

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KABA YEMLERDE PROTEİN PARÇALANABİLİRLİLİĞİNİN İN SİTU
METOT VE ENZİMLERLE BELİRLENMESİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA**

Mahmut ŞEKER

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURA
2008**

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KABA YEMLERDE PROTEİN PARÇALANABİLİRLİLİĞİNİN İN SITU
METOT VE ENZİMLERLE BELİRLENMESİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA**

Mahmut ŞEKER

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2008**

Doç. Dr. Abdullah Can danışmanlığında, Mahmut ŞEKER'in hazırladığı 'Kaba Yemlerde Protein Parçalanabilirliğinin İn Situ Metot ve Enzimlerle Belirlenmesi' konulu bu çalışma 28/04/2008 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 Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr İbrahim BOLAT
Enstitü Müdürü

Bu çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir.
Proje NO: 809

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
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Yemlerin İçermiş Oldukları Proteinlerinin Rumendeki Parçalanabilirliğinin Belirlenmesinde Kullanılan Metotlar	3
1.1.1. İn vivo metot	3
1.1.2. İn situ metot.....	3
1.1.3. İn vitro metot.....	5
1.2. By pass protein.....	6
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
3. MATERYAL ve YÖNTEM	11
3.1 Materyal.....	11
3.1.1. Yem materyali.....	11
3.1.2. Hayvan materyali.....	12
3.1.3. Naylon keseler.....	13
3.1.4. Filtre kağıdı.....	13
3.1.5. Enzim	13
3.2. Yöntem.....	14
3.2.1. Yemlerin öğütülmesi ve ham besin madde içeriklerinin belirlenmesi.....	14
3.2.2. İn situ belirleme (naylon kese tekniği).....	14
3.2.3. Enzim tekniği.....	15
3.2.4. Analitik işlemler.....	16
3.2.5. Sindirilebilirlik hesaplamaları.....	16
3.2.6. İstatistiksel analizler.....	16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	17
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	21
5.1. Sonuç.....	21
5.2. Öneriler.....	21
KAYNAKLAR	22
ÖZGEÇMİŞ	25
ÖZET	26
SUMMARY	27

ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

KABA YEMLERDE PROTEİN PARÇALANABİLİRLİLİĞİNİN İN SİTU METOT VE ENZİMLERLE BELİRLENMESİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

Mahmut ŞEKER

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootečni Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Abdullah CAN
Yıl: 2008, Sayfa:27

Bu çalışmada kaba yemlerdeki protein parçalanabilirliğinin belirlenmesinde in situ metot yerine enzim metodu kullanım olanaklarını araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan 8 farklı kaba yemin (fiğ, buğday silajı, buğday kuruotu, mercimek samanı, kuruot, tritikale, yonca ve mısır silajı) önce in situ by pass protein değerleri naylon kese tekniği ile belirlendikten sonrada ticari bir proteaz enzimi olan *Streptomyces griseus* farklı inkübasyon süreleri (1, 6, 24 ve 70 saat) kullanılarak by pass protein değerleri hesaplanmıştır. Enzim denemesinde 70 saatlik inkübasyon süresi sonunda denene yemlerin 5 tanesinde elde edilen by pass protein değerleri in situ metotla elde edilen değerler ile benzer bulunmuştur ($P>0.05$).

Sonuç olarak kaba yemlerin by pass protein içeriklerinin belirlenmesinde in situ metot yerine *Streptomyces griseus* ile yapılan enzim tekniğinin kullanılabilceği ve bu teknikte inkübasyon süresinin 70 saat olacağı sonucuna varılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER : İn situ metot, Enzim tekniği, *Streptomyces griseus*

Abstract

Msc. Thesis

A STUDY FOR DETERMINATION OF RUMINAL PROTEIN DEGRADABILITY OF FORAGES WITH IN SITU and IN VITRO ENZYME METHODS

Mahmut ŞEKER

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Abdullah CAN

Year: 2008, Page: 27

In this study, usage of enzyme methods instead of in situ methods for determining by-pass protein values of forages was investigated. Ruminal protein degradability of eight forages (Vetch hay, wheat silage, wheat hay, lentil straw, grass hay, triticale hay, alfalfa hay and corn silage) was estimated by using the in situ methods and in vitro enzyme method obtained from *Streptomyces griseus* with different incubation times (1, 6, 24 and 70 hours). By-pass protein values of five forages were found similar with both techniques ($P > 0.05$)

According to current study, future studies should be focused on 70 h incubation time when usage of enzyme method for replacement of in situ methods is considered.

KEY WORDS: In situ method, Enzyme techniques, *Streptomyces griseus*

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez konumun seçimi, denemenin planlanması ve yürütülmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve bu tezin yazım aşamasında her türlü yardımı ile bana yol gösteren danışmanım Doç. Dr. Abdullah CAN'a, Doç. Dr. Nihat DENEK'e, Yrd. Doç. Dr. Şahin ÇADIRCI'ya, Esmâ POLAT'a, Okul ve meslek hayatım boyunca beni destekleyen anneme, babama ve kardeşlerime denemenin kurulması ile değerlendirilmesi aşamasında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen herkese teşekkürlerimi sunarım.

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1. In situ yöntemin RPP değerlerinin doğruluğunu etkileyen etmenler.....	5
Çizelge 3.1. Denemede kullanılan yemlerin besin madde kompozisyonu.....	12
Çizelge 4.1. Denemede kullanılan yemlerin in situ ve in vitro by pass protein değerleri..	18

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 3.1. Rumen kanüllü hayvan.....	13

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
KO	Kuru Ot
MS	Mercimek Samanı
BSL	Buğday Silajı

1. GİRİŞ

Ruminantlarda protein beslemesi karışık ve dinamik bir yapıya sahiptir. Bu hayvanlarda azot sindirimi ve metabolizması; doku düzeyinde amino asit ihtiyacının bilinmesinin yanı sıra sindirim kanalında ve özellikle rumende yaşayan mikroorganizmaların azot ihtiyaçlarının bilinmesinde gerek duyulması açısından tek mideli hayvanların protein ihtiyaçlarının belirlenmesinden farklıdır. Ruminantların protein ihtiyaçlarının belirlenmesinde yaygın olarak iki sistem kullanılmaktadır. Ham protein sistemi veya faktöriyel sistem eski olmasına rağmen halen yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu sistem her türlü yemin ham protein içeriğinin eş değeri olduğunu kabul eder. Oysa yemlerin içermiş oldukları ham proteinlerin rumendeki mikrobiyal yıkımları ve dolayısıyla etkinlikleri farklılık gösterir. Bu eksikliği gidermek için alternatif olarak metabolik protein (MP) sistemine geçilmiştir (NRC, 1996). Bu iki sistem arasındaki fark MP sisteminin rumende meydana gelen protein parçalanabilirliğini dikkate almasıdır. MP sisteminde hayvanın toplam protein ihtiyacı, hayvanın ve mikroorganizmaların ihtiyacı olarak ikiye ayrılmaktadır.

Ruminant hayvanlarda yemlerin içermiş olduğu metabolize olabilir protein (MOP) miktarının belirlenmesinde kullanılan metotlar yemler tarafından ince barsağa geçen toplam emilebilir amino asit miktarı üzerinden hesaplanmaktadır.

Ruminantlarda ince barsağa ulaşan amino asitler, ya mikrobiyal veya yemin mikrobiyal olarak parçalanmayan protein kısmından yani by pass proteinden (BP) oluşmaktadır.

Yemlerin By pass protein (BP) ve bakteriyel protein miktarının doğru tahmin edilmesi yemlerin MOP değerlerinin belirlenmesi ve hayvanın amino asit ihtiyaçlarının karşılanması için gereklidir.

Ruminantlarda ham protein sindirilebilirliğinin belirlenmesinin aslında çok fazla önemi yoktur. Çünkü yemlerin içermiş olduğu proteinlerin amino asitlere dönüşmesi sindirim kanalında yemlerin parçalanabilirliğine ve rumende mikroorganizmalarının azot ihtiyacına göre değişmektedir. Dolayısıyla ruminantlarda protein ihtiyacının karşılanması ve metabolizması oldukça karmaşıktır. Beslenmesi komplekstir.

Kaba yemlerin yapılarında bulunan proteinler rumende hızlı bir biçimde mikroorganizmalar tarafından parçalanırlar. Bu yüzden kaba yem proteinleri rumende etkin parçalanabilir protein (RPP) kaynağıdır ve BP kaynağı bakımından fakirdirler.

Kaba yem proteinleri rumende parçalanmaya uğradığında mikrobiyal gereksinimden daha fazla amonyak üretirlerse, rumen mikroorganizmaları oluşan fazla amonyağı kullanmazlar ve rumende amonyak olarak absorbe edilirler. Absorbe edilen amonyak protein olarak kullanılamaz.

Rumende mikrobiyal amonyak gereksinimi karşılandığı zaman artık kaba yem proteinlerinin daha fazla yıkımlanması istenmez.

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 teknik 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 bulunmakta ancak bu yöntemlerin bazıları sağlıklı sonuçlar vermemektedir. Bu çalışma hayvan beslemede önemli bir faktör olan RPP'nin rumende parçalanabilir protein miktarının hesaplanması konusunda daha pratik yöntemlerin bulunması açısından önem taşımaktadır.

1.1. Yemlerin İçermiş Oldukları Proteinlerinin Rumendeki Parçalanabilirliğinin Belirlenmesinde Kullanılan Metotlar

Yemlerin içermiş oldukları proteoınlerin parçalanabilirliklerinin belirlenmesinde kullanılan metotlar; *in vivo* metot, *in vitro* metot ve *in situ* metotlardır.

1.1.1. İn vivo metot

Yemlerin yapısında bulunan proteinlerin rumendeki parçalanabilirliğinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden en yaygın ve bilinen olan *in vivo* metottur. Ölçümler rumende ve ince bağırsağın duodenum kısmında veya rumende toplam 2 kanül açılmış hayvanlar üzerinde gerçekleştirilir. Yöntemde hayvanın KM bazında günlük yem tüketiminin ve mide veya ince barsakta sindirilmeyen yem maddelerinin günlük akış miktarının tesbiti gerekmektedir. Bunun için toplam kanal içeriğinin alınması yada az miktarda indikatör (marker)'lü 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.

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

1.1.2. İn situ metot

Bu metot, yemlerin içeriğinde bulunan proteinlerin rumen parçalanabilirliğini ölçmede kullanılan en yaygın metottur. Yöntemde, yem örnekleri naylon keseler içine konularak rumende belirli süreler bekletilmekte ve torba içersindeki yem

örneğin KM ve azot kaybına bakılarak yem proteinlerinin rumendeki parçalanabilirliği bulunkatadır (Mehrez ve Orskov, 1977).

Yöntemin çeşitli dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar;

1 – Torba içersindeki yeme mikroorganizmaların ulaşmasındaki güçlük (Meyer ve Makie, 1986).

2 – Torba içersindeki sindirilemeyen yeme mikroorganizmaların bulaşması (Nocek ve Grant, 1988)

3 – Çözünmüş olmasına rağmen parçalanamayan yem proteinin yıkanarak torbayı terketmesidir.

In situ yönteme dair ilk araştırma sonuçları Van Keuren ve Heinemann (1962) tarafından yayınlanmıştır. Ancak bu yöntem, Ham protein parçalanabilirliği için Orskov ve Mc Donald (1979)' ın geliştirdikleri eksponensiyel modelin yardımı ile geniş ölçüde kullanılmaya başlanmıştır.

In situ yöntemin RPP değerlerinin doğruluğunu etkileyen etmenlerin etkilerini inceleyecek olursak;

Çizelge 1.1. *In situ* yöntemin RPP değerlerinin doğruluğunu etkileyen etmenler (Adesogan, 2002).

Etmen	Etki
Fırında Kurutma	Azot parçalanabilirliğini ve çözünübilirliğini azaltır
Dondurarak Kurutma	Partikül kayıplarını
Öğütme	Mikrobiyal kolonizasyonu artırarak parçalanma süresinin düşük, parçalanma oranının yüksek tahmin edilmesine sebep olur
Partikül Büyüklüğü	İri partiküller ile bekleme süresi uzar.
Yıkama	Makine ile yıkama çözünürlük ve partikül kayıplarının yüksek tahmin edilmesine sebep olur. Ancak elle yıkamadan daha az sağlıklıdır.
Partikül Kayıpları	Rumen çözünübilirliği ve parçalanabilirliği değerlerinin yüksek çıkmasına sebep olabilir.
İnkübasyon Süresi	Rumen ortamındaki değişikliklere göre parçalanma oranı azalabilir.
İnkübasyon Yeri	Dorsal rumen boşluğundaki substrat inkübasyonu, ventral boşluğa göre düşük kolonizasyon nedeniyle değerlerin düşük çıkmasına neden olmaktadır.
Kesenin Gözenek Ölçüsü	< 15 µm ise, mikrobiyal kolonizasyonu kısıtlayarak parçalanmayı azaltır. > 40 µm ise, çözünmeyen / parçalanmayan partikül kayıplarına neden olur.
Kesnin Dokuma Tipi	Tek katlı iplikten dokunan keselerin gözenekleri şekil bozukluğuna neden baskılara dayanıksız olduğundan partikül kayıplarını artırır.
Mikrobiyal Bulaşma ve Kalıntılar	Düşük oranda Azot içeren yemlerde Protein parçalanması düşük olarak belirlenir.

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.

1.1.3. İn vitro metot

Yemlerin rumen sıvısında inkübasyonunu takiben proteinlerin parçalanması sonucu ortaya çıkan amonyağın tesbitinde en yaygın metot *in vitro* protein parçalanabilirliği ölçme metodudur. Bu yöntemin avantajı kolay ve hızlı oluşudur. Dez avantajı ise parçalanma sonucu açığa çıkan amonyağın tam olarak ölçülememesidir (Broderick, 1987).

Bu yöntemin temeli ticari proteaz enzimleri kullanılarak yemin protein parçalanabilirliğini tayin etmektir (Poos-Floyd ve ark., 1985).

1.2. By pass protein

By-pass protein, yem proteininin rumen mikroorganizmaları tarafından parçalanmadan ince barsaklara ulaşan kısmına denmektedir.

By-pass protein ruminantların hayvanların beslenmesinde önemli bir protein fraksiyonu olup rumende mikrobiyal parçalanmaya uğramaksızın rumeni terk eden bir protein fraksiyonu olarak kabul edilmektedir.

By-pass proteinler, sindirimi tamamıyla ince bağırsaklarda enzimatik olarak cereyan eden ve hayvanların verim özelliklerini yakından ilgilendiren esansiyel amino asitleri sağlaması açısından önemli olan yapısal proteinlerdir. İnce bağırsaklardan emilen amino asitlerin %60'ını bakteriyel orijinli proteinler oluştururken geri kalan %40'luk kısmı BP'lerin oluşturduğu savunulmaktadır (King ve ark., 1990).

Bu yüzden yemlerin yapısında bulunan proteinlerdeki BP fraksiyonu son derece önemli bir kısmı oluşturmaktadır. Ruminantların rasyonlarında (özellikle süt sığırı) verim özellikleri dikkate alındığında rasyonun mutlaka BP'ler yönünden de dengelenmesi gereklidir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kaba yemlerin rumendeki protein parçalanmasının kapsam ve oranının belirlenmesinde nitrojen çözünübilirliği (Crooker ve ark., 1978), ticari proteazlar (Mahadevan ve ark., 1987; Luchini ve ark., 1987) ve inhibitörler kapsayan süzölmüş prominal sindirim içeriği (Broderick, 1987) kullanılan *in vitro* yöntemler geliştirilmiştir. Azot çözünübilirliğini 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).

Kaba yemlerin yapısında bulunan proteinlerinin BP'lerini *in vitro* yöntemle belirlemek için mikrobiyal indikatörler kullanılmaktadır. Purin, yaygın olarak kullanılan mikrobiyal protein indikatörüdür.

In vitro yöntemlerde, yemlerin RPP'lerinin 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).

Streptomyces griseus'dan elde edilen proteazın geniş bir etki alanına sahip olması nedeniyle tercih edildiği bildirilmektedir. (Pichard, 1977).

Abdelgader ve ark. (1996), yonca ve çayır kuru otunun rumende parçalanabilirliğini, ilk aşamada sellülaz veya karbohidraz karışımı (driellaz)

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. Sellüloz 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 arasındaki yakın korelasyon değerleri ($R^2 = 0.75$) olduğunu saptamışlardır. Ayrıca proteaz inkübasyonu öncesi sellüloz veya karbonhidrat yıkımlayan enzimlerin kullanılmasının gereksiz olduğunu bildirmişlerdir.

RPP değerini belirlemede kullanılan diğer bir yöntem ise protein çözünürlüğü yöntemidir (De Boever ve ark., 1984; Madsen ve Hvelplund, 1985).

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 –N- den giderek RPP değerlerini tahmin etmişlerdir. Ancak ruminant rasyonlarında kullanılan tüm yem ham maddeleri grupları için farklı düzeltme katsayılarının kullanılması yönteminin uygunluğunu azalttığını bildirmişlerdir.

Kopecny ve ark. (1989), Kaba yemlerin RPP değerlerini belirlemek için alkalaz (Novo), fromaz (Rapidase Sechon), rennin (Laktofiora), papain (Laba),

pronaz E (Serva,), tripsin (Leciva) farklı enzimlerini 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 çözünlürlüğünü 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.

In vivo veya *in situ* yöntemlerle BP tayini yapılmak istendiğinde rumen ve duodonal kanüllü hayvanlara ihtiyaç duyulmakta ve çoğu laboratuvarlar bu imkâna sahip değildir.

Son yıllarda Kansas Üniversitesinde yapılan çalışmalarda *Streptomyces griseus*'dan elde edilen enzimle kaba yemlerin by pass protein içeriklerinin belirlenebileceği bildirilmiştir (Abdelgader ve ark., 1997).

Ülkemizde kaba yemlerin BP değerlerinin belirlenmesinde enzim tekniğinin kullanımını yeterince irdelenmemiştir. Bu çalışma kaba yemlerin BP değerlerinin belirlenmesinde *in situ* yöntemine alternatif olarak *Streptomyces griseus*'dan elde edilen proteolitik enzimin kullanım olanaklarının incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

Günümüzde pürin metodu kullanılarak mikrobiyal proteinin hesaplamasında varyasyonun yüksek olduğu ve düzeltme katsayısı değişken olduğundan için yanlış sonuçlar verdiği bildirmekte ve bunun yerine alternatif olarak *in situ* ruminal inkübasyondan sonra nötral deterjan çözeltisi ile örneklerin yıkanması önerilmektedir (Can, 1998).

Bu alternatif yöntem, pürinle düzeltilmiş yöntem ile yüksek oranda korelasyon içinde olup daha basit bir teknik olarak kabul edilmektedir (Klopfenstein ve ark., 2001).

Bazı araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda konsantre yemlerde protein parçalanabilirliğinin tayini için serbest enzimlerin kullanımının yeterli olmadığını bildirmiştir (Broderick, 1994; Broderick, 1997).

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).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Yem materyali

Bu çalışmada yem materyali olarak 8 farklı kaba yem kullanılmıştır. Kullanılan yemler; fiğ kuru otu (F), buğday silajı (BSL), buğday kuru otu (BKO), mercimek samanı (MS), kuru ot (KO), tritikale (T), yonca otu (Y) ve mısır silajı (MSL) dır.

Bu yemlerden F ve KO Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nde bulunan araziden, BSL , BKO, T, MS, MSL, buğday silajı, buğday kuru otu, tritikale, mercimek samanı ve mısır silajı özel bir işletmeden, Y ise Kayseri ilinde bulunan bir aile işletmesinden temin edilmiştir.

Bahsi geçen yemler kurutulmuş ve 2 mm çaplı elekte öğütülerek denemede kullanılmaya hazır hale getirilmiştir. Kullanılan yemler deneme süresince kuru ortamda kavanozlarda saklanmıştır. Işık almaması için kavanozların dış yüzeyleri renkli bantlarla sarılmıştır.

Çalışmada kullanılan yemlerin besin madde kompozisyonları çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan yemlerin besin madde kompozisyonu

	FİĞ	BSL	BKO	MS	KO	T	Y	MSL
KM	87.81	46.21	94.24	95.18	90.58	93.75	88.78	32.10
KÜL*	9.13	7.70	8.24	12.96	10.82	6.99	10.87	9.79
ADF*	34.15	38.81	41.61	44.22	43.77	40.3	32.76	39.74
NDF*	45.56	55.13	65.02	57.07	66.19	63.13	45.13	59.78
SELÜLOZ*	25.55	31.25	31.97	30.45	35.07	32.46	22.40	30.15
HP*	13.84	8.20	11.60	8.31	15.89	10.11	17.87	9.79

*: Değerler Kuru Madde bazında verilmiştir.

3.1.2. Hayvan materyali

Bu çalışmada hayvan materyali olarak Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesinde bulunan ve ortalama canlı ağırlıkları 55-60 kg olan 4 adet rumen kanüllü erkek toklu kullanılmıştır.

Kullanılan hayvanlar ortalama 55 – 60 kg ağırlıktadır. Kanül yerleştirilmiş toklulara yaşama payı x 1.25 (Orskov ve ark., 1980) formülüne göre günde verilen rasyon %75 oranında kuru yonca ve % 25 oranında konsantre yemden oluşturulmuştur. Konsantre yem ise %50 arpa, %25 ayçiçeği tohumu küspesi, %21 buğday kepeği, %1 tuz, %1 DCP, %1 kireçtaşı, %1 vitamin mineral karması içerecek şekilde hazırlanmıştır.



Şekil 3.1. Rumen kanüllü hayvan

3.1.3. Naylon keseler

Çalışmada kullanılan naylon keseler 15cm x 10cm ebatlarında 40 µm gözenek Çapında dakron kumaştan dikilerek hazırlanmıştır.

3.1.4. Filtre kağıtları

Çalışmada Whatman 41 numaralı filtre kağıtları süzme işleminde kullanılmıştır.

3.1.5. Enzim

Çalışmada ticari bir proteaz olan *Streptomyces griseus* (XIV, Sigma P-5147, St Louis, MO, USA) enzimi kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Yemlerin öğütülmesi ve ham besin madde içeriklerinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan suca zengin yemler kurutma dolabında kurutulduktan sonra 2 mm elek çaplı değirmende öğütülerek analize hazır hale getirilmiştir.

Kaba yemlerin kuru madde (KM), Ham Protein (HP), Ham Kül (HK) analizleri AOAC' (1984) in, ADF ve NDF analizleri ise Van Soest ve Robertson (1979)' un Ham Selüloz (HS) analzi ise Crampton ve Maynard (1938)' in bildirdikleri yönteme göre yapılmıştır.

3.2.2. İn sitü belirleme (naylon kese tekniği)

Çalışmada bahsi geçen yemlere ait örnekler her muamele süresi için 4 er tekerrür halinde yaklaşık olarak 3'er gram tartılarak 15 cm x 10 cm ebatlarındaki 40 µm gözenek ölçülü dakron kumaştan hazırlanmış ve ağırlıkları daha önceden ölçülmüş keselere konulmuştur.

Daha sonra bu keselerin ağızları paket lastiği ve iplerle bağlanmış böylece keselerin uç kısımlarından örneklerin dışarıya dökülmesi engellenmiştir.

Naylon keseler 25 cm' lik hortumlara bağlanmış ve her hortumda aynı yeme ait 2 adet yem örneği bulunacak şekilde bağlanmıştır.

Hortumlara bağlanan keseler Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne ait ağıldakirumen kanüllü tokluların rumenlerinin ventral kesesine yerleştirilerek 4, 16 ve 96 saatlik sürelerle inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem 4 tokluda ve her tokulda bir kez olmak üzere denenmiştir. İnkübasyon süreleri tamamlandığında rumnenden çıkarılan naylon keseler mikrobiyal faaliyetin hemen durması için soğuk suyla yıkanmıştır. Soğuk suyla yıkanan keseler Fakültede bulunan laboratuara götürülerek çamaşır makinesinde durulama suyu berraklaşınca kadar yıkanmıştır. Durularak temizlenen keseler kurutma dolabında 60 °C' de 48 saat süreyle

kurutulmuştur. Kurutulan örneklerin ağırlıkları ölçülmüş böylelikle keselerin içinde kalan yem örneklerinin miktarı tesbit edilmiştir.

Daha sonra kese içindeki yem kalıntılarının azot içeriği Kjeldahl metodu ile belirlenmiştir.

3.2.3. Enzim tekniği

Çalışmada ilk önce inkübasyonda kullanılmak üzere pH'sı 8 olacak şekilde 0,1 molar boratfosfat tamponu hazırlanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltinin içine ticari bir proteaz enzimi olan *Streptomyces griseus* (XIV, Sigma P-5147, St Louis, MO, USA) litre başına 20 mg olacak şekilde ilave edilmiştir. Ayrıca mikrobiyal gelişimi engellemek için tampon çözeltiliye 1 mg/litre⁻¹ tetracyclin (Sigma T-3258) ilave edilmiştir.

Daha sonra whatman marka 41 numaralı filtre kağıtları 65 °C'de kurutularak ağırlıkları ölçülmüş ardından yemlere ait örnekler 4'er tekerrür halinde yaklaşık 0.2'şer gram tartılmıştır. Tartılan yemler *in vitro* inkübasyon tüplerinin içine konulmuştur. Tüplerin içine hazırlanan tampon çözeltiden 40 ml ilave edilmiş ve tüpler 38 °C'de ısıtılmış su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır.

Aynı işlem 1, 6, 24 ve 70 saatlik inkübasyon süreleri için tekrarlanmış ve her bir inkübasyon sonunda tüplerin içinde bulunan örnekler filtre kağıtlarından süzülerek iyonize su ile yıkanmıştır. Yıkama ve süzme işleminin ardından filtre kağıdı içinde kalan yemler kurutma dolabında 65 °C'de 48 saat süreyle bekletilmiş ve daha sonra ağırlıkları tekrar ölçülmüştür.

Daha sonra ağırlıkları ölçülen filtre kağıtları içinde bulunan yem kalıntılarının azot içeriği Kjeldahl metodu ile belirlenmiştir. Kalıntıda saptanan toplam protein miktarı inkübasyon öncesi toplam ham protein oranından gidilerek BP miktarları hesaplanmıştır.

3.2.4. Analitik işlemler

İn situ teknik ile inkübasyona bırakılan naylon keselerdeki yem kalıntılarının azot içeriği kese içinden alınan örnekler kullanılarak kjeldahl metodu ile analiz edilmiştir.

Enzim tekniği ile inkübasyon sonucunda elde edilen ve filtre kağıdında bulunan yem kalıntılarının azot içeriği ise, filtre kağıtlarının tamamı (küçük parçalar halinde doğranarak) kullanılarak kjeldahl metodu ile analiz edilmiştir.

3.2.5. Sindirilebilirlik hesaplamaları

Proteinlerin rumende parçalanabilirliğinin tayininde kullanılan model aşağıda gösterilmiştir (Broderick, 1994).

$$\%BP=B*((Kp/(Kk+Kd)) + C$$

BP: By pass protein

B: Rumendeki parçalanmayı geçme potansiyeline sahip protein miktarı

Kp: Rumenden geçiş oranı

Kd: Proteinin rumende parçalanma oranı

C: Sindirilemeyen protein

3.2.6. İstatiksel analizler

Deneme sonunda elde edilen verilerin karşılaştırılması varyans analizi, gruplar arasındaki farklılığın belirlenmesinde ise LSD testi uygulanmıştır. Bu amaçla SAS paket programı kullanılmıştır (SAS, 1988).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çalışma kullanılan ve analizler sonucunda belirlenen fiğ, buğday silajı, buğday kuruotu, mercimek samanı, kuru ot, tritikale, yonca ve mısır silajı yemlerine ait *in situ* yöntem ve *in vitro* yöntem by pass protein değerleri çizelge 4.1' de verilmiştir.

Denemede kullanılan yemlerin *in situ* ve *in vitro* enzim tekniği kullanılarak bulunan değerleri arasındaki ilişkiyi inceleyecek olursak;

Fiğ, buğday kuruotu, kuruot, ve mısır silajı yemlerindeki *in situ* metotla sırasıyla hesaplanan %32.89, %28.95, %38.85 ve %40.02 by pass protein değerleri ile *in vitro* metotla 70 saatlik inkübasyon sonucunda sırasıyla hesaplanan %31.91, %31.04, %34.36 ve %38.99 by pass protein değerleri arasındaki benzerlik istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur($P>0.05$).

Tritikale yemindeki *in situ* metotla hesaplanan %41.18 değeri ile *in vitro* metotla belirlenen 24 ve 70 saatlik inkübasyon sonucunda sırasıyla hesaplanan %44.56 ve %37.98 by pass protein değerleri arasındaki benzerlik istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P>0.05$).

Buğday silajı, mercimek samanı ve yonca yemleri için hesaplanan *in situ* ve *in vitro* by pass protein değerleri arasında her hangi bir benzerlik bulunamıştır($P<0.05$).

Başka bir deyişle, çalışmada kullanılan 8 farklı yemin beşinde *in situ* metot ve *in vitro* metot (70 saatlik inkübasyon) ile belirlenen by pass protein değerleri arasında benzerlik bulunmuştur($P>0.05$).

Çizelge 4.1. Denemede kullanılan yemlerin *in situ* ve *in vitro* by pass protein Değerleri (%)

	Fiğ	BSL	BKO	MS	KO	T	Y	MSL
İN SİTU METOT	32.89 ^C	40.35 ^C	28.95 ^C	31.13 ^D	38.85 ^C	41.18 ^{BC}	27.44 ^D	40.02 ^D
İN VİTRO METOT (1 SAAT)	54.26 ^A	67.29 ^A	52.35 ^A	63.01 ^A	58.53 ^A	55.41 ^A	53.91 ^A	71.07 ^A
İN VİTRO METOT (6 SAAT)	52.71 ^A	64.42 ^A	50.61 ^A	60.31 ^A	53.18 ^A	56.03 ^A	51.11 ^A	65.50 ^B
İN VİTRO METOT (24 SAAT)	41.16 ^B	52.59 ^B	38.41 ^B	43.96 ^B	45.29 ^B	44.56 ^B	43.45 ^B	50.99 ^C
İN VİTRO METOT (70 SAAT)	31.91 ^C	32.36 ^D	31.04 ^C	34.82 ^C	34.36 ^C	37.98 ^C	33.84 ^C	38.99 ^D
SEM	0.88	1.14	0.69	1.06	1.85	1.40	1.58	1.56
P	*		*		*	*		*

^{A, B, C, D, BC}: Aynı sütundaki aynı harfle gösterilen değerler arasındaki benzerlik saptanmıştır. *: P>0,05

Abdelgader ve ark. (1996), herhangi bir ön muamele yapmaksızın *Streptomyces griseus* enzimi kullanılarak yonca ve saman gibi kaba yemlerin protein yıkımlanabilirliğinin hesaplanabileceğini bildirmiştir. Nitekim bu çalışmada da *in situ* metotla hesaplanan by pass protein değerleri ile enzimatik çalışma (70 saatlik inkübasyon) sonucunda elde edilen değerler arasında da benzerlik görülmüştür.

In situ metot ile *Streptomyces griseus* proteazı kullanılarak belirlenen BP değerlerinde, enzim tekniğinde 24 saatlik inkübasyonun *in situ* metotla benzerlik gösterdiğini ve bu iki tekniğin birbirleriyle karşılaştırılabileceğini belirtmiştir. Ancak her ne kadar benzerlik olsada 24 saatlik inkübasyon sonucunda *in vitro* parçalanamayan bölümlerin olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada da 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda tritikale içinin *in situ* ve enzim tekniği ile elde edilen değerlerin benzer çıkması Cone ve ark., (1996) in çalışması ile uyum göstermektedir.

Aufrere ve ark. (1991), yemlerin BP değerlerini belirlemede *in situ* teknik yerine *in vitro* enzim tekniğinin kullanılması için benzer yem grupları için elde edilen BP değerlerinden *in situ* teknik ile elde edilen BP değerleri belirlemede düzeltme faktörü kullanmışlardır. Yemler küçük gruplara ayrıldığında varyasyon

değerleri azaltılmıştır. Ancak çok yaygın kullanılmayan ve daha önce test edilmemiş yemler ve tüm rasyonlar için bu tekniğin daha az kullanışlı olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada da en uygun sonuçlar enzimle 70 saat süreli inkübasyonla belirlenen süre olmasına rağmen 8 yemden sadece 5 tanesi doğru olarak tahmin edilmiştir.

Yine çalışmada *in situ* metotla belirlenen BP değerleri standart olarak kullanılmıştır. Ancak bu tezin önceki çalışmalar bölümünde açıkladığı gibi *in situ* tekniğinde birçok sakıncası vardır. Standart olarak *in vivo* ölçümlerin kullanılması gerekir. Fakat yemlerin BP değerlerini ölçmek ve daha önce ölçülmüş değerlerini bulmak oldukça zordur.

Yemlerin parçalanabilirlik değerlerinin belirlenmesinde çok sayıda proteaz enzimi RPP'lerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. *Streptomyces griseus*'dan elde edilen proteazlar ise bunlar arasında en yaygın olarak kullanılanlardır. *Streptomyces griseus*'un yaygın kullanımının nedeni ise geniş etkili olmasıdır. *Streptomyces griseus*'dan elde edilen proteaz enzimi tamamen ekstraselüler olup endo ile ekzo peptidazların karışımından oluşmaktadır (Pichard, 1977).

Bu çalışmada *in vitro* yöntemde yemlerden sadece birinde 24 saatlik inkübasyonun yeterli olması ancak diğer yemlerde 70 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen verilerin *in situ* metotla örtüşmesinin farklı sebepleri olabilir. Nitekim, yapılan bir çalışmada laboratuvar şartlarında uygulanabilen iş gücü ve maliyeti düşük olan enzim tekniği ruminal ortamla karşılaştırıldığında enzim tekniğinin uygulandığı ortamda tam bir enzim aktivitesinin gerçekleşemeyeceği bildirilmiştir (Stern ve ark. 1977).

Streptomyces griseus ' dan elde edilen proteazlar nötr ve alkali pH'larda aktif, şelat oluşturan ajanlara (EDTA) ve soya tripsin inhibitörüne karşı çok hassastır (Trop ve Birk, 1970; Matsubara ve Feder, 1971).

Yapılan bir çalışmada kaba yemlerin protein parçalanabilirliğinin pH 6.7 ye göre pH 8.0 da daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Michalet-Dorueau ve Ould-Bah, 1992).

Araştırmacılar optimum protein parçalanabilirliği için pH değerinin 8 olmasının en iyi olduğunu bildirmişlerdir (Cone ve ark., 1996).

Assoumani ve ark. (1992), *Streptomyces griseus*' dan elde edilen alkali proteaz ile *Bacillus subtilis*' ten elde edilen nötral proteazı pH 8.0 ve pH 6.5' de protein parçalanabilirliğine etkisini 8 farklı yem kullanarak belirlemeye çalışmışlardır. Çalışmalarında pH 6,5'de iki farklı enzimin protein parçalanabilirliğine etkisinin in situ değerler ile benzer olduğunu bildirmiş ve regresyon eşitliği sabiti ve eğimi açısından ise alkali proteazın avantajlı olduğu sonucuna varmışlardır.

Mathis ve ark. (2001), *Streptomyces griseus* kullanılan enzim metodunda 4 saat ile 48 saat inkübasyon süresi arasında enzim konsantrasyonunun iyi ayarlanamsı durumunda yakın bir ilişki olduğunu belirlemişlerdir. *Streptomyces griseus* kullanılan enzim metodunun 4 veya 8 saat inkübasyon sresinin uygun enzim konsantrasyon aktivitesi ve süresi seçilmesi durumunda in situ değerleri tahmin etmede kabul edilebilir olduklarını bildirmişlerdir. Her 15 mg substrakt azot için toplam 3.3 U enzim aktivitesi önermişlerdir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Sekiz farklı kaba yem kullanılarak uygulanan bu çalışmanın sonucunda kaba yemlerde RPP belirlenmesinde kullanılan metotlardan olan *in situ* metot(naylon kese tekniği) ile farklı inkübasyon süreleri kullanılarak yapılan *in vitro* metot(*Streptomyces griseus* enzimi tekniği) karşılaştırıldığında 5 yemde (F, BKO, KO, M.SİL ve Y) *in situ* by pass protein değerleri ile 70 saatlik inkübasyon süreli *in vitro* metot sonucu elde edilen BP değerlerinin istatistiksel açıdan benzerlik gösterdiği görülmüştür ($P>0.05$).

24 saatlik inkübasyon süreli *in vitro* metot sonucunda elde edilen bBP değerleri ile *in situ* metot sonucu elde edilen BP değerlerinin sadece 1 yemin benzerlik gösterdiği görülmüştür ($P<0.05$).

1 ve 6 saatlik inkübasyon süreli *in vitro* metot sonucunda elde edilen BP değerleri ile *in situ* metot sonucu elde edilen BP değerleri farklı bulunmuştur ($P<0.05$).

5.2. Öneriler

Çalışma sonucunda iki metot arasında yapılan karşılaştırmada en benzer sonuçların 70 saatlik inkübasyon süreli *in vitro* metotla görülmesinden dolayı gelecekte 70 saat ve 70 saate yakın inkübasyon süreli *in vitro* çalışmanın yapılması ve bu çalışmalar sonucunda en yakın değerlerin bulunabileceği ve ayrıca enzim aktivitesi ve substrakt yoğunluğu konusunun daha detaylı irdelenmesinin faydalı olabileceği düşünülmektedir.

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. Cattlemen's Day. pp: 58-59.
- ABDELGADER, I.E.O., COCHRAN, R.C., TITGEMEYER, E.C. and E.S. VAZANT, E.S., 1997. In vitro Determination of ruminal protein degradability of alfalfa and prairie hay via commercial protease in the presence of absence of cellulase or driselase. J. Anim. Sci.75: 2215-2222.
- ADESOGAN, A.T., 2002. What a feed worth?: A critical evaluation of selected nutritive methods. Proceedings of the Florida Ruminant Symposium, Gainesville, Florida, January, pp: 33-47.
- AOAC, 1984. 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. 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.
- 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 ALBRECHT, K.A., 1997. Ruminal in vitro degradation of protein tannin-free containing forage legume species. Crop. Sci. 37:1884-1891.
- CAN, A., 1998. Methioninehydroxy analog supplementation for growing cattle and omasal sampling escape protein technique. Ph.D. Dissertlahb,. Univ. of Nebraska, Lincoln pp: 55-59
- 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.
- 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 *Streptomyces griseus*. J. Sci. Food. Agric. 72:120-126.
- CRAMPTON, E.W. and MAYNARD, L.A., 1938. The relation of Cellulose and Lignin Content to Nutritive Value of Animal Feeds. J. Nutr. 15: 383-395.
- 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 concentrate ingredients. *J. Anim. Sci. Anim. Physiol*, 52: 227 -234.
- HRISTOV, A. and BRODERICK, G.A., 1994. In vitro determination of ruminal protein degradability using ¹⁵N ammonia to correct for microbial nitrogen uptake. *J. Anim. Sci.* 72: 1344–1354.
- 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>.
- KING, K.J., HUBER, J.T., SADIK, M., BERGEN, W.G., GRANT, A.L. and KING, V.L., 1990. Influence of dietary protein sources on amino acid profiles available for digestion and metabolites in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 73:3208-3210.
- KLOPFENSTEIN, T.J., MASS, R.A. and CREIGHTON, H.H., 2001. Patterson. Estimating forage protein degradation in the rumen. *J. Anim. Sci.* 79(E. suppl.): E208-E217.
- 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., SNIFFEN, C.J., STERN, M.D. and VAN SOEST, P.J., 1983. Evaluation of a mathematical model of rumen digestion and in vitro simulation of rumen proteolysis to estimate rumen undegraded nitrogen content of feedstuffs. *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.
- 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.
- MADSEN, J., and HVELPLUND, T., 1985. Protein degradation in the rumen. *Acta Agric. Scand.* 25: 103 – 124.
- 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.
- MATHIS, C.P., COCHRAN, R.C., VANZANT, E.S., ABDELGADER, I.E.O., HELDT, J.S., OLSON, K.C., JHONSON, D.E., CATON, J., FAULKNER, D., HORN, G., PAAISLEY, S., MASS, R., MOORE, K. and HALGERSON, J., 2001. A collaborative study comparing an in situ protocol with single time-point enzyme assays for estimating ruminal protein degradability of different forages. *Animal Feed Sc. And Technol.* 93: 31-42.
- MATSUBARA, H., and FEDER, J., 1971. Other bacterial, mold and yeast protease. In boyer. P. (Ed.), *The enzymes* 3rd edn. pp: 721-793.
- MEHREZ, A.Z., and ORSKOV, E.R., 1977. A study of artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *J. Agric. Sci. Camb.* 88:645-650.
- MEYER, J.H.F., and MAKIE., R.L., 1986. Microbiological evaluation of intraruminal in sacculus technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 622-629.

- MICHALET-DORUEAU, B., and OULD BAH, M.Y., 1992. In vitro and in sacco methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen: a review. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 40: 57-68.
- NOCEK, J.E., 1987. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: review. *J. Dairy. Sci.* 71:2051-2069.
- NOCEK, J.E., and GRANT, A.L., 1998. Characterization of in situ nitrogen and fiber digestion and bacterial N Contamination of hay crop forages preserved at different dry matter percentage. *J. Anim. Sci.* 64:552-564.
- NRC., 1996. Nutrient requirements of beef cattle 7th ed. National Acedemy Press, Washington, DC.
- 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.
- ORSKOW E.R., HOVELL, F.D., and MOULD, F., 1980. The use of the nylon bag technique for the evaluation of feed stuffs. *Trop Anim Prod* 5: 195-213.
- 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
- PICHARD, G.R., 1977. Forage nutritive value: Continous and batch in vitro rumen fermentation and nitrgen solubility. Ph.D. Dissertation, Cornell University, Ithaca, NY.
- 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.
- TROP, M. and BIRK, Y., 1970. The specificity of proteinases from *Streptomyces griseus*. *Biochem. J.* 116: 19-21.
- SAS, 1988. SAS/STAT Users Guide. SAS Institute Cary, NC, USA
- STERN, M.D., BACH, A., and CALSAMIGLIA, S., 1977. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *J Anim Sci.* 75: 2256-2276.
- VAN KEUREN, R.W. and HEINEMANN, W.W., 1962. Study of a nylon bag technique for in vivo estimation of forage digestibility. *J. Anim. Sc. Technol.* 57: 129-137.
- VAN SOEST, P. J., ROBERTSON, J.B., 1979. Systems of Analyses for Evaluation of Fibrous Feed. In "Proc. Int. Workshop on Standardization of Analytical Methodology for Feeds". Ed, W.J. Pigden, C.C. Balch and M. Graham. Int. Dev. Res. Center, Ottawa, Canada.
- 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

14.04.1983 tarihinde Şanlıurfa' da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Şanlıurfa'da tamamladı. 2000 yılında kazandığı Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi hayvansal üretim pogramından 2004 yılında mezun oldu. 2005 yılında Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2006 yılından bu yana Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesinde Araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.

ÖZET

Bu çalışmada kaba yemlerdeki protein parçalanabilirlikleri in situ metot ve enzimlerle belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan 8 farklı kaba yemin BP değerleri önce naylon kese tekniği ile hesaplanmış. Daha sonrada ticari bir proteaz enzimi olan *Streptomyces griseus* farklı sürelerde kullanılarak hesaplanmıştır.

Naylon kese tekniğinde yemler torbalar içinde rumen kanüllü hayvanlarda 4, 16 ve 96 saat süreyle kalmış ve daha sonra bahsi geçen torbalar içindeki yemlerin analizleri yapılarak BP değerleri hesaplanmıştır.

Enzim tekniğinde ise yemler 1, 6, 24 ve 70 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra Whatman 41 nolu filtre kağıdından süzülerek kalan yemlerin analizler sonucunda BP değerleri hesaplanmıştır.

Kullanılan 8 yemden 5 inde 70 saatlik enzim çalışmasında elde edilen by pass protein değerlerinin in situ metotla belirlenen by pass protein değerleri ile benzer buldukları görülmüştür.

Sonuç olarak BP tayininde kullanılan in situ metot yerine enzim tekniğinin kullanılması yönündeki çalışmalarda enzimlerle 70 saatlik muamele süresi üzerinde yoğunlaşmanın daha iyi sonuçlar vereceği sonucuna varılmıştır.

SUMMARY

In this study, protein degradability of forages was determined with in situ and enzyme methods.

First of all, by pass protein values of eight forages were determined by using in situ procedure. Then, protease from commercial *Streptomyces griseus* was used for determination of by pass values of some forages with different incubation times.

Nylon bags were incubated 4, 16 and 96 h using rumen cannulated rams. Then residual N in the bags was determined to estimate by protein. In enzyme buffer solution then filtrated with using whatman filter paper(41). Residual N in the paper was assumed as a by pass protein.

By pass protein values of five forages out of eight were estimated similar for both in situ and 70 h enzyme incubation methods ($P>0.05$).

According to this study more study should be focused on the 70 h incubation with enzyme method for replacing in situ method.