ve küçük peptitlerden köken alır (Pichard ve Van Soest, 1977; Krishnamoorthy ve ark., 1983). Protein çözünürlüğü kullanılan solvent ve ekstraksiyon yöntemine göre farklılık gösterir. Bazı araştırmacılar tampon çözelti içerisinde çözünen N ile *in vivo* protein parçalanması arasında zayıf bir korelasyonun olduğunu bildirmişlerdir (Stern ve Satter, 1984). Nötral tampon çözeltilerde çözünen N anında bakterilerin kullanımına hazırdır. Ancak, protein parçalanma oranı ve hızını belirlemede yetersizdir (Mohamed ve Chaudhry, 2008).

*In vitro* yöntemler, yemlerin rumen parçalanabilir protein (RPP) içeriklerinin belirlenmesine elverişli olmaları nedeniyle bir çok proteolitik enzimle çalışılmıştır. Bu yöntemde canlı hayvanların kullanılmasına gereksinim duyulmaması yöntemin en belirgin avantajıdır. Uygulamada kullanılacak yeme laboratuvar ortamında bir proteolitik enzim eklenmektedir (Kennelly, 1992). Bu amaçla kullanılan değişik proteazlar arasında en yaygın olanı *Streptomyces griseus*'dan elde edilen proteazdır (Licitra ve ark., 1998). *S. Griseus* proteazı için optimum pH değeri 8 olup, bu değer

rumen pH değerinden yüksektir. Rumen pH'sında kullanımı aktiviteyi ve etkiyi azaltırken (Chamberlain ve Thomas, 1979; Terramoccia ve ark., 1992), yüksek pH değerleri, yüksek veya optimum aktiviteye sebep olmuşlardır (Krishnamoorthy ve ark., 1983).

Ticari proteazların kullanımı diğer tekniklere oranla işçiliğin az olması ve hızlı sonuç verebilmesi gibi bazı avantajlara sahiptir. Farklı orijinli proteazlar rumende protein parçalanabilirliğinin belirlenmesinde kullanılmışlardır. Buna rağmen en yaygın kullanım alanına sahip olan *S. Griseus*'tan elde edilmiştir (Krishnamoorthy ve ark., 1983; Chaudhry 2005; Chaudhry 2007). *Streptomyces griseus*'dan elde edilen proteazın geniş bir etki alanına sahip olması nedeniyle tercih edildiği bildirilmektedir. (Pichard, 1977).

Russell (1984) tüm bakteri türlerinin nitrojen kaynaklarını aynı derece sindirip ve aynı derecede yararlanamadıklarını bildirmiştir. Sadece tek bir enzim kullanmanın hatta bu enzimin rumen bakterilerinden elde edilse bile toplam rumen sıvısındaki proteolitik aktiviteye eşdeğer olamayacağını ifade etmişlerdir.

Beş farklı ticari proteaz kullanılarak farklı konsantre yemlerin rumen parçalanabilirliği *in situ* yöntemle karşılaştırılmıştır (Poos-Floyd ve ark., 1985). Protein çözünürlüğü *Streptomyces griseus proteazi*, papain, bromelain, fisin ve aspergillus oryzae proteazlarıyla inkübasyon sonrası filtrasyonla bulunmuştur. Proteazla yıkılım, *in situ* yıkılımdan farklı olmasına karşın, tüm enzim değerleri ile *in situ* değerleri arasında önemli korelasyonlar tespit etmişlerdir.

Krishnamoorthy ve ark., (1983) önerilen metotta her gram KM için yem proteinlerinin peptit bağlarını parçalamak için 6.6 enzim ünitesi (IU) *S. Griseus* proteazına ihtiyaç olduğu bildirilmiştir. Tüplerde 0.5 g örnek 40 ml borat-fosfat (pH 8.0) 1 saat inkübe edilmiş ve daha sonra (0.33 IU/ml) proteaz çözeltisi eklenmiştir.

Abdelgader ve ark. (1996), yonca ve çayır kuru otunun rumende parçalanabilirliğini, ilk aşamada sellülaz veya karbonhidraz karışımı (drisellaz) enzimleri ile ön muameleye tutup veya muameleye tabi tutulmaksızın *Streptomyces griseus*'dan elde edilen proteolitik enzimleri kullanarak tahmin etmeye çalışmışlardır. Enzim kullanılarak elde edilen RPP değerleri *in vivo* değerlerden daha yüksek bulunmuştur. Sellülaz ile 48 saat inkübasyon veya drisellaz ön muamelesi ile daha doğru RPP değerleri elde edilmiştir.

Cone ve ark., (1996), *in situ* RPP değeri belirlenmiş 24 adet konsantre yemin *Streptomyces griseus* 'dan hazırlanmış proteolitik enzim yardımıyla *in vitro* (24 saat inkübasyon sonucu) RPP değerlerini belirlemişlerdir. *In situ* ve *in vitro* metotların belirlenen RPP değerleri arasında yakın korelasyon değerlerine ( $R^2 = 0.75$ ) sahip olduğunu saptamışlardır. Ayrıca proteaz inkübasyonu öncesi sellüloz veya karbonhidrat yıkımlayan enzimlerin kullanılmasının gereksiz olduğunu bildirmişlerdir.

Rumendeki proteolitik bakterilerden (Mahedeven ve ark., 1987), ficin (Poos - Floyd ve ark., 1985), *Bacillus subtilis* (Assoumani ve ark, 1992) ve *Streptomyces griseus* (Krishnamoorthy ve ark., 1983) elde edilen enzimler RPP tahmin etmede kullanılmıştır.

Assoumani ve ark. (1992), alfa - amilaz ve beta - glukanoz ile ön inkübasyonun *in vitro* enzim yöntemi ile belirlenen RPP değerlerinde artış sağladığını bildirmişlerdir.

Aufrere ve ark. (1991), *Streptomyces griseus*'dan ekstrakte edilen proteaz kullanılarak basit bir enzimatik yöntem belirlemiştir. Belirtilen proteaza 1 ve 24 saat pH 8.0' de inkübasyon sonrası çözülebilen proteinden giderek RPP değerlerini tahmin etmişlerdir. Ancak ruminant rasyonlarında kullanılan tüm yem ham maddeleri grupları için farklı düzeltme katsayılarının kullanılması yönteminin uygunluğunu azalttığını bildirmişlerdir. Bu yöntem yonca samanının RPP değerini tahmin etmekte kullanılmıştır. Bundan dolayı *Streptomyces griseus* sürecinin *in situ* metota karşı geçerli olabilmesi için sonuçların rumendeki geçiş kanalında doğru oranda ve mikrobiyal bulaşmanın modifiye edilmiş purin ya da NDIP ile hesaplanması gerektiği bildirilmektedir (Klopfenstein ve ark., 2001).

Kopecny ve ark. (1989), kaba yemlerin RPP değerlerini belirlemek için alkalaz (Novo), fromaz (Rapidase Sechon), rennin (Laktofiora), papain (Laba), pronaz E (Serva), tripsin (Leciva) gibi farklı enzimleri kullanmışlardır. *In situ* RPP değerleri ile en yüksek korelasyon ( $r= 0.90$ ) papain enzimi ile elde edilmiştir. Rakamsal değerler ise en yüksek ve en yakın olarak alkalaz enzimi ile elde edilmiştir. Diğer tüm enzimlerle 24 saat inkübasyon sonrası elde edilen değerler *in situ* değerlerden düşük bulunmuştur.



De Boever ve ark. (1984), *Streptomyces griseus*, ficin metodu ve protein çözünürlüğünü RPP değerlerini belirlemek için 29 adet konsantre ve 12 adet kaba yem kullanarak karşılaştırmışlardır. *Streptomyces griseus'dan* elde edilen enzimle kaba yemlerin RPP değerlerini tespit etmede başarılı bulunurken ( $R^2 = 0.82 - 0.92$ ), konsantre yemlerde başarısız olduğunu bildirmişlerdir.

Ülkemizde kaba yemlerin BP değerlerinin belirlenmesinde enzim tekniğinin kullanımı yeterince irdelenmemiştir.

Bazı araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda konsantre yemlerde protein parçalanabilirliğinin tayini için serbest enzimlerin kullanımının yeterli olmadığını bildirmiştir (Broderick, 1994).

Şeker (2008) kaba yemlerin by pass protein içeriklerinin belirlenmesinde *in situ* metot yerine *Streptomyces griseus* ile yapılan enzim tekniğini kullandığında 8 adet kaba yemden 5'inin by pass protein değerlerinin benzer olduğunu bildirmiştir.

Bu çalışma kaba yemlerin BP değerlerinin belirlenmesinde *in situ* yöntemine alternatif olarak *Streptomyces griseus'dan* elde edilen proteolitik enzimin kullanım olanaklarının incelenmesi ve tekniğin uygulanmasında kullanılacak en uygun enzim konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Yem materyali

Bu çalışmada yem materyali olarak 7 farklı kaba yem kullanılmıştır. Bu yem maddeleri; fiğ kuru otu (F), buğday silajı (BSL), mercimek samanı (MS), buğday kuru ot (BKO), tritikale (T), yonca otu (Y) ve mısır silajı (MSL)'den olmuştur.

Bu yemlerden F ve BKO Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nde bulunan araziden, buğday silajı, tritikale, mercimek samanı ve mısır silajı özel bir işletmeden, yonca ise Kayseri ilinde bulunan bir aile işletmesinden temin edilmiş ve yemlerin besin madde kompozisyonu ve in situ BP değerleri Şeker (2008) tarafından belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan kaba yemlerin besin madde kompozisyonları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan yemlerin besin madde kompozisyonu.

	Fiğ	BSL	MS	BKO	T	Y	MSL
<b>KM</b>	87,81	46,21	95,18	90,58	93,75	88,78	<b>32,10</b>
<b>KÜL*</b>	9,13	7,70	12,96	10,82	6,99	10,87	<b>9,79</b>
<b>ADF*</b>	34,15	38,81	44,22	43,77	40,30	32,76	<b>39,74</b>
<b>NDF*</b>	45,56	55,13	57,07	66,19	63,13	45,13	<b>59,78</b>
<b>SELÜLOZ*</b>	25,55	31,25	30,45	35,07	32,46	22,40	<b>30,15</b>
<b>HP*</b>	13,84	8,20	8,31	15,89	10,11	17,87	<b>9,79</b>

\*Değerler kuru madde bazında % olarak verilmiştir.

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Yem örneklerinin hazırlanması

Çalışmada kullanılacak yemler 2 mm elek çaplı değirmende öğütülerek analizler için hazır hale getirilmiştir.

#### 3.2.2. *In situ* ölçümler

Çalışmada kullanılan yem örneklerin *in situ* by-pass protein değerleri için daha önce Şeker (2008) tarafından belirlenen değerler kullanılmıştır.

#### 3.2.3. Enzim Tekniği

Çalışmada ilk önce inkübasyonda kullanılmak üzere pH'sı 6.7-6.8 olacak şekilde 12.20 g Monosodyumfosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) borat-fosfat ve 8.91 g Sodyumtetraborat ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ) 1 L'ye saf su ile tamamlanarak tampon çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltisi kullanılarak ticari bir proteaz enzimi olan *Streptomyces griseus* (XIV, Sigma P-5147, St Louis, MO, USA)'dan uygun miktar kullanılarak 1 IU (enzin Ünitesi)/ mL sabit proteaz çözeltisi kullanılmıştır (Licitra ve ark., 1998; 1999; Irshaid 2007) . Örneklerin içermiş olduğu her gram ham protein için 20, 40 ve 60 IU aktivitede 3 farklı konsantrasyon düzeyi incelenmiştir. Ayrıca mikrobiyal gelişimi engellemek için tampon çözeltiliye 1 mg/litre" tetracyclin (Sigma T-3258) ilave edilmiştir.

Daha sonra Whatman marka 41 numaralı filtre kağıtları 65 °C'de kurutulmuş ardından yemlere ait örnekler 4'er tekerrür halinde yaklaşık 0.6'şer gram tartılmıştır. Tartılan yemler *in vitro* inkübasyon tüplerinin içine konmuştur. Tüplerin içine hazırlanan tampon çözeltiliden 35 mL ilave edilerek 1 saat 39 °C'de ısıtılmış su banyosunda bekletilmiş ve uygun oranda (ham protein ve enzim konsantrasyonları dikkate alınarak) proteaz çözeltisi ilave edilerek tekrar su banyosunda 48 veya 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüplerin içinde bulunan örnekler filtre kağıtlarından süzülerek distile su ile yıkanmıştır. Yıkama ve süzme işleminin ardından filtre kağıdı içinde kalan yemler kurutma dolabında 65 °C'de 48 saat süreyle bekletilerek ve daha sonra ağırlıkları tekrar ölçülmüştür.

Daha sonra ağırlıkları ölçülen filtre kâğıtları içinde bulunan yem kalıntılarının azot içeriği Azot Tayin Cihazı (Model FP-528, Leco, Mönchengladbach, Germany) belirlenmiştir. Kalıntıda saptanan toplam ham protein miktarı ( $\text{Nx}6.25$ ) inkübasyon öncesi toplam ham protein oranından gidilerek BP miktarları hesaplanmıştır. Yemlerin *in situ* BP değerleri olarak Şeker (2008) tarafından belirlenen değerler

kullanılmıştır. Kaba yemlerin Kuru Madde (KM), Ham Kül (HK) analizleri AOAC (1984)'e, ADF ve NDF analizleri Van Soest ve Robertson (1991)'un, Ham Selüloz (HS) analizi ise Crampton ve Maynard (1938)'in bildirdikleri yöntemlere göre yapılmıştır.

Deneme sonunda elde edilen verilerin istatistiksel karşılaştırılması varyans analizi ve gruplar arasındaki farklılığın belirlenmesinde ortogonal kontrast testi kullanılmıştır (SAS, 1988).

#### 4. ARASTIRMA BULGULARI ve TARTISMA

Çalışmada kullanılan fiğ, buğday silajı, mercimek samanı, buğday kuru otu, tritikale, mısır silajı ve yonca yemlerine ait *in situ* ve *in vitro* BP değerleri Çizelge 4.1 'de verilmiştir.

Fiğ kuru otunun *in situ* (%32.89) ve *in vitro* tekniklerle (%32.44) belirlenen BP değerleri benzer bulunmuştur ( *in situ* ile *in vitro*; P= 0.7188). İnkübasyon süresinin 48 saatten 72 saate çıkarılması, enzim konsantrasyonunun 20 IU'dan 40 IU ve 60 IU'ya çıkarılması Fiğ otu BP değerini azaltılmıştır ( 48 S ile 72 S; 20 IU ile 40 IU ; 20 IU ile 60 IU P=0.001). Ancak, 40 IU ile 60 IU enzim konsantrasyonları arasında BP değerleri arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir (P=0,298).

Buğday silajının *in situ* BP değeri (% 40.35) *in vitro* belirlenen BP değerinden (%24.16) yüksek bulunmuştur ( *in situ* ile *in vitro*; P=0.001). Buğday silajının *in vitro* teknikte inkübasyon süreleri ve enzim konsantrasyonları arasındaki farkların önemsiz olduğu görülmüştür (P>0.526).

Buğday silajının aksini mercimek samanının *in situ* BP değeri (%31.13 ) *in vitro* belirlenen BP değerinden (%37.57) düşük bulunmuştur. Benzer şekilde, *in vitro* teknikte inkübasyon süreleri ve enzim konsantrasyonları arasındaki farkların önemsiz olduğu görülmüştür (P>0.129).

Buğday kuru otunun *in situ* BP değeri (% 28,95) *in vitro* belirlenen BP değerinden (%31.48) benzer bulunmuştur ( *in situ* ile *in vitro*; P=0.077). *in vitro* teknikte, sadece enzim konsantrasyonunun 20 IU'dan 60 IU'ya çıkartılması BP değerini %33.36'dan %30.02'ye düşmüştür (P<0.035).

Tritikale kuru otu *in situ* BP (%41.18) değeri *in vitro* BP (%28.90) değerlerinden yüksek bulunmuştur (*In situ* ile *In vitro*; P=0.001). *In vitro* ölçümlerden ise enzim konsantrasyonunun 60 IU kullanımı BP değerini azaltmıştır (P=0.001).

Çizelge 4.1. Denemede kullanılan yemlerin *in situ* ve *in vitro* BP değerleri (%).

Muameleler	Fiğ	BSL	MS	BKO	T	MSL	Y
<i>In situ</i> (kontrol)	32,89	40,35	31,13	38,85	41,18	40,02	27,44
1.Grup <i>in vitro</i> (48 S, 20 IU)*	38,23	25,51	38,66	36,15	29,38	41,01	40,03
2.Grup <i>in vitro</i> (48 s, 40 IU)	35,84	24,27	36,34	31,65	28,84	42,30	33,47
3.Grup <i>in vitro</i> (48 S, 60 IU)	34,34	23,76	37,12	28,90	26,68	37,46	50,74
4.Grup <i>in vitro</i> (72 S, 20 IU)	33,40	23,28	39,84	30,56	31,48	40,24	39,61
5.Grup <i>in vitro</i> (72 S, 40 IU)	26,88	23,59	37,12	30,50	31,40	40,94	31,69
6.Grup <i>in vitro</i> (72 S, 60 IU)	25,97	24,60	36,35	31,13	25,67	39,07	27,48
SEM	1,129	1,309	1,595	1,266	0,880	1,507	1,807
Karşılaştırmalar (kontrast)	P değerleri						
<i>In situ</i> ile <i>In vitro</i>	0,718	0,001	0,007	0,077	0,001	0,918	0,001
48 S ile 72 S	0,001	0,527	0,765	0,161	0,106	0,891	0,001
20 IU ile 40 IU	0,001	0,726	0,129	0,086	0,723	0,518	0,001
20 IU ile 60 IU	0,001	0,871	0,130	0,015	0,001	0,132	0,696
40 IU ile 60 IU	0,298	0,851	0,996	0,413	0,001	0,073	0,001

\*S: İnkübasyon süresi (saat). IU:Her gram HP için enzim konsantrasyonu

Mısır silajının *in situ* BP (%40.02) değeri *in vitro* BP (%40.17) değerleriyle benzer bulunmuştur (*İn situ* ile *İn vitro*; P=0.918). İnkübasyon süresi ve enzim konsantrasyonu ise *in vitro* BP değerleri üzerine önemli bir etkide bulunmamıştır (P>0.071).

Yonca Kuru otunun *in situ* BP (%27.44) değeri *in vitro* BP (%37.17) değerlerinden düşük bulunmuştur (*İn situ* ile *İn vitro*; P=0.001). İnkübasyon süresinin 48 S'ten 72 S'e çıkarılması BP değerini %41.41'den %32.92'ye indirmiştir (P=0.001).

Fiğ kuru otu, buğday kuru otu ve mısır silajının *in situ* BP değerleri ile *in vitro* BP değerleri istatistiksel olarak benzer bulunmuştur. Benzer şekilde aynı yemlerin *in situ* ve *in vitro* BP değerleri Şeker (2008) tarafından da benzer bulunmuştur. Buğday silajı, mercimek samanı ve yonca otunun *in vitro* BP değerleri *in situ* değerlerinden farklı bulunmuştur.

Abdelgader ve ark. (1996), yonca ve çayır kuru otunun rumende parçalanabilirliğini, ilk aşamada sellüloz veya karbohidraz karışımı (drisellaz) enzimleri ile ön muameleye tutup veya muameleye tabi tutulmaksızın *Streptomyces griseus*'dan elde edilen proteolitik enzimleri kullanarak tahmin etmeye çalışmışlardır. Enzim kullanılarak elde edilen RPP değerleri *in vivo* değerlerden daha yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde bu çalışmadan elde edilen *in vitro* BP değerleri *in situ* değerlerinden yüksek bulunmuştur. Bu durum diğer yemlerden farklı olarak yonca örneklerin *in vitro* tüplerde çözelti üzerinde yüzmesi sonucu enzim etkinliğinin azalmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Russell (1984) tüm bakteri türlerinin nitrojen kaynaklarını aynı derece sindirip ve aynı derecede yararlanamadıklarını bildirmiştir. Sadece tek bir enzim kullanmanın hatta bu enzimin rumen bakterilerinden elde edilse bile toplam rumen sıvısındaki proteolitik aktiviteye eşdeğer olamayacağını ifade etmişlerdir. Bu çalışmada da tek bir enzim preparatının kullanılması kullanılan yemlerin *in vitro* BP değerlerinin belirlenmesinde yeterli olmayacağı sonucunu ortaya çıkarmıştır.

Aufrere ve ark. (1991), *Streptomyces griseus*'dan ekstrakte edilen proteaz kullanarak basit bir yöntem belirlemiştir. Belirtilen proteaz enzimi, 1 ve 24 saat pH 8.0' de inkübasyon sonrası çözülebilen proteinden giderek RPP değerlerini tahmin etmişlerdir. Ancak ruminant rasyonlarında kullanılan tüm yem ham maddeleri grupları için farklı düzeltme katsayılarının kullanılması metodun güvenilirliğini azalttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da buğday silajı, mercimek samanı ve yonca otunun *in vitro* BP değerleri *in situ* değerlerinden farklı bulunmuştur. Katsayı kullanılarak belki bu çalışmada ki yemlerin BP değerlerinde düzeltmeye gidilebilir ancak her grup yem için farklı düzeltme katsayılar kullanılmasına gerek duyulmaktadır.

İnkübasyon süresinin 48 saatten 72 saate çıkartılması sadece fiğ ve yonca kuru otlarının BP değerini azaltırken diğer 5 yemde önemli bir etkisi olmamıştır. Şeker (2008) kaba yemlerin BP değerlerinin *in vitro* enzim yönteminde belirlerken inkübasyon süresinin 70 saat olması gerektiğini önermiştir. Bu çalışmada ise yonca ve fiğ kuru otu dışından 48 saat ile 72 saat arasında fark olmadığı görülmüştür.

Şeker (2008) çalışmasında 0,1 M boratfosfat tampon çözeltisi (pH= 8.0) kullanırken, bu çalışmada ise pH'sı 6.7-6.8 olacak şekilde 12.20 g Monosodyumfosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) borat-fosfat ve 8.91 g Sodyumtetraborat ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ) 1 L'ye saf su ile tamamlanarak hazırlanan tampon Çözeltisi kullanılmıştır. Tampon çözeltilerin farklı olmasına rağmen her iki çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Cone ve ark., (1996) protein parçalanabilirliğinin ölçümü için optimum pH değerinin 8 olduğunu bildirmişlerdir. Bu değer ise rumen pH değerinden yüksektir. Rumen pH'sında kullanımı aktiviteyi ve etkiyi azaltırken (Chamberlain ve Thomas, 1979; Terramoccia ve ark., 1992), yüksek pH değerleri yüksek veya optimum aktiviteye sebep olduğu (Krishnamoorthy ve ark., 1983) bildirilmiştir.

Enzim konsantrasyonunun BP değerleri üzerine etkisi yem çeşidine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bir çok araştırmacı tarafından proteinlerin rumende parçalanabilirliğinin *in vitro* enzim tekniği ile belirlemede; enzim konsantrasyonu belirlenirken rumen enzim konsantrasyonu dikkate alınmıştır. Roe ve ark., (1990) ile Assoumani ve ark., (1992) 0.33 IU /ml proteaz enzim çözeltisi (pH=6.7) önermişlerdir. Cone ve ark., (1996) 4.6 IU/ml enzim konsantrasyonu



kullanmışlardır. Yukarıdaki kaynaklarda görüldüğü gibi farklı enzim konsantrasyonlarının kullanılabilceğı yönünde bildirimler bulunmaktadır.

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

### 5.1. Sonuçlar

Fiğ kuru otu, buğday kuru otu ve mısır silajının *in situ* BP değerleri ile *in vitro* BP değerleri istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ( $P>0.05$ ). Buğday silajı, mercimek samanı ve yonca otunun *in vitro* BP değerleri *in situ* değerlerinden farklı bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Bu çalışmada farklı tampon çözeltileri kullanılmamasına rağmen Şeker (2008)'in verileriyle kıyaslama yapıldığında pH değerinin BP değerleri üzerine çok etkili olmadığı söylenebilir. *In vitro* teknikte inkübasyon süresinin 72 saate çıkarılması sadece fiğ ve yonca otunun BP değerlerini etkilerken diğer 5 kaba yem BP değerleri üzerine etkisi bulunmamıştır. Yine benzer şekilde enzim konsantrasyonunun artırılmasının BP değerleri üzerine etkisi tüm kaba yemler için aynı olmamıştır.

### 5.2. Öneriler

*In vitro* yöntemlerle, yemlerin BP içeriklerinin belirlenmesinde kanüllü canlı hayvanların kullanılmasına gereksinim duyulmaması, ölçüm sayısının yeterli olabilmesi, kısmı olarak az işçilik ihtiyacı ve ucuz oluşu nedeniyle *in vivo* ve *in vitro* tekniklere göre avantajları vardır. Ancak *in vitro* enzim tekniğinde tüm yemler için sabit bir inkübasyon süresi ile belirli bir enzim konsantrasyonu bu çalışmada belirlemek mümkün olmamıştır. Bundan dolayı her yem için ayrı ayrı inkübasyon süresi ve enzim konsantrasyonu *in vivo* ve *in situ* verileri esas alarak belirlemeye ihtiyaç vardır. Yonca gibi bazı yemler için belki de *in vitro* enzim tekniği ile BP değerlerini belirleme olasılığının olamayacağı kanatine varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- ABDELGADER, I.E.O., COCHRAN, R.C., TITGEMEYER, E.C. and E.S.VAZANT, E.S., 1996. *In vitro* determination of ruminal protein degradability of forages. Cattlemens Day. Pp. 58-59.
- AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL (1993) Agricultural and food research council: technical committee on responses to nutrients. Nutrient requirements of ruminant animals: protein. Nutr abst rev 9B, 65-71.
- AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL. (1984). The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock. Supplement 1. Slough, UK: Commonwealth Agricultural Bureau.
- AOAC, 1984. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 14 th ed. Association of Official Analytical Chemists. The William Byrd Press, Inc., Richmond, Virginia.
- ASSOUMANI, M.B., VEDEAU, F., JACQOUT, L. and SNIFFEN, C.J., 1992. Refinement of an enzymatic method for estimating the theoretical degradability of proteins in feedstuffs for ruminants. Anim. Feed Sci. Technol. 39: 357-368.
- AUFRERE, J., D. GRAVIOU, DEMARQUILLY, C, VERITE, R., MICHALET-DOREAU, B., and CHAPOUTOT, P., 1991. Predicting *in situ* degradability of feed proteins in the rumen by two laboratory methods (solubility and enzymatic degradation.) Anim. Feed.Sci. Technol. 33:99-116.
- BRODERICK, G. A., 1987. Determination of protein degradation rates using a rumen *in vitro* system containing inhibitors of microbial nitrogen metabolism. Br. J. Nutr. 58:463-475.
- BRODERICK, G.A. AND MERCHEN N.R. 1992. Markers for qualifying microbial protein synthesis in the rumen. J. Dairy Sci. 75:2618-2632.
- BRODERICK, G. A., 1994. Quantifying Forage Protein Quality. In. G. C. Fahey, Jr., M. Collins, D.R. Mertens, and L.E. Moser(Ed). Forage Quality, Evaluation and Utilization. ASA, Madison, WI.

- BULLIS D.D., HAJ-MANOUCHEHRİ M.A. AND KNOW K.L. 1967. In situ nylon bags dry matter digestibility as a predictor of ration feeding value. *J. Anim. Sci.* 26:130.
- CAN, A., 1998. Methioninehydroxy analog supplementation for growing cattle and omasal sampling escape protein technique. Ph.D. Dissertahb., University of Nebraska, Lincoln.
- CARULLA. J., HOLLINSWORTH-JENKHITS, K., KLOPFENSTEIN, T.J. and BRITTON, R.A., 1994. Omasal sampling to estimate escape protein of forages. In: National Conference on Forage Quality, Evaluation and Utilization. University of Nebraska, Lincoln. 21.
- CHAMBERLAIN D.G. AND THOMAS P.C. 1979. prospective laboratory methods for estimating the susceptibility of feed proteins to microbial breakdown in the rumen. *Proc. Nutr. Soc.* 38: 138A.
- CHAUDHRY A.S. 2005. Comparing two commercial enzymes to estimate *in vitro* proteolysis of purified and semi purified proteins. *J. anim. Physiol. Anim. Nutr.* 89:403-412.
- CHAUDHRY A.S. 2007. Enzymic and *in sacco* methods to estimate rumen degradation of food protein in cattle. *J. Sci. Food Agric.* 26: 2617-2624.
- CRAMPTON, E.W., MAYNARD, L.A. 1938. The relation of Cellulose and Lignin Content to Nutritive Value of Animal Feeds. *J. Nutr.* 15: 383-395.
- CONE, J.W., ANTONIE, H.V.G., ANNE, S., and VUUREN, A.M.V., 1996. Prediction of in situ rumen escape protein from *in vitro* incubation with protease from *Steptomyces griseus*. *J. Sci. Food.Agric.* 72:120-126.
- CROOKER, BA., SNIFFEN, C.J., HOOVER, W.H. and JOHNSON, L.L, 1978. Solvents for soluble nitrogen measurements in feedstuffs. *J. Dairy Sci.* 61:431-447.
- DE BOEVER, J.L., AERTS, J.V, COTTYN, B.G., VANACKER, J.M and BUYSSE FX. 1984. The in sacco protein degradability vs protein solubility of contentrate ingredients. *J. Anim. Sci. Anim. Physiol*, 52: 227 -234.
- HRISTOV, A. and BRODERICK, G.A.1994. *In vitro* determination of ruminal protein degredability using <sup>15</sup>N ammonia to correct for microbial nitrogen uptake. *J. Anim. Sci.* 72: 1344-1354.

- HUNTINGTON J.A. AND GIVENS D.I. 1995. The in situ technique for studying rumen degradation of feeds. A review of the procedure. *Nutr. Abstr. Rev.* 65B: 63-93.
- HVELPLUND T. AND WEISBJERG M. R. 1998. *In vitro* techniques to replace *in vivo* methods for estimating amino acid supply. In BSAS Occasional Publication no. 22, pp. 131-144. (J.A. Huntington and T.L.J. Lawrence, Editors. Penicuik, UK: British Society of Animal Science.
- IRSHAID, R.A.H., 2007. Estimating intestinal digestibility of feedstuffs for ruminants using three step in situ-*in vitro* and *in vitro* procedures. Dissertation, Faculty of Agricultural and Nutritional Science, Christian-Albrechts-University, Kiel. 65 p.
- KENNELLY, J., 1992. The theory: why you should feed by pass protein. *Advances in Dairy Technology*, <http://www.afns.ualberta.ca/courses/ansc472/dp472-5q.htm>.
- KOPECNY, J., B. VENCIL., KYSELOVA, J. and BREZINA, P., 1989. Determination of rumen degradable protein with enzymes. *Arch. Anim. Nutr.* 7:635-645.
- KRISHNAMOORTHY U.K., SNIFFEN C.J., STERN M.D. AND VAN SOEST P.J. 1983. evaluation of a mathematical model of rumen digestion and *in vitro* stimulation of rumen proteolysis to estimate the rumen-undegraded nitrogen content of feed stuff. *Br. J. Nutr.* 50:555-568.
- LICITRA, G., LAURIA, F., CARPINO, S., SCHADT, I., SNIFFEN, C.J. and VAN SOEST, P.J., 1998. Improvement of the *Streptomyces griseus* method for degradable protein in ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72: 1-10.
- LICITRA, G., VAN SOEST, P.J., SCHADT, I., CARPINO, S., SNIFFEN, C.J., 1999. Influence of the concentration of the protease from *Streptomyces griseus* relative to ruminal protein degradability. *Anim. Feed Sci. Technol.* (77) 99-113.
- LUCHINI, N.D., BRODERICK, G.A. and COMBS, D.K., 1987.. Characterization of the proteolytic activity of commercial proteases and strained ruminal fluid. *J. Anim. Sci.* 74: 685-692.

- LOPEZ S, HOVELL F.D., MANYUCHI B AND SMART I. 1995. Comparison of sample preparation methods for the determination of the rumen degradation characteristics of fresh and ensiled forage by nylon bag technique. *Anim. Sci.* 60:439-450.
- MAHEDEVAN, S., ERFLE, J.D. and SAUER, F.D., 1987. Preparation of protease from mixed rumen microorganisms and its use for the *in vitro* determination of the degradability of true protein in feedstuffs. *Can. J. Anim. Sci.* 67: 55 -64.
- MARRINIUCCI M.T., DEHORITY B.A. AND LOERCH S.C. 1992. *In vitro* and *in vivo* studies of factors affecting digestion of feeds in synthetic fiber bags. *J. Anim. Sci.* 70:296-307.
- MEHREZ A.Z. AND ORSKOV E.R. (1977). A study of the artificial fiber bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *J. Agric. Sci. Camb.* 88:645-650.
- MEYER J.H.F AND MACKIE R.I. 1986. Microbiological evaluation of the intraruminal in sacculus digestion technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:622-634.
- MOHAMED R., AND A.S. CHAUDHRY. 2008. Methods to study degradation of ruminant feeds. *Nutrition Research Reviews.* 21:68-81.
- NOCEK J.E. 1988. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. *J. Dairy Sci.* 71:2051-2069.
- NOZIERE P., AND MICHALET-DOREAU B. 2000. In sacco methods. In *Farm Animal Metabolism and Nutrition*, pp. 223-254. J.P.F D2 Mello, Editor. Wallingford, UK. :CAB International.
- NRC, 1996. *Nutrient Requirement of Beef Cattle, Sixth Revised Ed.* Washington D.C.: National Academy Press.
- ORSKOV, E.R., 1985. Evaluation of crop residues and agro-industrial by-products using the nylon bag method. Proceedings of the FAO/ILCA expert consultation, 5-9 March 1984, Rome, Addis Ababa FAO anim. Prod. Helat paper: 50
- ORSKOV, E.R. and MACDONALD, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Camb.* 92: 499-503.
- PICHARD, G.R, 1977. Forage nutritive value: Continuous and batch *in vitro* rumen fermentation and nitrogen solubility. Ph.D. Dissertation, Cornell University, Ithaca, NY.

- PICHARD G. AND VAN SOEST P.J. 1977. Protein solubility of ruminant feeds. In Cornell Nutrition Conference, pp. 91-98. Ithaca, New York: Cornell University.
- POOS-FLOYD, M, KLOPFENSTAIN, T.J, and BRITTON, R.A.1985. Evaluation of laboratory techniques for predicting ruminal protein degradation. J. Dairy Sci. 74: 1632-1640.
- ROE, M.B., C.J. SNIFFEN, AND L.E. CHASE. 1990. Techniques for measuring protein fractions in feedstuffs. Page 81-88 in Proc Cornell Nutr. Conf. Feed Manuf., Syracuse, NY. Cornell Univ., Ithaca, NY.
- RUSSELL J.B. 1984. Factors influencing competition and composition of the rumen bacterial flora. In: Proceedings of the Symposium on Herbivore Nutrition in the Subtropics and Tropics. Pp.313-345. F.M.C. Gilchrist and R.I. Mackie, Editors. Craighall, South Africa: Science Press.
- QUIN, J.I., VANDER WATH J.G., AND MYBURGH S. 1938. studies on the alimentary tract of merino sheep in South Africa. Part IV. Description of experimental technique. J. Vet. Sci. Anim. Ind. 11:341-361.
- SAS, 1988. SAS/STAT Users Guide. SAS Institute Cary, NC, USA
- ŞEKER, M. 2008. Kaba yemlerde protein parçalanabilirliğinin in situ metot ve enzimlerle belirlenmesi üzerine bir çalışma. Y. Lisans Tezi. 27 s. Şanlıurfa.
- STERN M.D., AND SATTER L.D. 1984. Evaluation of nitrogen solubility and the Dacron bag technique as methods for estimating protein degradation in the rumen. J. Anim. Sci. 58:714-724.
- STERN M.D., BACH A. And CALSAMIGLIA S. 1991. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. J. Anim. Sci. 75:2256-2276.
- STERN M.D., VARGA G.A., CLARK H.J., FIRKIN J.L., HUBER J.T., AND PALMQUIST D.L. 1994. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. J. Dairy Sci. 77:2762-2786.
- TERRAMOCCIA S, PUPPO S., RIZZI L. AND MARTILLOTTI F. 1992. Comparison between in sacco and *in vitro* protein rumen degradability. Ann. de Zootech. 41:20.
- THOMAS C. 2004. Feed into Milk: A new Applied Feeding System for Dairy Cows: An Advisory Manual. Nottingham, UK: Nottingham University Press.

- VAN KEUREN, R.W. and HEINEMANN, W.W, 1962. Study of a nylon bag technique for *in vivo* estimation of forage digestibility. J. Anim. Sci. 57: 129-137.
- VAN SOEST, P.J., J.B. ROBERTSON, and B.A. LEWIS. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J.Dairy Sci. 74:3583-3597.
- ZINN, R.A, and OWENS, F.N, 1986. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. Can. J. Anim. Sci.66:157-166.



## ÖZGEÇMİŞ

16.03.1975 tarihinde Şanlıurfa'nın Hilvan ilçesinde doğdu. İlk , orta ve lise öğrenimini Şanlıurfa'da tamamladı. 1994 yılında Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümünü kazandı ve 1998 yılında mezun oldu. Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni bölümünde Yüksek Lisans eğitimine devam etmektedir.

## ÖZET

Bu çalışma kaba yemlerin BP değerlerini *in vitro* enzim tekniği ile belirlemede en uygun enzim konsantrasyonunun saptanması amacıyla yürütülmüştür. Yem materyali olarak 7 farklı kaba yem kullanılmıştır. Kullanılan yemler; fiğ kuru otu (F), buğday silajı (BSL), mercimek samanı (MS), buğday kuru ot (BKO), tritikale (T), yonca kuru otu (Y) ve mısır silajı (MSL)'dir.

Fiğ kuru otu, buğday kuru otu ve mısır silajının *in situ* BP değerleri ile *in vitro* BP değerleri istatistiksel olarak benzer bulunmuştur. Buğday silajı, mercimek samanı ve yonca otunun *in vitro* BP değerleri *in situ* değerlerinden farklı bulunmuştur. *In vitro* teknikte inkübasyon süresinin 72 saate çıkarılması sadece fiğ ve yonca kuru otunun BP değerlerini etkilerken diğer 5 kaba yemin BP değerleri üzerine etkisi bulunmamıştır. Yine benzer şekilde enzim konsantrasyonunun artırılmasının BP değerleri üzerine etkisi tüm kaba yemler için aynı olmamıştır. Sonuç olarak her yem maddesi için ayrı ayrı inkübasyon sürelerinin ve enzim konsantrasyonlarını *in vivo* ve *in situ* veriler esas alınarak belirlemeye ihtiyaç duyulmaktadır.

## SUMMARY

This study was conducted to determine the optimum enzyme concentration of protease solution in *in vitro* method for determining by-pass protein value of roughages. Total 7 roughages were used as roughage sources. These roughages included vetch hay, wheat silage, wheat hay, lentil straw, triticale hay, and alfalfa hay and corn silage.

By pass protein values of vetch hay, wheat hay and corn silages were found similar in both *in vivo* and in *in vitro* enzyme technique. However other roughages had differed BP values according to technique. While increasing incubation length from 48 h to 72 h affected BP values of alfalfa hay and vetch hay, BP values of other roughages were not affected. Similarly, increasing enzyme concentration did not changed BP values of all roughages. Therefore, future studies should be focused on enzyme concentration and incubation length for separately for each roughage using *in vivo* and *in situ* procedure as a standard.