

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HAYVAN BESLEME VE BESLENME HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**LİYOFİLİZE EDİLMİŞ VE DONDURULMUŞ
DOĞAL LAKTİK ASİT BAKTERİ SIVILARININ,
LAKTİK ASİT BAKTERİ SAYISI VE YONCA
SİLAJİ KALİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Sadık Serkan AYDIN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nihat DENEK**

**ŞANLIURFA
2019**

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HAYVAN BESLEME VE BESLENME HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**LİYOFİLİZE EDİLMİŞ VE DONDURULMUŞ
DOĞAL LAKTİK ASİT BAKTERİ SIVILARININ,
LAKTİK ASİT BAKTERİ SAYISI VE YONCA
SİLAJI KALİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

**Veteriner Hekim
Sadık Serkan AYDIN**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nihat DENEK**

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 18012 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ŞANLIURFA
2019**

T. C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sadık Serkan AYDIN'ın hazırladığı "Liyofilize edilmiş ve Dondurulmuş Doğal Laktik Asit Bakteri Sıvılarının, Laktik Asit Bakteri Sayısı ve Yonca Silajı Kalitesi Üzerine Etkisi" başlıklı çalışması 18/06/2019 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalında *Doktora Tezi* olarak kabul edilmiştir.


BAŞKAN
Prof. Dr. Nihat DENEK
Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Hay. Bes. ve Besl. Hast. Anabilim Dalı Öğretim Üyesi


ÜYE
Prof. Dr. Mehmet AVCI
Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Hay. Bes. ve Besl. Hast. Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi


Prof. Dr. Abdullah CAN
Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi
Zootekni Bölümü Öğretim Üyesi


ÜYE
Prof. Dr. Taylan AKSU
Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Hay. Bes. ve Besl. Hast. Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi


ÜYE
Prof. Dr. Adem KAMALAK
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Öğretim
Üyesi

Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20.06/2019 tarih ve 2019/10/10... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fuat DİLMEC
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hazırlanmasındaki zorlu çalışma sürecinde çok büyük emeği olan, anlayışlı, sabırlı ve destekleyici tutumuyla bana yol gösteren her türlü bilgi ve deneyimini benimle paylaşan Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden danışman hocam; Sayın Prof. Dr. Nihat DENEK'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam sırasında katkısı ve yardımını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Mehmet AVCI'ya, denemelerin yürütülmesinde desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Besime DOĞAN DAŞ, Vet. Hek. Mehmet SAVRUNLU, Laborant Furkan YENİÇERİ ile tüm bu eğitim sürecinde daima destek olan eşim Ayşe Aydan AYDIN ve çocuklarım Ahmet Sırrı, Osman Nuri, Derya Sena ve Mehmet Rauf'a gösterdikleri sabır ve anlayış için teşekkür ederim.

Sadık Serkan AYDIN

2019

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2. 1. Silolama Sırasında Şekillenen Fermentasyon Süreci.....	3
2. 1. 1. Aerobik Faz	3
2. 1. 2. Anaerobik Faz	4
2. 1. 3. Sabit Faz.....	6
2. 2. Silolamada Bitki Enzimlerinin Rolü.....	6
2. 3. Silolamada Mikroorganizmaların Rolü.....	7
2. 4. Silaj Mikrobiyolojisi	8
2. 4. 1. Silaj Fermentasyonunda Yararlı Mikroorganizmalar	9
2. 4. 2. Silaj Fermentasyonda İstenmeyen Mikroorganizmalar.....	12
2. 5. Silaj Katkı Maddeleri	18
2. 5. 1. Laktik Asit Bakteri (LAB) İnokulantları.....	19
2. 5. 2. Fermente Edilmiş Laktik Asit Bakteri Sıvısı	30
2. 6. Laktik Asit Bakterileri Koruma Yöntemleri	31
2. 6. 1. Liyofilizasyon İşlemi ile Laktik Asit Bakterilerinin Korunması	32
2. 6. 2. Dondurma İşlemi ile Laktik Asit Bakterilerinin Korunması.....	35
3. GEREÇ ve YÖNTEM	37
3. 1. Birinci Deneme	37
3. 1. 1. Fermente Edilmiş Laktik Asit Bakteri Sıvısının Hazırlanması.....	37
3. 1. 2. Liyofilizasyon İşlemi	39
3. 1. 3. Dondurma İşlemi.....	42
3. 1. 4. Laktik Asit Bakterisi Sayımı	42
3. 2. İkinci Deneme	43
3. 2. 1. Liyofilize Edilen ve Derin Dondurucuda Dondurulan Fermente Edilmiş LAB Sıvılarının Aktifleştirilmesi.....	43
3. 2. 2. Yonca Silajlarının Hazırlanması ve Muameleler	44

3. 2. 3. Silaj Kompozisyonunun Belirlenmesi	45
3. 3. İstatistiksel Analizler.....	46
4. BULGULAR	47
4. 1. Birinci Denemenin Bulguları	47
4. 2. İkinci Denemenin Bulguları.....	62
4. 2. 1. Bir Ay Süre ile Depolanmış Laktik Asit Bakteri Sıvıları Katılmış Yonca Silajları	62
4. 2. 2. Üç Ay Süre ile Depolanmış Laktik Asit Bakteri Sıvıları Katılmış Yonca Silajları	65
5. TARTIŞMA	68
5. 1. Birinci Deneme	69
5. 2. İkinci Deneme	76
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	86
7. KAYNAKLAR	89
8. EKLER	98
EK.1. Etik Kurul Kararı	98
EK.2. Orjinallik Raporu	99
EK.3. İntihal Raporu	100
EK.4. Tez Veri Giriş Formu.....	101

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Fermente Edilmiş Laktik Asit Bakteri Sıvılarının Fermentasyona Hazırlanması.	38
Şekil 3.2. Fermente Edilmiş Laktik Asit Bakteri Sıvılarının Fermentasyon Öncesi ve Sonrası.....	39
Şekil 3.3. Fermente Edilmiş Laktik Asit Bakteri Sıvılarının Fermentasyon Sonrası Liyofilizasyon Şişelerine Doldurulması.....	40
Şekil 3.4. Fermente Edilmiş Laktik Asit Bakteri Sıvılarının Liyofilize Edilmeleri.	41



TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Homofermentatif ve Heterofermentatif Laktik Asit Bakterileri .	12
Tablo 2.2. Silajda Isınmaya Bağlı Olarak Oluşan KM Kayıpları .	13
Tablo 2.3. Farklı KM Düzeylerine Göre Bazı Yem Bitkilerindeki Doğal Mikroorganizma Sayıları, Log.	24
Tablo 2.4. Mikrobiyal Silaj İnokulantlarında Yaygın Olarak Kullanılan Bakteriler ve Kullanım Amaçları	25
Tablo 4.1. Farklı Seviyelerde Sükroz İlavesi (%3, %5 ve %10) ve Değişik Sürelerde (2, 5 ve 10 Gün) İnkübe Edilerek Trisodyum Sitrat ve Dimetil Sulfoksit Katkılı Olarak Derin Dondurucuda Dondurulmuş ve Liyofilize Edilerek Kurutulmuş LAB Sıvılarının Bir ve Üç Aylık Depolanmalarına İlişkin İnteraksiyon Analizleri (Log ₁₀)	48
Tablo 4.2. Farklı Seviyelerde Sükroz İlavesi (%3, %5 ve %10) ve Değişik Sürelerde (2, 5 ve 10 Gün) İnkübe Edilerek Trisodyum Sitrat ile Dimetil Sulfoksit Katkılı Olarak Derin Dondurucuda Dondurulmuş ve Liyofilize Edilerek Kurutulmuş LAB Bakteri Sıvılarının Bir ve Üç Aylık Depolanmalarına İlişkin İnteraksiyon Kaynakları	49
Tablo 4.3. Farklı Seviyelerde Sükroz İlavesi ile Değişik Sürelerde İnkübe Edilerek Elde Edilen Taze, Katkısız ile TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) Katkılı Olarak Hazırlanarak Derin Dondurucuda Dondurulan ve Liyofilize Edilerek Kurutulan LAB Sıvılarının Bir ve Üç Ay Depolama Öncesi LAB Sayıları (Log ₁₀)	51
Tablo 4.4. Farklı Seviyelerde Sükroz İlavesi ile Değişik Sürelerde İnkübe Edilerek Elde Edilen Taze, Katkısız ile TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) Katkılı Olarak Hazırlanarak Derin Dondurucuda Dondurulan ve Liyofilize Edilerek Kurutulan LAB Sıvılarının Bir ve Üç Ay Depolama Öncesi LAB Sayıları (kob/ml)	52
Tablo 4.5. Farklı Seviyelerde Sükroz İlavesi ile Değişik Sürelerde İnkübe Edilerek Elde Edilen Taze, Katkısız ile TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) Katkılı Olarak Hazırlanarak Derin Dondurucuda Dondurulan ve Liyofilize Edilerek Kurutulan LAB Sıvılarının Bir ve Üç Ay Depolama Öncesi LAB Canlılık Oranları, %	53
Tablo 4.6. Liyofilizasyon İşlemi ile Kurutularak Elde Edilmiş LAB Sıvılarının Nem İçerikleri, %	54
Tablo 4.7. Farklı Seviyelerde Sükroz İlave Edilerek Farklı Sürelerde İnkübe Edilmiş LAB Sıvılarının Dondurularak ve Liyofilize Edilerek Bir Ay Süre ile Depolanması Sonucunda LAB Değerleri (Log ₁₀)	55

Tablo 4.8. Farklı Seviyelerde Sükroz İlave Edilerek Farklı Sürelerde İnkübe Edilmiş LAB Sıvılarının Dondurularak ve Liyofilize Edilerek Bir Ay Süre ile Depolanması Sonucunda LAB Değerleri (kob/ml).....	56
Tablo 4.9. Farklı Seviyelerde Sükroz İlave Edilerek Farklı Sürelerde İnkübe Edilmiş LAB Sıvılarının Dondurularak ve Liyofilize Edilerek Bir Ay Süre ile Depolanması Sonucunda LAB Canlılık Oranları, %	56
Tablo 4.10. Farklı Seviyelerde Sükroz İlave Edilerek Farklı Sürelerde İnkübe Edilmiş LAB Sıvılarının Dondurularak ve Liyofilize Edilerek Üç Ay Süre ile Depolanması Sonucunda LAB Değerleri (Log ₁₀).	59
Tablo 4.11. Farklı Seviyelerde Sükroz İlave Edilerek Farklı Sürelerde İnkübe Edilmiş LAB Sıvılarının Dondurularak ve Liyofilize Edilerek Üç Ay Süre ile Depolanması Sonucunda LAB Değerleri (kob/ml).....	60
Tablo 4.12. Farklı Seviyelerde Sükroz İlave Edilerek Farklı Sürelerde İnkübe Edilmiş LAB Sıvılarının Dondurularak ve Liyofilize Edilerek Üç Ay Süre ile Depolanması Sonucunda LAB Canlılık Oranları, %	61
Tablo 4.13. Bir Aylık Depolama Süresi Sonunda En Yüksek LAB Değerlerine Sahip LAB Sıvılarının Yonca Silajının Ham Besin Madde Değerleri Üzerine Etkisi.....	63
Tablo 4.14. Bir Aylık Depolama Süresi Sonunda En Yüksek LAB Değerlerine Sahip LAB Sıvılarının Yonca Silajının Fermentasyon Kalitesi Üzerine Etkisi.....	64
Tablo 4.15. Üç Aylık Depolama Süresi Sonunda En Yüksek LAB Değerlerine Sahip LAB Sıvılarının Yonca Silajının Ham Besin Madde Değerleri Üzerine Etkisi.....	65
Tablo 4.16. Üç Aylık Depolama Süresi Sonunda En Yüksek LAB Değerlerine Sahip LAB Sıvılarının Yonca Silajının Fermentasyon Kalitesi Üzerine Etkisi.....	66

KISALTMALAR

KM	: Kuru Madde, %.
HK	: Ham Kül, %.
HP	: Ham Protein, %.
SÇK	: Suda Çözünebilir Karbonhidrat, gr/kg KM.
TRİS (Ts)	: Trisodyum Sitrat, gr/kg KM.
DMSO (Ds)	: Dimetil Sülfoksit, gr/kg KM.
LA	: Laktik Asit, gr/kg KM.
PA	: Propiyonik Asit, gr/kg KM.
AA	: Asetik Asit, gr/kg KM.
BA	: Bütirik Asit, gr/kg KM.
ADF	: Asit Deterjan Lif, %.
NDF	: Nötr Deterjan Lif, %.
NH₃-N	: Amonyak Azotu.
MRD	: Maximum Recovery Diluent (Seyreltici Solüsyon).
HCl	: Hidroklorik Asit.
NH₃-N/TN	: Toplam Azot (TN) İçeriğindeki Amonyak Azotu, %.
kob/gr	: Gramda Koloni Oluşturan Birim.
kob/ml	: Mililitrede Koloni Oluşturan Birim.
2G%5STsL	: %5 sükroz ilavesi ile 2 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı liyofilize LAB sıvısı.
2G%10SDsL	: %10 sükroz ilavesi ile 2 gün inkübasyon sonrasında DMSO (Ds) katkılı liyofilize LAB sıvısı.
5G%10SDsL	: %10 sükroz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında DMSO (Ds) katkılı liyofilize LAB sıvısı.
5G%5STsDD	: %5 sükroz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı derin dondurucuda dondurulan LAB sıvısı.
2G%5SDsL	: %5 sükroz ilavesi ile 2 gün inkübasyon sonrasında DMSO (Ds) katkılı liyofilize LAB sıvısı.
5G%5STsL	: %5 sükroz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı liyofilize LAB sıvısı.
5G%10STsL	: %10 sükroz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı liyofilize LAB sıvısı.
5G%10STsDD	: %10 sükroz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı derin dondurucuda dondurulan LAB sıvısı.

ÖZET

Liyofilize Edilmiş ve Dondurulmuş Doğal Laktik Asit Bakteri Sıvılarının, Laktik Asit Bakteri Sayısı ve Yonca Silajı Kalitesi Üzerine Etkisi

Sadık Serkan AYDIN

Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı,

Doktora Tezi

Bu tez çalışmasında, farklı şekillerde hazırlanarak bir ve üç ay süre ile depolanan fermente edilmiş laktik asit bakteri (LAB) sıvılarındaki LAB sayılarının belirlenmesi ve en yüksek canlılık oranına sahip grupların yonca bitkisinden hazırlanan silajlarda silaj kalitesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın birinci denemesinde, farklı seviyelerde süzkroz (%3, %5 ve %10) ilavesi ve farklı sürelerde (2, 5 ve 10 gün) inkübasyona bırakılarak hazırlanan fermente edilmiş LAB sıvıları kryoprotektan (trisodyum sitrat ve dimetil sülfoksit) ilavesi ile dondurularak ve liyofilizasyon işlemi ile kurutularak bir ve üç ay süreyle depolanmıştır. Bu çalışmanın birinci denemesinde elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde; süzkroz seviyesi ile inkübasyon ve depolama süresinin uzamasına bağlı olarak LAB'nin canlılık oranlarında azalmaların görüldüğü, kryoprotektan katkısının LAB'nin korunmasında olumlu etki yaptığı, liyofilizasyon işleminin ise derin dondurucuda dondurulma işlemine göre avantajlı olduğu söylenebilir.

Çalışmanın ikinci denemesinde, bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek canlılık oranına sahip grupların (2G%5STsL, 2G%10SDsL, 5G%10SDsL ve 5G%5STsDD) ilave edildikleri yonca silajlarında CO₂ değerleri kontrol grubundan elde edilen değerden düşük bulunmuştur (P<0.01). En yüksek laktik asit içeriği 2G%5STsL, asetik asit içeriği ise 5G%5STsDD grubunda belirlenmiş, en düşük pH, NH₃-N/TN ve bütirik asit değerleri ise 2G%5STsL ve 2G%10SDsL gruplarında belirlenmiştir (P<0.01). Üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek canlılık oranına sahip grupların (2G%5SDsL, 5G%5STsL, 5G%10STsL ve 5G%10STsDD) ilave edildikleri yonca silajlarında kontrol grubu ile kıyaslandığında en yüksek laktik asit, en düşük pH, NH₃-N/TN ve bütirik asit değerleri 2G%5SDsL, 5G%5STsL ve 5G%10STsL gruplarında belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada kryoprotektan ilavesiyle liyofilize edilerek kurutulan LAB sınıflarında belirlenen yüksek canlılık oranları dikkate alındığında bu ürünlerin silaj katkısı olarak kullanılabilme ve ticarileştirme potansiyelinin olduğu görülmektedir. Ancak uygulamanın pratiğe aktarılabilmesi için liyofilize edilerek hazırlanan LAB sınıflarının ticari LAB inokulantları ile karşılaştırmalı olarak büyük silolarda ve değişik silaj materyalleri ile hazırlanacak silajlarda etkilerinin araştırılmasının gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterisi, dondurulma, liyofilizasyon, silaj, yonca.



ABSTRACT

The Effect of Lyophilized and Frozen Natural Lactic Acid Bacteria Juice on the Count of Lactic Acid Bacteria and Quality of Alfalfa Silage

Sadık Serkan AYDIN

Animal Nutrition and Nutritional Diseases Department

Ph. D. Thesis

In this study, it is aimed to determine the number of lactic acid bacteria (LAB) in fermented LAB juice, which were prepared by different methods and stored for one and three months, and to research the effect of groups with the highest vitality ratio on the quality of silages that were prepared from alfalfa (*Medicago sativa*). In the first experiment of this study, fermented LAB juices were prepared by adding of different levels sucrose (3%, 5%, and 10%) and incubated for different periods (2, 5, and 10 days), were frozen and dried through lyophilization by adding cryoprotectant (trisodium citrate and dimethyl sulphoxide) then stored for one and three months. When the results achieved from the first experiment of this study are evaluated, it can be claimed that the ratio of vitality of LAB is decreased, based on extension of incubation and storage period and sucrose level, the addition of cryoprotectant has a positive effect on preservation of LAB and lyophilization is more advantageous, compared to freezing in a deep-freeze. In the second experiment of this study, CO₂ values of alfalfa silages in which the groups with the highest vitality rate added at the end of one month storage period (2G%5STsL, 2G%10SDsL, 5G%10SDsL and 5G%5STsDD) were found lower than control group (P<0.01). The highest lactic acid content was found in group 2G%5STsL and the highest acetic acid content was found in group 5G%5STsDD whereas the lowest pH, NH₃-N/TN and butyric acid values were found in groups 2G%5STsL and 2G%10SDsL (P<0.01). The groups with the highest vitality rate of at the end of three months storage period (2G%5SDsL, 5G%5STsL, 5G%10STsL and 5G%10STsDD) were added to alfalfa silages. Compared with the control group, the highest lactic acid, the lowest pH, NH₃-N/TN and butyric acid values were found in 2G%5SDsL, 5G%5STsL and 5G%10STsL groups.

As a result, the viability of LAB liquids lyophilized by the addition of cryoprotectants was found to be high and it is seen that these products can be used as

silage additive and have commercialization potential. However it was also concluded that the effects of LAB juice, which are prepared with lyophilization, which will be prepared in big silos and by using different silage materials, must be researched by comparing them with commercial LAB inoculants in order to use of practice.

Keywords: Lactic acid bacteria, freezing, lyophilization, silage, alfalfa.



1. GİRİŞ

Ruminantların beslenmesinde yoğun olarak kullanılan kaba yemlerin ekonomik olarak elde edilmesi hayvansal üretimin devamlılığı açısından önemli olup kaliteli kaba yem açığı birim hayvan başına alınan verimin düşük olmasının en önemli sebeplerinden birisi olarak kabul edilebilir. Türkiye’de büyük ve küçükbaş hayvanların temel kaba yem kaynaklarını; doğal meralar, tarla bitkileri, üretim artıkları ve tarlada yetiştiriciliği yapılan fiğ, yonca ve korunga gibi kültür kaba yem bitkileri oluşturmaktadır. Bunun yanında silajlık bitki yetiştirilmesi ve silaj yapımı, Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından yapılan desteğin etkisiyle yaygınlaşmaktadır. Büyük ve küçükbaş hayvancılık işletmelerinin bol, ucuz ve kaliteli kaba yem ihtiyacının kısa sürede ve yeterli miktarda karşılanmasında, silo yemleri önemli bir seçenek olarak ortaya çıkmaktadır (1). Bilinçli hayvancılık uygulamaları yapan işletmelerde silaj yapılması ve kullanımı, hayvanların rasyonel beslenmesinde ve verimin artırılmasında önemli bir yere sahiptir. Silaj yapımında; silajlık bitki seçimi ve eğer kullanılacak ise, katkı maddelerinin özelliklerinin ve işlevlerinin iyi bilinmesi gerekmektedir.

Silaj kalitesini arttırmak amacıyla son zamanlarda mikrobiyel inokulant adı verilen canlı bakteri kültürlerinden yararlanılmaktadır. Bu amaçla ticari olarak üretilen mikrobiyel inokulant preparatları, büyük çoğunlukta laktik asit bakterileri (LAB) içermektedirler. Laktik asit bakterileri; siloda anaerobik koşulların oluşması sonucunda, ortamdaki substrat için rekabet edecek olan aerobik bakterilerin, mayaların ve mantarların gelişimini minimum düzeye indirerek fermentasyonu olumlu yönde geliştirirler. Laktik asit bakterileri silo içerisinde pH’yı düşürerek bitki proteaz enzimlerini inaktive eder ve silajlık bitki proteinlerinin yıkılmasını azaltır, bunun yanı sıra aerobik silaj fermentasyonunda istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini de engeller (2). Siloda istenen anaerobik koşulların oluşması, silolanan materyalin uygun kuru madde (KM) içeriğine sahip olması, uygun boyutta parçalanması, silonun hızla doldurulması, yeterince sıkıştırılması, hızlı ve hava almayacak şekilde kapatılmasıyla sağlanabilir. Silo içerisinde anaerobik koşulların oluşmasıyla, silolanan ürünün doğal mikroflorasında mevcut olan LAB, suda çözünebilir karbonhidratları (SÇK) çoğunlukla laktik asit olmak üzere çeşitli organik asitlere fermente ederler. Laktik asit bakterilerinin

fermentasyon ürünü olan bu asitler silo içerisinde hidrojen iyonu düzeyini, silo içerisinde faaliyetleri istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini inhibe edecek bir seviyeye çıkarır. Sonuç olarak silo içerisinde laktik asit üretiminin artması ve buna bağlı olarak da pH değerinin düşmesi, silo içerisinde geriye kalan bütün mikroorganizmaların gelişimini engeller (3).

Bu çalışma kapsamında birinci denemesinde, farklı seviyelerde sükröz (%3, %5 ve %10) ilavesi ve farklı sürelerde (2, 5 ve 10 gün) inkübasyonla hazırlanmış fermente edilmiş LAB sıvılarına %50'lik çözeltiden %20 (v/v) oranında trisodyum sitrat (TRİS (Ts)) ve %0.1 (v/v) oranında dimetil sülfoksit (DMSO (Ds)) ilave edilerek derin dondurucuda (-21 °C) dondurularak ve liyofilizasyon işlemi ile kurutulularak bir ve üç ay süre ile depolanması sonucunda elde edilen LAB sıvılarının LAB sayıları belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci denemesinde ise, birinci denemeden elde edilen veriler ışığında bir ve üç ay süre ile dondurulmuş ve liyofilize edilmiş LAB sıvılarından her bir depolama (bir ve üç ay) süresi için en yüksek LAB sayılarına sahip olan dört grup, yonca (*Medicago sativa*) bitkisinden hazırlanan silajlara ilave edilerek yonca silajı kalitesi üzerine etkileri belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında, farklı şekillerde hazırlanarak bir ve üç ay süre ile depolanmış fermente edilmiş LAB sıvılarının LAB sayılarının belirlenmesi ve yonca bitkisinden hazırlanan silajlarda silaj kalitesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Silolama Sırasında Şekillenen Fermentasyon Süreci

Silaj yapımı, su içeriği yüksek yeşil yemlerin korunması amacıyla tüm dünyada yaygın olarak kullanılan bir konservasyon yöntemidir. Silaj yapımının esası, suda çözünebilir karbonhidratların (SÇK) anaerobik koşullar altında LAB aracılığıyla başta laktik asit olmak üzere organik asitlere fermente olduğu doğal fermentasyon temeline dayanmaktadır. Silaj yapımı sürecinde silo içerisinde pH değeri düşer, zararlı mikroorganizmaların etkileri engellenir. Böylece su içeriği yüksek yeşil yemler konserve edilmiş olurlar.

İdeal bir silolama yönetimi, temel olarak silo içerisindeki aerobik aktiviteyi en aza indirerek silaj materyalindeki KM kayıpları azaltılarak sağlanabilir. Silaj kalitesi; silajlık bitkinin türü, parçalama boyutu, silonun tipi, silonun doldurulma süresi, kapama tekniği, hasat sırasındaki hava şartları, personelin eğitimi, katkı kullanımı ile silonun kapatılma süresi gibi birtakım biyolojik ve teknik özelliklere bağlı olarak değişebilmektedir (4,5). Silaj yapım sürecinde ortaya çıkabilecek kötü fermentasyonun nedeni, silaj yapımı sırasında yapılan hatalardan kaynaklanmaktadır. Silaj hazırlanması sürecinde yapılan hataların başında silajlık bitki seçimi, bitkinin KM içeriğinin düşük olması, biçim zamanı, silonun kapatılması ve hayvanlara yedirilme sürecindeki yönetim hataları gelmektedir. Herhangi bir bitkisel materyalden kaliteli bir silaj elde edebilmek için, silajlık materyalin silolanmasından itibaren silo içerisinde meydana gelen olayların çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Silaj fermentasyon akışını; aerobik faz, anaerobik faz ve sabit faz olarak sıralamak mümkündür.

2. 1. 1. Aerobik Faz

Silaj yapılacak olan bitkisel materyalin parçalanıp siloya doldurulmasından sonra uygulanan sıkıştırma işlemi ne kadar iyi yapılsa da silo içerisinde bir miktar hava ya da oksijen kalacaktır. Silo içerisinde aerobik sürecin uzun sürmesi anaerobiozisin oluşumuna engel olacağından, silo içerisinde istenmeyen tipte fermentasyon şekillenebilir. Bu olay silolanan materyalde hiç arzulanmayan solunum ve proteolizis

aktivitesinin görülmesine sebep olur. Bu dönemde silo içerisinde kalan oksijen ve silolanan bitkinin yüksek pH değeri; silolan yemin yapısında bulunan enzimlerin aktive olmalarına, proteolitik aktiviteye, ayrıca aerobik mikroorganizmaların, maya, küf ve *Enterobacterler* gibi fakültatif aerobik mikroorganizmaların çoğalmalarına neden olur (6,7). Solunum olayı sırasında silo içerisinde ve bitki bünyesinde bulunan oksijen kullanılarak, bitkinin yapısında bulunan SÇK'lar parçalanmaya başlar, bunun sonucu olarak silo içerisinde karbondioksit ve su açığa çıkarak sıcaklık artmaya başlar (8). Bitki bünyesinde bulunan SÇK'ların kaybı ve silo içerisinde sıcaklığın aşırı düzeyde yükselmesinin (42-44 °C) sonucu olarak; silajın protein, selüloz ve diğer besin madde sindirilebilirlikleri önemli düzeyde azalır (6). Bu dönemde silo içerisinde meydana gelen proteolizis olayı sırasında bitki bünyesinde bulunan proteaz enzimleri bitkinin yapısında bulunan proteinleri, başta aminoasitler ve amonyak olmak üzere, peptid ve amidlere parçalar (9). Aerobik dönemde görülen kayıplar; silajlık materyalin siloya kısa sürede doldurularak silonun iyice sıkıştırılıp, hava almayacak şekilde kapatılmasıyla azaltılabilir.

2. 1. 2. Anaerobik Faz

Aerobik dönemde silo içerisinde oksijenin tüketilmesi ile anaerobik heterofermantatif dönem başlar. Erken anaerobik dönemdeki mikrobiyel aktivitenin başında fakültatif anaerobik bakteri grubundan olan *Enterobacterler* faaliyet gösterirler. *Enterobacterler* aerobik dönemde silodaki sıcaklık artışına karşı toleranslıdır. *Enterobacterlerin* öncelikli fermentasyon ürünleri; asetik asit, etanol ve karbondioksit olup LAB fermentasyonuna kıyasla silo içerisinde daha fazla KM ve enerji kaybına neden olurlar (10,11). *Enterobacterler* düşük pH değerlerine karşı hassas olup, silodaki gelişimleri pH seviyesinin 5.0 altına düşmesi ile engellenir. Silo içerisindeki pH değerinin 5.0'in altına düşmesi silolama işleminin 24-72 saatlerinde gerçekleşir ve bu durum siloda erken anaerobik fazın sona erdiğini gösterir (12). *Enterobacterler* silaj pH değerini 5.0'in altına indirerek homofermantatif LAB için ortam hazırlarlar. Laktik asit bakterileri *Enterobacterlere* karşı baskın yapıda olup, anaerobik fazın ilk 24 saatinin sonunda fermentasyonu tam olarak başlatabilirler. Bu süreçte her gram silajdaki LAB sayısı 10^8 - 10^9 değerine ulaşabilir. Hızlı üreyebilme yeteneklerinden dolayı LAB'nin fermentasyon başlangıcındaki besin madde ihtiyaçları son derece yüksektir.

Fermentasyon başlangıcında laktik asitin oluşum hızı, LAB'nin üreme ve çoğalma hızından daha azdır. Ancak anaerobik fazın başlamasından birkaç gün sonra silo içerisindeki laktik asit üretimi en yüksek düzeye ulaşmaktadır. Laktik asit bakteri türlerinin, değişik karbonhidratları farklı düzeylerde yıkımladıkları bilinmektedir. Karbonhidrat türünün molekül ağırlığı ne kadar yüksek olursa, fermentasyona uğratılma yani yıkımlanma düzeyi de aynı ölçüde düşük olmaktadır. Laktik asit bakterileri nişasta, selüloz, dekstrin ve pentozanlar gibi karbonhidratları tam olarak yıkımlayamazlar. Laktik asit, LAB tarafından salgılanan laktosidaz enzimi yardımıyla silajlık bitki bünyesinde bulunan SÇK'ların, özellikle monosakaritlerin parçalanması ile oluşur. Sakkaroz ve polisakkaritler gibi daha kompleks yapıları karbonhidratların parçalanması monosakkaritlere göre daha zor olur ve bu parçalanma sürecinde mikrobiyel ve bitkisel enzimler önemli rol oynar (13). Silo içerisinde LAB'nin hızla çoğalması ile laktik asit değerinde artış sağlanırken, pH değerinde ve asetik asit oluşumunda ise azalma şekillenir (1). Böylece silo içerisinde SÇK ve proteinlerin yıkımlanmaları azaltılarak, besin madde kayıpları azaltılmış olur (12). Silo içerisinde fermentasyonun sona ermesinde iki önemli faktör etkilidir. Bunlardan ilki ortamda fermente olabilecek besin maddelerinin kalmayışı, diğeri ise ortam pH'sının mikroorganizmaların aktif olamayacağı değerlere ulaşmış olmasıdır (8). Silo içerisindeki laktik asit oluşumu iki haftadan fazla devam eder ve bu süreçte silo içerisinde ısı giderek azalır. Silo içerisindeki bakteriyel faaliyet, pH değerinin 4'ün altına düştüğü dönemde ise tamamen durur (1). *Enterobacterler* gibi *Clostridial* bakteriler de düşük pH değerlerine karşı hassas olup, bu tür bakterilerin gelişimleri KM içeriği düşük silajlarda daha belirgindir. *Clostridia* grubu bakteriler nem oranı %65'ten daha az olan ürünlerle yapılan silajlarda, SÇK içeriğine bağlı olarak pH değerinin hızla 4.6-4.8'e düşmesinden dolayı nadiren bulunabilirler (8). Fermentasyon döneminin başlarında görülen silo suyu çıkışı silolama sürecinde istenmeyen bir unsur olup, silajda besin madde kaybına yol açar. Silolanacak materyalin KM değeri %30'un altına düşmez ise silo suyu çıkışı genellikle herhangi bir sorun yaratmaz. Ancak silajlık materyalin KM değeri azaldıkça, silo suyu çıkışı artmakta ve elde edilen silajın besinsel değeri azalmaktadır (6).

2. 1. 3. Sabit Faz

Anaerobik fermentasyondan sonra şekillenen bu dönem silo açılmadığı müddetçe devam eder. Bu dönemde ideal bir silaj fermentasyonu şekillenmiş ise silajın pH değeri sabit kalır. Sabit faz döneminde silo içerisindeki ortam ısısı ortalama 28 °C'dir. Silo uygun biçimde kapatılmış ve pH 4.0-4.2 değerine ulaşmış ise bu dönemde silo içerisinde çok az aktivite oluşur. Ancak hemiselüloz, selüloz ve lignin komponentlerinin oldukça yavaş gelişen kimyasal yıkımlanmaları sonucu bazı karbonhidratlar serbest kalabilir. Silajlık materyalde SÇK'ların yeterli düzeyde olmadığı veya yokluğu durumlarında, fermentasyon hızı yavaşlar veya durabilir (8). Suda çözünebilir karbonhidrat yetersizliğinden dolayı aktif fermentasyon durduğunda, LAB'leri hemiselülozun parçalanması sonucu serbest kalan şekerleri fermente ederek pH değerini kısmi olarak düşürebilir. Sabit faz döneminde silaj kalitesini etkileyen diğer bir faktör de silo içerisine hava girişidir. Siloya hava girmesi ile silajda maya ve küf popülasyonunun artmasına bağlı mikotoksin üremesi şekillenmekte, bu durum silaj kalitesini olumsuz etkileyebilmekte ve bu tip silajları tüketen hayvanlarda sağlık problemlerine sebep olabilmektedir. Ayrıca silo içerisine giren oksijenin aerobik mikroorganizmalar tarafından kullanılması ile oluşan fermentasyon ürünlerinden başta laktik asit ve asetik asitin, karbon kaynağı olarak kullanılmasıyla siloda karbondioksit, su ve ısı artışı şekillenerek silajın KM ve besin madde kayıpları ortaya çıkmaktadır (8). Her gram silaj materyalinde aerobik bakteri sayısı 10^7 - 10^8 , küf popülasyonu ise 10^6 - 10^7 değerlerine ulaştığında SÇK'lar ve fermentasyon ürünleri hızla azalmaya başlar ve buna bağlı olarak silajın ısısı yükselir (8). *Listeria monocytogenes* türü patojenler düşük düzeyde oksijen girişine maruz kalan silolarda sorun yaratmazken, KM içeriği oldukça düşük olan silajlarda ve yüksek miktarlarda hava girişine maruz kalan silolarda büyük risk oluştururlar.

2. 2. Silolamada Bitki Enzimlerinin Rolü

Silajı yapılacak bitkisel materyal siloya doldurulduktan sonra bitki hücreleri ortamdaki oksijen tüketilene kadar solunumlarına devam ederler. Solunum için kullanılan başlıca substrat SÇK olup, sonuçta karbondioksit, su ve ısı meydana gelir (3). Bitki solunumu siloda kalan oksijenin tüketilmesi ve siloda anaerobik koşulların

oluşturulması bakımından gerekli bir durumdur. Ancak yoğun bir solunumun meydana gelmesi, silolanan materyalin SÇK içeriğinin azalmasına neden olarak silaj fermentasyonunun olumsuz etkilenmesine yol açabileceğinden, silo içerisinde istenen bir durum değildir. Bitki hücrelerinin solunumu, siloda anaerobik koşullar oluşunca birkaç saat içinde sonlanır (2). Bitki hücreleri tarafından proteaz ve hemiselüloz gibi birçok enzim salgılanır. Bitki proteolizinin ürünleri aminoasitler ve değişik zincir uzunluğundaki peptitler olup, bitki proteolizi pH'nın uygun seviyeye düşmesine kadar devam eder (3). Proteolitik aktivitenin büyük kısmı silolamanın ilk 48 saatinde meydana gelir. Bu nedenle asit ya da kimyasal silaj katkı maddeleri kullanılmadan bu dönemde şekillenen proteolizin kontrolü oldukça zordur. Bitki yapısında bulunan enzimler, nişasta ve hemiselülozun monosakkaritlere yıkılmasına yardımcı olurlar. Bu hidroliz olayı silo içerisinde daha sonra şekillenecek laktik asit fermentasyonu için ilave şeker kaynağı sağlamış olur (12). Proteolize benzer şekilde, hemiselülozik aktivite de silolamanın ilk haftasında hızla azalır, ancak hemiselülozik aktivite ortam pH'sına proteolizden daha az duyarlıdır (2).

2. 3. Silolamada Mikroorganizmaların Rolü

Silaj fermentasyonunda silo içerisinde aktivite gösteren mikroorganizmaların gelişimleri; duraklama safhası (latent dönem), hızlanma ve logaritmik artış dönemi, yavaşlama ve sabit dönem ile ölüm veya azalma dönemleri olarak başlıca dört dönemde şekillenir (14). Duraklama safhası (Latent Dönem) dönemde; mikroorganizmalar farklı ve yeni bir ortamla karşılaştıklarından, ilk olarak girmiş oldukları ortama adapte olurlar. Bu süreçte mikroorganizmalar yeni ortamlarında bulunan besinlerden yararlanmak için ihtiyaç duydukları enzimleri üretirler. Mikroorganizmalar yeni ortamlarındaki besin maddelerini etkili bir şekilde kullanmaya başladıktan sonra çoğalırlar. Bu dönemin süresi, bakteri süşunun gelişmesi için gerekli olan besin maddelerinin bulunmasına, mikroorganizmaların fizyolojik durumuna ve kültür koşullarına bağlıdır. Hızlanma ve logaritmik artış döneminde; mikroorganizma hücrelerinin düzenli bir şekilde bölündüğü, bakteri sayısının logaritmik çoğalmasının şekillendiği dönemdir. Bu dönemde hücrelerin aktiviteleri maksimum düzeydedir. Logaritmik çoğalma döneminin sonunda bakteriler başlangıçtaki kadar hızlı bölünemez ve çoğalamazlar. Ancak silo içerisindeki toplam bakteri sayısı çok fazla olduğundan, bölünme sonucu artan hücre

sayısı da fazla olmaktadır. Yavaşlama ve sabit dönemde; mikroorganizmaların ihtiyacı olan besin maddeleri azalmış veya mikroorganizmalar için toksik olan maddelerin miktarı (laktik asit, asetaldehit, peroksit vb.) artmaya başlamış ve ortamın pH değeri düşmeye başlamıştır. Sabit dönemde laktik asit gibi metabolik ürünler siloda hakim olduğundan mikroorganizma sayısında stabilite görülür. Yani ortamda hücre ölümü ile hücre çoğalması arasında bir denge oluşur. Ölüm veya azalma döneminde ise; canlı mikroorganizmaların sayısı azalmaya başlar, ölen mikroorganizmaların sayısı, yeni meydana gelen mikroorganizma sayısından daha fazla olur.

2. 4. Silaj Mikrobiyolojisi

Bütün bitkiler gibi yem bitkilerinin de doğal florasında çeşitli mikroorganizmalar bulunmaktadır. Bitkilerin sahip olduğu doğal mikroorganizmaların sayı ve çeşitleri; çevre şartlarına, bölgeye, mevsime, kirlenme derecesine, bitki türüne, bitkinin varyetesine, bitkinin KM içeriğine göre değişiklik gösterdiği bildirilmektedir (13). Siloya doldurulan silajlık bitkiler ile birlikte, silo içerisine bitkiye doğal olarak yapışmış halde bulunan mikroorganizmalar da alınmış olur.

Silajlık bitkilerin üzerinde LAB'nin yanı sıra silo ortamında istenmeyen mikroorganizmalar da mevcuttur. Silolamanın ilk zamanlarında; silo ortamında istenmeyen fermentasyon ürünlerini meydana getiren zararlı mikroorganizmaların sayısı, LAB'ne göre daha yüksek olmakta, ancak silolamanın ilerleyen zamanlarında istenmeyen mikroorganizma sayıları gittikçe azalarak ortama LAB hâkim olurlar (15). Değişik silaj materyalleri ile yapılan çalışmalarda silo içerisinde LAB sayısının, silaj materyalinin siloya doldurulmasından hemen sonra hızla arttığı ve 48 saat sonunda siloya doldurulma anındaki sayılarının bir milyon katına ulaştıkları kaydedilmiştir (16).

Silajlık bitkinin yapısında bulunan mikroorganizmalar farklı gruplara ayrılırlar. Her bir mikroorganizma grubunun üremesi için en uygun pH değeri ve fermente edebildiği besin madde grubu farklıdır. Silaj fermentasyonunda etki gösteren mikroorganizmalar temelde yararlı ve zararlı mikroorganizmalar olarak ikiye ayrılır.

2. 4. 1. Silaj Fermentasyonunda Yararlı Mikroorganizmalar

Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri; gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, çubuk veya kok şeklinde, asit ortama dayanıklı, karbonhidratları ve alkolleri fermente ederek laktik asit oluşturan doğal bir grup olarak tanımlanmakta ve *firmitutes* filumuna ait çeşitli bakteri cinslerinden meydana gelmektedirler (17). Spor oluşturmayan ve katalaz negatif olan bu grubun önemli cinsleri arasında *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerrococcus*, *Vagococcus* ve *Weisella* yer almaktadır. Bunların yanısıra *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* cinsi üyeleri süt ürünlerinin fermentasyonunda starter kültür olarak kullanılabilirlerdir. Bütün LAB anaerobik koşullar altında gelişim gösterebilmekle birlikte, pek çok anaerobik bakterinin tersine oksijene karşı duyarlı değildirler, yani oksijen varlığında da gelişim gösterebilmektedirler. Laktik asit bakterilerinin oksijen ihtiyaçları fazla olmayıp, çok az oksijen bulunan (mikroaerofil) veya hiç oksijen bulunmayan (anaerob) ortamlarda faaliyet gösterirler. Bu yapılarından dolayı aerotolerant anaerob mikroorganizmalar olarak da isimlendirilirler (10).

Laktik asit bakterileri organik asit, diasetil, aseton, hidrojen peroksit, reuterin, antifungal peptitler ve bakteriyosinler gibi çok çeşitli antimikrobiyel bileşikler üretebilme kapasitesine sahip olmalarından dolayı, özellikle son 15 yıldır gıda koruyucusu olarak kullanımları ilgi odağı olmuştur. Laktik asit bakterilerinin pek çok üyesinin bakteriyosin ürettiği bilinmekte olup, *Lactobacillus acidophilus* tarafından üretilen acidophilin ve lactocidin, *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen lactolin ya da *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisin gibi antibiyotik ve antibiyotik benzeri maddeler antibakteriyel etki göstermektedir. Laktik asit bakterileri ürettikleri bakteriyosinler aracılığıyla, bakteriyosinin türüne bağlı olarak özellikle *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* gibi gıda kökenli patojen bakterileri inhibe edebilmektedirler. Bununla birlikte bakteriyosinlerin bazı gram negatif bakteriler üzerinde de etkili olduğu bildirilmiştir (18).

Laktik asit bakterileri optimum +30 °C ısıda ve 4.0-4.5 pH değerlerinde gelişerek aktivite gösterirler. Laktik asit bakteri türlerinin yaşayabilmeleri ve

çoğalabilmeleri için ihtiyaç duydukları pH ve asidite düzeyleri arasında büyük farklar bulunmaktadır. Yaşayabildikleri en düşük pH değeri 3.0-3.6 aralığı olup, ancak bu pH değerlerinin çok altında bile kuvvetli asit oluşturma özelliği gösteren türlerinin varlığının yanı sıra, pH 4.5 üzerinde faaliyet gösteremeyen *Lactobacillus brevis* gibi türlerinin mevcut olduğu bilinmektedir. Laktik asit bakterilerinin ortam sıcaklığına bağlı olarak aktiviteleri değişmekle birlikte, genel olarak 20-40 °C sıcaklık aralığında en yüksek aktivite göstermektedirler (13). Silaj fermentasyon sürecinde laktik asit üretimi üzerine silo içi pH değerinin önemi büyüktür. Silajda pH değerinin istenen seviyeye inmesi halinde uçucu yağ asitleri ile laktik asit miktarının arttığı bildirilmektedir. Örneğin pH 7.0 değerinde karbonhidratların %73'ü laktik asite dönüştüğü halde, pH 5.0 değerinde ise bu oranın %87'ye çıktığı bildirilmektedir (13). Laktik asit bakterileri silo içerisinde hemen hemen hiçbir besin madde kaybına yol açmadıklarından, silajda arzu edilen fermentasyonu sağlayan mikroorganizmalardır. Bu sebeple LAB'nin üremelerini kolaylaştıracak anaerobik şartların sağlandığı, SÇK'larca zengin ve uygun ısıya sahip ortam varlığı gerekli olup, bu şartların oluşması durumunda LAB optimum üreme ve gelişme gösterirler (9). Çoğu LAB, yalnızca karbonhidrat ve fermente edilebilir bileşiklerin metabolizmasından enerji sağladıkları için SÇK'ların bol bulunduğu ortamlarda çok iyi gelişebilmektedirler. Laktik asit bakterilerinin biyosentez yetenekleri sınırlı olduğundan, aminoasitler, vitaminler (örneğin B vitamini), purinler ve pirimidinlerin bulunduğu kompleks besinlere ihtiyaç duyarlar (19).

Genel olarak LAB oluşturdukları fermentasyon ürünlerine göre homofermantatif ve heterofermantatif LAB olmak üzere iki gruba ayrılırken, fenotipik özelliklerine göre ise; *Thermobacterium*, *Streptobacterium* ve *Betabacterium* şeklinde üç alt gruba ayrılmaktadırlar.

Thermobacterium grubunda homofermantatif bakteriler bulunur ve bu grubun optimum gelişme ısısı 40 °C civarında olup 15 °C'nin altında gelişemezler. *Thermobacterium* grubunda bulunan LAB, uzun çubuklar halinde tek tek, nadiren zincir şeklinde bulunurlar. *Thermobacterium* grubunda *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus jugurti*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* yer alır. Bunlardan *Lactobacillus delbrueckii* dışında kalan LAB'ların saf kültür hazırlanmasında kullanılırlar. *Streptobacterium* grubuna giren LAB'leri fakültatif heterofermantatif yapıda olup, kısa veya uzun

zincirler oluşturan çubuk şeklinde bakterilerdir. Optimum gelişme ısıları 30 °C civarında olup 15 °C'nin altında da faaliyet gösterirler. Bu gruba giren *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri* süt ürünleri için hazırlanan saf kültürlerde bulunurlar. *Betabacterium* grubuna giren LAB ise kesin heterofermantatif yapıda olup, laktozu parçalayıp laktik asit üretebilmelerinin yanı sıra asetik asit, etil alkol ve karbondioksit oluştururlar. *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus fermenti*, *Betabacterium* grubu içinde yer alırlar.

Homofermantatif grupta yer alanlar gerçek LAB olarak, heterofermantatifler ise gerçek olmayan LAB olarak gruplandırılmaktadırlar. Diğer bir deyişle SÇK'ları tam olarak laktik asite dönüştürenlere homofermantatif, dönüştürmeyenlere ise heterofermantatif LAB denir (8). Gerçek LAB (homofermantatif) katalaz negatif vermeleri ile gerçek olmayan LAB'den (heterofermantatif) ayırt edilirler. Homofermantatif LAB heksozlardan, laktik asit üretiminde heterofermantatif LAB'den daha fazla etkilidirler (3). Homofermantatif LAB'leri glukozu, fruktoz difosfat yolu ile parçalayarak, fermentasyon sonunda %99 oranında laktik asit, %1 oranında ise diğer bileşikler meydana getirirken, heterofermantatif LAB'leri, glikozu heksoz mono fosfat yolu ile parçalayarak fermentasyon sonucu %70 laktik asit, %30 oranında da diğer moleküllerden özellikle asetik asit, etil alkol ve karbondioksit oluştururlar. Ayrıca bazı LAB asetaldehit, diasetil, hidrojen peroksit, ekzopolisakkarit, bakteriyosin, bakteriyosin benzeri LAB metabolitleri ve şeker alkollerini gibi diğer yan ürünleri de sentezleyebilirler (20).

Heterofermantatif LAB'nin oluşturduğu fermentasyonda laktik asitin yanında önemli düzeyde diğer yan ürünler meydana geldiğinden bu ürünlerin silajlarda aşırı derecede oluşmaları istenmez. Heterofermantatif fermentasyonda karbondioksit oluşumu ile bir miktar besin maddesi ve enerji kaybı meydana gelir. Heterofermantatif anaerob bakteriler SÇK'ları enerji kaynağı olarak kullanırlar ve fermentasyon son ürünlerine dönüştürürler. Bunun sonucunda elde edilen silajlarda önemli miktarlarda KM kayıpları şekillenir. Homofermantatif LAB SÇK'ları laktik aside dönüştürme sürecinde, heterofermantatif LAB'lerine kıyasla daha düşük düzeyde enerji kullanırlar ve bunun sonucu olarak silajda KM kayıpları daha az olur (12). Genel olarak silolama sürecinde sadece karbonhidratları fermente edebilen ve fermentasyonunun son ürünü laktik asit olan homofermantatif LAB'nin aktivite göstermesi tercih edilir. Çünkü laktik

asit, asetik asitten daha güçlü bir silo asidi olduğu gibi, asetik asit ve etanol üretiminde meydana gelen birçok biyokimyasal reaksiyonda; KM ve enerji kayıpları, laktik asit üretimine göre daha fazladır (2).

Tablo 2.1. Homofermentatif ve Heterofermentatif Laktik Asit Bakterileri (6).

Homofermentatif Laktik Asit Bakterileri	Heterofermentatif Laktik Asit Bakterileri
<p>Lactobacilluslar: <i>Lb. plantarum</i>, <i>Lb. acidophilus</i>, <i>Lb. casei</i>, <i>Lb. comyiformis</i>, <i>Lb. curvatu</i>, <i>Lb. gasseri</i>, <i>Lb. helveticus</i>, <i>Lb. homohiochii</i>, <i>Lb. maltaromicus</i>, <i>Lb. delbrueckli ssp. lactis</i>, <i>Lb. delbrueckli ssp. bulgaricus</i></p> <p>Pediococcuslar: <i>P. acidilactis</i>, <i>P. pentosaceus</i>, <i>P. inopinatus</i></p> <p>Streptococcuslar: <i>St. faecalis</i>, <i>St. durans</i>, <i>St. faecium</i>, <i>St. lactis</i>, <i>St. bovis</i></p> <p>Enterococcuslar: <i>E. faecalis</i>, <i>E. faecium</i></p> <p>Lactococcus lactis</p>	<p>Lactobacilluslar: <i>Lb. brevis</i>, <i>Lb. buchneri</i>, <i>Lb. fermentum</i>, <i>Lb. viridescens</i>, <i>Lb. confuses</i>, <i>Lb. collinoides</i>, <i>Lb. hilgardii</i></p> <p>Leuconostoclar: <i>Lue. mesenteroides</i>, <i>Leu. lactis</i></p>

Silaj fermentasyonu açısından en önemli LAB türleri *Lactobacilli*, *Streptococci*, *Pediococci* ve *Leuconostoc* şeklinde sıralanabilir. Bu bakterilerin genel karakteristik özellikleri anaerobik koşullarda iyi gelişebilmeleri ve SÇK'ları çoğunlukla laktik asite fermente etmeleridir. Silolama işleminde LAB'nin fermentasyonu, silaj pH'sının düşmesi ve sonradan bozulmaya neden olabilecek anaerobik bakterilerin inhibe edilmesi noktasında önem taşımaktadır (2).

2. 4. 2. Silaj Fermentasyonda İstenmeyen Mikroorganizmalar

Silo içerisinde bulunan bazı mikroorganizmalar, patojen olmaları ve metabolizmalarında yüksek substrat tüketimine ihtiyaç duymalarından dolayı silo içerisinde gelişimleri arzu edilmez. Silonun hızlı bir şekilde doldurulması, sıkıştırılması ve hava girmeyecek şekilde kapatılması ile silajdaki aerobik mikroorganizma sayılarının minimuma indiği ve bu mikroorganizmaların gelişmesini engelleyen fermentasyon ürünlerinin maksimum düzeyde olduğu bildirilmektedir (8). Buna karşın, uygun bir

silolama işlemi yapılmadığında silo içerisinde silaj kalitesini bozabilecek aerob mikroorganizmalar üreyebilmektedir. Bu mikroorganizmalar arasında *Enterobacterler*, *Clostridialar*, maya ve mantarlar yer almaktadır (21). *Enterobacterler*, *Clostridialar*, maya ve mantarlar gibi istenmeyen aerob mikroorganizmaların silaj kalitesi üzerinde oluşturdukları olumsuz etkilerin hepsine birden aerob yıkımlanma denir. Bu olayda kolay okside olabilen besin maddelerinin yıkımlanması sonucu karbondioksit ve su oluşumunun yanı sıra, fermentasyon asitleri (asetik ve laktik asit), aminoasitler ve proteinlerde de kayıplar oluşarak amonyak şekillenir. Bu durumda şekillenen organik asit kaybı ve amonyak oluşumuna bağlı olarak silaj pH değerinde yükselme meydana gelir. Bu şekilde ortaya çıkan aerob yıkımlanma olayları silajın iç kısımlarına kıyasla, yüzeysel kısımlarında daha yüksek oranda meydana gelmektedir. Aerob yıkımlanmanın derecesini etkileyen önemli faktörler; siloya hava girişi, silajlık bitkinin türü, çevre sıcaklığı ve silo fermentasyon sıcaklığıdır (4). Silajlık bitkinin aşırı düzeyde soldurulması ya da çok geç dönemde biçilmesi, silolama sürecinde aerobik mikroorganizmaların oluşumunu veya gelişmesini hızlandırır (22). Aerobik yıkımlanmanın hızı ve derecesi fermentasyon sürecinde siloda oluşan ısı ve çevre sıcaklığı ile de ilişkilidir. Bu sebeple yaz mevsiminde kış mevsimine göre aerobik yıkımlanma olaylarının daha yüksek düzeyde olduğu bildirilmektedir. Silo içerisinde aşırı sıcaklık artışına (42-44 °C ve üzeri) bağlı olarak silajın besin madde içeriklerinden özellikle protein ve selülozun sindirilme derecesinin azaldığı bildirilmektedir (8). Silajlık materyalin KM içeriği ile silo içerisinde şekillenen ısı artışı ve buna bağlı olarak silajın KM kaybı Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. Silajda Isınmaya Bağlı Olarak Oluşan KM Kayıpları (23).

KM İçeriği, %.	KM Kaybı, %.
10	4.50
20	3.25
30	2.30
40	1.90
50	1.45
60	1.00

KM İçeriği: Silaj materyalinin KM değeri %; **KM Kaybı, %:** Silo içerisindeki her sıcaklık °C yükselmesi ile silajda oluşan KM kaybı, %.

Clostridialar (Bütirik Asit Bakterileri)

Clostridia grubu mikroorganizmalar, gram pozitif, spor oluşturan, genellikle hareketli, çubuk şeklinde ve zorunlu anaerobik olan mikroorganizmalar olup, ortamda bulunan karbonhidratları, organik asitleri veya proteinleri parçalarlar. Siloda *Clostridial* fermentasyon sonucu meydana gelen asıl ürün bütirik asit olup, bunun yanı sıra asetik asit, karbondioksit, hidrojen, bir miktar aseton ve bütül alkol oluşumunda söz konusudur. *Clostridia* türü mikroorganizmalar silaj fermentasyonu sırasında LAB'nin kullandıkları SÇK'ları kullandıklarından LAB'nin en önemli rakibi durumundadırlar. Bununla birlikte *Clostridialar* aminoasitlerin katabolizması sonucunda silo içerisinde $\text{NH}_3\text{-N}$ oluşturarak silajın besinsel değerini düşürmeleri, enerji kaybına neden olmaları ve oluşturdukları $\text{NH}_3\text{-N}$ sebebiyle silaj pH değerini arttırmalarından dolayı silaj fermentasyonu açısından istenmeyen mikroorganizmalar grubunda yer alırlar. Bu mikroorganizmalar silo içerisinde gelişim gösterebildikleri gibi, silolama öncesinde toprak ve dışkı ile silajı yapılacak yem bitkisine bulaşabilirler. Genel olarak SÇK'ları ve organik asitleri parçalayanlar sakkarolitik *Clostridialar*, proteinleri parçalayanlar da proteolitik *Clostridialar* olarak tanımlanır. *Clostridia* grubu mikroorganizmalar laktik asiti ve SÇK'ları bütirik asite, proteinleri ise aminoasitlere ve metabolizma sonucunda amidlere ve amonyağa kadar parçalayarak silajda kötü koku oluşumuna neden olan ürünler oluştururlar (24). *Clostridial* mikroorganizmaların etkinliği üzerinde yem bitkisinin KM ve SÇK içeriği, su aktivitesi, tamponlama kapasitesi, pH ve silo içi sıcaklık önemli rol oynar. Eğer ortamda LAB baskın mikroflora olduğu durumlarda silo içi pH değeri çok hızlı bir şekilde düşerek *Clostridiaların* gelişimi engeller. *Clostridia* grubu mikroorganizmaların gelişim gösterdikleri optimum pH değeri 7.0-7.4 olup asidik ortamlara duyarlıdırlar (24). *Clostridial* mikroorganizmalar özellikle KM içeriği düşük silajlık bitkilerinden silaj yapılması sırasında çok hızlı gelişim gösterirler. Nitekim bu yem bitkilerinden yapılan silajlarda silo içinde pH düşüşü yeterli düzeyde olmadığından söz konusu mikroorganizmaların etkinliği ile laktik asit bütirik asite, aminoasitler ise amonyağa parçalanır. Silolanacak yem materyalinin KM içeriği yüksek olduğunda ise bitkinin su aktivitesi azalır ve bunun sonucunda laktik asit bakterilerinin gelişimi engellenerek pH düşüşü yavaşlar. Silajlık bitkinin KM içeriğinin %35-40 düzeyinde tutulması durumunda laktik asit bakterilerin gelişimi için gerekli minimum düzeyde su aktivitesi (0.93-0.94) sağlanarak *Clostridia* grubu mikroorganizmaların gelişiminin

engellenebileceği bildirilmektedir (25). Silolanacak materyalin nem içeriğinin %70 ve üzerinde olduğu durumlarda soldurma işleminin uygulanması veya KM değerini arttıracak uygun katkı maddelerinin ilave edilmesi gerekir (24).

Silolan bitkinin tamponlama kapasitesi ve SÇK içeriği *Clostridia* grubu mikroorganizmaların gelişimi açısından önemli etkenlerdir (24). Yüksek tamponlama kapasitesine ve düşük düzeyde SÇK içeriğine sahip yonca ve diğer baklagil kaba yemleri bu açıdan silolanması zor olan bitkilerdir. Silajlık bitkinin asidifikasyona karşı gösterdiği direnç yani tamponlama kapasitesi ne kadar yüksek olur ise silodaki pH düşüşü o kadar yavaş olur. Silaj yapılacak bitkinin SÇK içeriği ne kadar düşük düzeyde olursa silo içerisinde laktik asit üretimi de o denli sınırlı düzeyde olmakta ve silaj fermentasyonu *Clostridial* fermentasyona doğru kaymaktadır. Silo içi sıcaklık da *Clostridia* türü mikroorganizmaların gelişimi açısından önemlidir. Düşük KM içeriğine sahip silajlık bitkiler, 42 °C gibi yüksek çevresel sıcaklıkta silolandığında *Clostridial* fermentasyonun; 20 °C'lik çevresel sıcaklıkta silolamada ise, LAB'nin etkinliğine bağlı olarak laktik asit fermentasyonunun söz konusu olduğu belirlenmiştir (15,24).

Enterobacter Grubu Mikroorganizmalar

Bu familyadan bir kaç türün (*Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, *Bacterium herbicola*) silaj fermentasyonunda rol oynadığı ve genellikle bu grup mikroorganizmaların patojen olmadığı bildirilmektedir (15). Silajda bulunan bu mikroorganizmalar gram negatif, spor oluşturmeyen, fakültatif anaerobik, genel olarak hareketli, patojen olmayan ve çubuk şeklinde mikrobiyal yapıya sahiptirler. *Enterobacter* grubu mikroorganizmalar silo içerisinde SÇK'ları fermente ederek başta asetik asit olmak üzere formik asit gibi ürünleri oluştururlar. Oluşan formik asit ortamda ya birikim gösterir ya da moleküler hidrojen ve karbondioksite indirgenir. *Enterobacter* grubu içerisindeki *Escherichia coli* türünde ise, 4 mol piruvat oluşur, piruvatın iki molu laktik asite, diğer iki mol ise asetil fosfat ve formik asite dönüşür. Silaj fermentasyonun başlangıcında etkin olan *Enterobacter* grubu mikroorganizmaların optimum gelişim gösterdikleri pH değeri yaklaşık 7.0 civarı olup, düşük pH ve ısıya karşı hassastırlar. *Enterobacter*'lerin silo içindeki gelişimleri, ortamın pH değerinin 5.0'ın altına düşmesi ve ısının 27-35 °C aralığında olmasıyla engellenmektedir (11). Silo içerisinde LAB ne kadar hızlı etkin duruma geçerse, *Enterobacter* grubu mikroorganizmaların gelişimi de o kadar yavaş olmaktadır (24).

Funguslar (Maya ve Küf Mantarları)

Ökaryotik hücre yapısına sahip fungusların tek hücreli olarak gelişim gösterenlerine maya, çok hücreli iplikli koloniler halinde gelişim gösterenlerine ise küf mantarları denir. Bu grup mikroorganizmaların büyük bir bölümü gelişimleri için oksijene gereksinim duyarken, gerek maya ve gerekse küf mantarlarının bazı türleri anaerobik koşullar altında da faaliyetlerini devam ettirebilirler (24). Silaj mikrobiyolojisinde istenmeyen ve silaj kalitesini bozan mikroorganizmalar grubu olan küfler; yapısal karbonhidratları ve lignini yıkımlarken, mantarlar; şeker, laktik asit, hidrolize ve metabolize selüloz ve diğer hücre duvarı komponentlerini yıkımlar. Küflerin lipolitik aktivitesi sonucu ransit bozulma, proteolitik aktiviteleri sonucunda ise peynirimsi acı lezzet oluşabilmektedir. Mayalar ise, silajlık materyalde sadece SÇK'lar ve fermentasyon ürünlerini tüketirler (26).

Mayalar

Aerobik mikroorganizmalar grubundan olan mayalar, silajlık bitki bünyesindeki SÇK'ları başta alkol olmak üzere karbondioksit ve organik asitlere parçalarlar. Siloda meydana gelen maya fermentasyonu alkol fermentasyonu olarak da tanımlanabilir. Aerobik bozulmada önemli paya sahip olan mayaları iki gruba ayırmak mümkündür. İlk grupta yer alan mikroorganizmalar (*Candida*, *Endomycopsis*, *Hansenula* ve *Pichia*) asitleri kullanırken, diğer gruptakiler ise (*Torulopsis*) karbonhidratları kullanırlar (27). Mayalardan *Candida* ve *Hansenula* türleri laktik asiti yıkımlayarak silaj pH değerini yükseltirler. Böylece silo açıldıktan sonraki süreçte de küf mantarlarının gelişimi için uygun koşullar sağlanmış olur. Silajlarda aerobik bozulma açısından kritik maya değerinin 10^5 kob/gr KM olduğu bildirilmektedir (28). Silajı yapılan yem bitkileri içerisinde mısır bitkisinin maya içeriği, baklagil ve çayır yem bitkilerine göre daha yüksektir. Dolayısıyla mısır silajında alkol fermentasyonu daha yoğun olarak gerçekleşmektedir. Buna karşılık baklagil yem bitkilerinin, mısıra göre yüksek olan protein içeriğinin alkol fermentasyonunu engellediği kabul edilmektedir (15).

Mayalar genel olarak 0-37 °C arasında gelişimlerine devam edebildikleri gibi 45 °C'nin üzerinde aktif olan türleri de bulunmaktadır. Mayalar 3-8 arasındaki pH değerlerinde etkin olabildiklerinden, silo içerisinde düşük pH değerleri mayaların gelişimini engelleyemez. Ancak çoğu maya türünün gelişimi için optimum pH değerinin 3.5-6.5 arasında olduğu kabul edilmektedir (29). Aerobik koşullar altında mayalar diğer

birçok mikroorganizma türüne göre organik asitlere karşı toleranslıdırlar. Silajdan izole edilen mayaların aerobik koşullar altında laktik, asetik, sitrik, malik, suksinik ve propiyonik asit gibi organik asitleri ve etanolü tükettikleri bildirilmektedir (15). Silaj içerisinde maya varlığı iki temel sebepten dolayı istenmez. Bunlardan ilki, silajın niteliği açısından oldukça önem taşıyan aerobik stabilite üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmaları, diğeri ise LAB ile mücadeleye girerek ortamda bulunan SÇK'ları kullanmaları ve bunları etanole dönüştürmeleridir.

Mayaların etkinliğine bağlı olarak silo içerisinde oluşan alkol her ne kadar silajın tat ve kokusu üzerinde olumlu etki yapsa da, silajla birlikte alınan alkolün bir kısmının solunum yoluyla dışarıya atılması enerji kaybına yol açar. Mayalar ayrıca KM kaybına ve silo içerisinde sıcaklık artışına da neden olurlar. Silolanacak yem materyalinin maya sayısı, LAB'ne göre daha fazla olup, soldurma işlemi sırasında da bu mikroorganizmaların sayısında artış görülür. Nitekim yapılan bir çalışmada fermentatif özellikli mayaların hasat sırasındaki sayıları yaklaşık 200 kob/gr KM iken, soldurma işlemi sonrasında bu rakamın 10.000 kob/gr KM'in üzerine çıktığı saptanmıştır. Silo içerisinde aerobik dönemin uzaması da maya popülasyonunda artışa sebep olabilmektedir (27,30).

Küf Mantarları

Silo içerisinde olması istenmeyen diğeri bir mikroorganizma grubu da küf mantarlarıdır. Siloda küf mantarlarının gelişimi için; nem içeriğinin %13'ün, sıcaklık değerinin ise 12.8 °C'nin üzerinde olması, ortamda kullanılabilir besin maddelerinin bulunması, pH değerinin 5'in üzerinde olması, oksijen varlığı gibi faktörler önem taşımaktadır. Silajdaki küf mantarı varlığı 10^6 - 10^7 kob/gr değerine ulaştığında, silajdaki fermentasyon ürünleri küf mantarları tarafından tüketilerek silajda ısı artışı meydana gelir. Silo içi ısının 65 °C'yi geçtiği durumlarda silaj materyalinde kızışma, maya küf sayısında artış ve protein yıkımlanması ortaya çıkmaktadır (8,31). Silo içerisinde etkin duruma geçen küf mantarları, bitki bünyesindeki karbonhidrat ve proteinler ile oluşan laktik asiti tüketerek silajın fiziksel ve kimyasal yapısında bozulmalara sebep olarak silajların kalite ve sindirim değerlerini azaltmaktadır (32). Nitekim yemin tat ve kokusunda olumsuz etkileri oluşturan kükürtdioksit ve hidrojen gibi protein parçalanma ürünleri, küf mantarı etkinliğinin bir sonucudur. Bu mikroorganizmalar karbonhidrat, laktik asit ve proteinin yanında selüloz ile diğeri hücre duvarı komponentlerini de

hidrolize ve metabolize ederler. Küf mantarlarının kendileri zararlı etki oluşturabileceği gibi, metabolik ürünleri olan mikotoksinler de insan ve hayvan sağlığı açısından da sorun oluştururlar. Silo içerisinde küf mantarlarının bulunması silo ortamında havanın bulunduğunu, yani sıkıştırma ve kapatma işleminin eksik yapıldığının göstergesi olarak kabul edilir. Özellikle silonun hava ile temas eden üst ve kenar yüzeylerinde küf mantarlarının daha yoğun olarak ürediği gözlemlenir.

Listeria Grubu Mikroorganizmalar

Listeria grubu mikroorganizmalar, silajın besleyici değeri ve hijyen kalitesi üzerinde olumsuz etki oluşturmalarının yanında, hayvan ve insan sağlığı açısından da büyük tehlike oluşturmaları söz konusudur. Dolayısıyla bu bakterilerin *Clostridia* grubu bakteriler gibi silajda hiç bir zaman bulunmaları istenmez. *Listeria monocytogenes* bakterisi genç sığırlarda septisemi oluştururken, ergin sığırlarda meningoensefalitislere sebep olur. Ayrıca sporadik olarak da mastitislere neden olduğu ve sütle atıldığı bildirilmektedir (33). *Listeria monocytogenes* spor oluşturmeyen ve çubuk şekilli bir bakteri olup silaj dışında çürük meyve ve sebzelerde, dışkıda ve toprakta yaygın olarak bulunur (15). Bu mikroorganizmalar silaj içerisinde gelişim gösterebilmeleri için oksijene ve 5.5'un üzerinde bir pH değerine gereksinim duyarlar. *Listeria* grubu mikroorganizmalar çok geniş sıcaklık değerleri arasında gelişebilirler ve KM içeriği düşük silajlarda daha etkindirler (24).

2. 5. Silaj Katkı Maddeleri

Silaj yapımındaki amaç; taze kaba yem materyalinin mümkün olan en az besin maddesi kaybı ile konserve edilmesidir. Kaba yemlerin veya gıda sanayi yan ürünlerinin silolanarak konservasyonunda silaj katkı maddesi kullanımının öncelikli amacı; besin madde kaybını azaltmak, elde edilen silajın yem değerini ve kalitesini iyileştirmek, fermentasyon akışını düzenlemek, probiyotik etki göstererek silajların hayvanlar tarafından değerlendirme düzeylerini artırmak ve silo açıldıktan sonra silaj kalitesinin uzun süre korunabilmesini sağlamaktır. Silaj yapımı sırasında farklı amaçlara yönelik olarak birçok silaj katkı maddesi kullanılabilir. Bunlardan silajı besin maddeleri yönünden zenginleştirenler (dane yem kaynakları, melas, posalar, üre, mineraller vb.), enzimler (sellülaz, hemisellülaz, amilaz, pektinaz vb.), asit ortamı güçlendirilenler

(sülfirik asit, formik asit, hidroklorik asit, fosforik asit, asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit vb.), prezarvatif olarak katılanlar (sodyum diasetat, sodyum metabisülfid, sodyum benzoat, sodyum nitrat, kalsiyum format, tuz vb.) ve silaj fermentasyonunu iyileştirmek amacıyla kullanılan bakteri inokulant (ticari LAB inokulantları) kaynaklarıdır. Bu çalışmanın temel konusu; LAB'nin yonca silajı üzerine etkinliğini araştırmak olduğundan silaj katkı maddeleri bölümünde LAB inokulantları üzerinde durulacaktır.

2. 5. 1. Laktik Asit Bakteri (LAB) İnokulantları

Ticari LAB inokulantları, genel olarak *Lactobacillus plantarum*, diğer *Lactobacillus* türleri, *Streptococcus faecium* ve çeşitli *Pediococcus* türlerinin tek başlarına ya da çeşitli karışımlarını bir arada bulunduran ürünlerdir. Silaj fermentasyonu sırasında silajın laktik asit miktarını arttırarak, silaj pH değerini düşürmek maksadıyla silaj materyaline ticari LAB inokulantlarının kullanımı son yıllarda yaygınlaşmıştır. Silaj fermentasyonu sürecinde etkinlikleri farklı olan mikroorganizmaların, LAB inokulantlarında bir arada kullanılmasının üstünlükleri vardır. Ticari LAB inokulantları, silajlık materyalin siloya doldurulması aşamasında ya tanecikli formda ya da liyofilize formları suda süspanse edildikten sonra silajlık materyale katılırlar (34). Ticari LAB inokulantlarının silaj materyaline homojen karışması açısından su içerisinde çözdürülerek uygulanması tavsiye edilmektedir (35). Toz olarak ilave edildiklerinde, sıvı uygulamaya göre silajlık bitki yüzeyinde homojen dağılımları olmayacağından ve silo içerisindeki aktiviteleri azalacağından sıvı uygulamalar tercih edilmelidir (34).

Laktik asit bakterileri, silajın fermentasyon sürecinde hemen hemen hiçbir besin madde kaybına yol açmadıklarından, arzu edilen fermentasyonu sağlayan mikroorganizma grubudur. Laktik asit bakterileri tarafından salgılanan laktasidaz enzimi, silo içerisinde yemlerin yapısında bulunan SÇK'ları parçalayarak laktik asit üretir. Silaj pH değerindeki azalma laktik asit üretimi ile yakından ilişkili olup, silajda laktik asit üretim hızının yüksek olması proteolizisin şekillenmesini azaltmaktadır (36).

Laktik asit bakterileri, silo içerisinde anaerobik şartlar oluşur oluşmaz etkin duruma geçerler. Genel olarak LAB'nin fermentasyon başlangıcındaki üreme yetenekleri çok hızlıdır. Silolama işleminin ilk 24 saatinin sonunda fermentasyonu tam

olarak başlatabilir ve her gram silajdaki LAB sayısı 10^8 - 10^9 miktarına ulaşabilir. Bu şekilde hızlı üreyebilme yeteneklerinden dolayı bu bakterilerin fermentasyon başlangıcındaki besin madde ihtiyaçları son derece yüksektir. Silolama sürecinde LAB'nin rolü sadece SÇK'ları parçalayarak pH seviyesini düşürmek değil, aynı zamanda bakteriyosin, hidrojen peroksit, laktat peroksidaz yada 1.2-propanediol gibi antifungal ve antimikrobiyal ürünler meydana getirerek, bitkideki besin maddeleriyle rekabete giren ancak silo ortamında bulunması istenilmeyen mikroorganizmaların da çoğalmalarını ve aktivitelerini engellemektir (20).

Silaj katkı maddesi olarak mikrobiyal inokulant kullanımında genel olarak homofermentatif inokulantlar öncelikli olarak tercih edilirler. Bu inokulantlar silajdaki pH değerinin hızla azalmasına, silaj oluşumu sonrası pH'nın düşük seviyede kalmasına, yüksek laktat:asetat oranına ve düşük etanol üretimine sebep olmaktadır (9). Ancak *Lactobacillus buncheri* gibi heterofermentatif LAB inokulantlarının, silaj asetik asit konsantrasyonunu arttırmak suretiyle küf oluşumunu engellediği ve elde edilen silajın aerobik stabilite değerini arttırmak amacıyla da kullanıldığı bildirilmiştir (7). Yapılan çalışmalarda ticari LAB inokulantlarının taze silaj materyaline genel olarak Asya ve Güney Amerika ülkelerinde 10^4 kob/gr, Avrupa'da 10^6 kob/gr, ABD'de ise 10^5 kob/gr oranında uygulandığı görülmüştür (37). Uygulamalarda genel olarak taze silaj materyaline 10^{5-6} kob/gr oranında bakteriyel inokulantın homojen olarak katılmasının, silaj içerisindeki hakim bakteri türünün LAB olması için yeterli olduğu bildirilmiştir (38).

Laktik asit bakteri inokulanlarının kullanılmasıyla silaj fermentasyon süresinin kısaldığı, herhangi bir bakteriyel katkı yapmadan sadece bitkinin yapısında bulunan epifitik mikroorganizmalarla hazırlanan silajlarda fermentasyon 10-21 gün arasında gerçekleşirken, yüksek kaliteli bir inokulant kullanılması fermentasyon süresini 3-10 gün (silo doldurulduktan sonra) azaltılabileceği bildirilmiştir (12). Fermentasyon süresi silajın yapıldığı dönemdeki çevre sıcaklığı, silajlık bitkinin parçalanma uzunluğu, silajlık bitkinin SÇK miktarı, tamponlama kapasitesi vb. faktörlere göre değişiklik gösterebilir.

Çevre sıcaklığı: Laktik asit bakterileri için en uygun sıcaklık aralığı 5-50 °C arasında olmasına rağmen, çoğu LAB için ideal sıcaklık değeri 30 °C dir (24). Yüksek sıcaklığa karşı *Pediococcuslar*, *Lactobaccillere* göre daha dirençli olduğundan sıcak

mevsimlerde yapılan silajlara katılan inokulantların seçiminde bu durumun göz önünde bulundurulması gerekmektedir (39).

Silajlık Bitkinin Parçalanma Boyutu ve Sıkıştırma Düzeyi: Düşük KM içeriğine sahip silajlık bitkiler biraz uzun boyutta, yüksek KM içeriğine sahip olanlar ise daha kısa partikül büyüklüğünde parçalanmalıdır. Kuru madde içeriği yüksek silajlık bitkiler uzun parçalar halinde doğrandığında sıkıştırma işlemi kolay olmayacağından silo içerisindeki havanın boşaltılması güçleşmektedir. Düşük KM'ye sahip silajlık materyalde kısa parçalama boyutunda bitki hücrelerinin parçalanmasına ve SÇK'ların mikroorganizmalar tarafından hızla serbest bırakılmasına bağlı olarak aşırı su kaybı ile birlikte istenmeyen fermentasyon şekillenebilir (40). Silaj yapımında sıkıştırmanın yetersiz olması KM kayıplarını arttırmakla birlikte, silaja katılan katkı maddelerinin etkinliğini de azaltmaktadır (41).

Suda Çözünabilir Karbonhidrat Miktarı: Silajlık bitkilerde bulunan karbonhidratlar yapısal ve yapısal olmayan karbonhidratlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Yapısal karbonhidratlar başlıca hücre duvarı (sellüloz, hemisellüloz), nişasta, pektin ve B-glukanlardan oluşur. Buna karşılık yapısal olmayan yani hücre içi bileşenleri ise glukoz, fruktoz, sükroz ve fruktanlar ile eseri miktarlarda di, tri ve tetra sakkaritler gibi şekerlerden oluşurlar. Yapısal olmayan karbonhidratların hepsi suda çözünebildikleri için bunlara SÇK'lar da denir. Silajdaki fermentasyon sırasında bitki bünyesinde bulunan SÇK'lar, LAB tarafından hızla fermente edilirler. Silajlık materyalin iyi bir şekilde silolanabilmesi için taze materyalde en az %3-5 düzeyinde SÇK içermesi gerekir. Nem içeriği yüksek, KM değeri düşük olan bitkilerle yapılacak silajlarda silo içerisinde pH'nın düşürülüp asit ortamın sağlanabilmesi için daha fazla SÇK ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısıyla bitkilerin SÇK içerikleri silaj fermentasyonu açısından büyük öneme sahiptir (42). Bitki bünyesinde SÇK içeriğinin düşük olması durumunda LAB silo içerisinde dominant mikroflora durumuna geçemezler. Şeker pancarı yaprakları, mısır ve diğer buğdaygil yem bitkilerinin SÇK içeriği yonca ve üçgül gibi baklagil yem bitkilerine göre daha yüksektir. Silonacak taze materyalde ortalama SÇK içeriğinin yonca bitkisinde %4-5, mısırdaki %8-30, mısır dışında diğer buğdaygil yem bitkilerinde ise %10-20 düzeyinde olduğu ve silolanacak yem materyalinin en düşük SÇK değerinin bitkinin KM içeriğine göre değiştiği bildirilmektedir (43).

Bitkinin Olgunlaşma Evresi: Silajlık yem bitkilerinin daneleri olgunlaştıkça bitkinin yapısında bulunan SÇK içeriği azalırken, nişasta içeriğinde ise artış meydana gelir. Laktik asit bakterileri gelişimlerinde nişastayı substrat olarak kullanamazlar. Silo içerisindeki fermentasyon sırasında bitki enzimlerinin oluşturduğu asit hidrolizleri sayesinde, bitki bünyesinde bulunan nişasta SÇK'lara indirgenerek LAB tarafından kullanılabilir hale dönüştürülürler.

Tamponlanma Kapasitesi: Silajlık bitkilerin tamponlama kapasiteleri fermentasyon açısından oldukça önemli bir parametredir. Bitkilerin tamponlama özelliklerinin büyük bir kısmı yapılarındaki anyonlardan (organik asit tuzları, ortofosfatlar, sülfatlar, nitratlar ve klorürler) kaynaklanırken, yaklaşık %10-20'lik bir kısmı ise bitki proteinlerinin aktivitelerinden kaynaklanmaktadır. Baklagil kaba yemlerinin tamponlama kapasiteleri, buğdaygillerden daha yüksek olduğundan, baklagil kaba yemleri buğdaygillere göre daha zor silolanırlar. Yüksek tamponlama kapasitesine sahip bitkiler, fermente olabilmek için daha fazla SÇK ve daha uzun fermentasyon süresine gereksinim duyarlar. Tamponlama kapasitesi yüksek olan bitkilerden elde edilen silajların pH değerleri de yüksek olduğundan, bu tür bitkilerden yapılan silajlarda besin madde kaybı daha fazla olur. Yonca bitkisi gibi tamponlama kapasitesi yüksek, SÇK içeriği düşük olan kaba yem kaynaklarının silolanması esnasında, ortam pH'sının düşmesi için daha fazla asit oluşumuna gereksinim duyulmaktadır. Soldurma işlemi, bitki hücre sıvısındaki şeker oranını artırıp, tamponlama kapasitesini düşürdüğünden, su içeriği ve protein değeri bakımından zengin körpe yem bitkilerinin silolanmaları öncesinde uygulanacak soldurma işleminin yararlı olabileceği düşünülmektedir. Aynı amaca yönelik olarak silolanacak yem materyaline şeker yada melas ilavesi de silaj fermentasyonunu olumlu etkileyebilir (24).

Kuru Madde Değeri: Silolanacak bitkisel materyalin KM içeriği fermentasyon kalitesinin yanı sıra, fermentasyon için gerekli olan LAB'nin gelişimlerini de etkilemektedir. Silaj fermentasyonu açısından en uygun KM içeriği kesin olarak belli olmamakla birlikte, silolanacak ürünlerin %30-42 arasında KM içermesi arzu edilmektedir. Silaj yapılacak bitkilerin vejetasyonun erken dönemlerinde, hasat edilmesiyle hazırlanan silajlarda bütirik asidin yoğun olduğu bir fermentasyon görülmektedir. Bu tip materyallerin silolanmaları öncesinde daha uzun süre soldurma işlemine maruz bırakılmaları gerekmektedir. Soldurma süresinin uzaması bitkilerdeki

enzim aktivitesini artırarak, silajlık materyalde bozulmaya ve besin madde kayıplarına neden olabilmektedir (42).

Silajlık Bitkinin Sahip Olduğu Doğal Mikroorganizma Sayısı ve Türü:

Silajlık bitkilerin doğal mikrofloralarında maya ve küf mantarlarının yanısıra, LAB, *Coliform*, *Bacillus* ve *Clostridium* grubu mikroorganizmalarda bulunmaktadır. Silajlık bitkilerin sahip oldukları doğal mikroorganizmaların sayı ve çeşitleri; çevre şartlarına, silonun yapıldığı yere, zamana (mevsim), kirlenme derecesine, bitki türüne, bitkinin varyetesine ve KM içeriğine göre değişiklik göstermektedir (13).

Silolamanın ilk zamanlarında, silo ortamında istenmeyen fermentasyon ürünlerini meydana getiren zararlı mikroorganizmaların sayısı, LAB'ne kıyasla yüksek olmakta, ancak silolamanın ilerleyen zamanlarında zararlı mikroorganizma sayıları gittikçe azalmaktadır. Silajı yapılacak bitkisel materyaldeki LAB sayısı başlangıçta düşük düzeyde olsa da, fermentasyonun ilerleyen dönemlerinde bu değer yaklaşık 8-9 kata ulaşabilmekte, LAB silo içerisinde dominant mikroflora durumuna geçebilmekte ve ortama LAB hâkim olmaktadır (15). Bitki üzerindeki doğal LAB sayısı silajlık bitki çeşidine göre farklılık gösterir. Yeşil kaba yemlerin doğal LAB sayısı yonca bitkisinde genel olarak düşük (taze materyalde 10^5 kob/gr) bulunmakta, bu değer çok yıllık otlarda 10^6 kob/gr, mısır ve sorgumda ise 10^7 kob/gr olarak bulunmaktadır. Yonca bitkisinin yapısındaki epifitik LAB sayısı ikinci veya üçüncü biçimde artarken, mısır bitkisindeki epifitik LAB sayısı erkenci çeşitlerde daha fazladır. Çevre şartları silajlık bitkinin yapısındaki doğal LAB sayısını etkilemekte, sıcak çevresel koşullarda bitki bünyesindeki LAB sayısı soğuk havalara kıyasla daha fazladır. Soldurma işleminin silajlık bitkilerin sahip olduğu doğal LAB sayısını etkilediği ve soldurma işleminin LAB sayısını artırıcı yönde etki gösterdiği bildirilmektedir (31,44,45).

Laktik asit bakteri sayısının taze çayır otunda 7.10^2 - 7.10^5 kob/gr, silajlık mısırdaki 3.10^2 - 7.10^5 kob/gr ve yeşil otlarda 10^5 - 10^6 kob/gr arasında değiştiği, bu bakterilerin ancak yarısının prensip olarak silaja elverişli türlerden oluştuğu bildirilmektedir (46). Silaja ilave edilen LAB inokulantlarının etkili olabilmesi için kullanılan doz değerinin, silajı yapılacak bitkinin yapısında bulunan doğal LAB sayısından daha fazla miktarda olması gerektiği bildirilmektedir (46). Silajlık bitki materyallerinin küçük boyutta parçalanmasının bitki mikroflorasında artışa, özellikle LAB popülasyonunun artmasına neden olduğu bildirilmektedir (31,47).

Tablo 2.3. Farklı KM Düzeylerine Göre Bazı Yem Bitkilerindeki Doğal Mikroorganizma Sayıları, Log, (23).

Yem Bitkisi	KM, %	Laktik Asit Bakterileri		Maya ve Küf (Log kob/gr)
		Koklar (Log kob/gr)	Rodlar (Log kob/gr)	
Mısır	34-47	5.7-6.7	3.9-6.0	6.6- 7.3
Yonca	22-44	4.0-5.8	< 3.0- 4.8	5.5- 7.0
Çayır Otu	30-34	4.0-5.3	< 3.0- 3.5	4.6-5.9
Sorgum	34	4.0	5.3	6.9

Laktik asit bakteri inokulantları, silaj fermentasyonunda etkinlik kabiliyetlerine göre seçilmiş LAB'den bir ya da daha fazlasını içerirler. Laktik asit bakteri inokulantlarında birden fazla sayıda bakteri türünün kullanılmasının gerekçesi, bakterilerin potansiyel sinerjik aksiyonlarının bulunması olarak açıklanmaktadır (7). Laktik asit bakterilerinin gelişme hızları sıralandığında *Enterococcus* > *Pediococcus* > *Lactobacillus* şeklinde bir sıralama yapılmaktadır. Ayrıca, bazı *pediococcus* türlerinin *Lactobacilluslar*'a göre düşük nem ortamına daha toleranslı oldukları ve optimum düzeyde gelişim gösterebilmeleri için ihtiyaç duydukları sıcaklık ve pH değerlerinin daha geniş aralıkta olduğu bildirilmektedir (48). Laktik asit bakteri inokulanlarında farklı pH değerlerinde faaliyetlerini devam ettirebilecek birden fazla bakteri türünün birlikte kullanılması ile silolama esnasında değişen pH seviyelerinde (4.0–6.0) hızlı bir fermentasyonun sağlanması garantiye alınmış olur. Örneğin aerobik koşullarda gelişimi iyi olan *Streptococcus faecalis*'in silolamanın başlangıcında pH 5.0-6.5 değerleri arasında etkin olduğu ve bu amaçla *Lactobacillus plantarum*'la beraber kullanılabileceği bildirilmiştir (15). Ayrıca, silolanacak bitki materyalinin çeşidi, KM değeri ya da silolama esnasındaki çevre ısısı gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak birkaç türün birlikte kullanılması bakteri inokulantının etkinliğini artırabilmektedir. Bu nedenle birçok LAB inokulantı, birden fazla LAB türünü ya da aynı türün birkaç hattını birlikte içerir (2). Bakteriyel inokulantlarda kullanılan bakterilerin fermentasyon sürecinde silo içerisinde egemen olabilmeleri için yeterli sayıda olmaları gerekir. *Lactobacillus plantarum*'a dayalı inokulantlarda yaygın olarak gram taze silaj materyaline tavsiye edilen inokulasyon dozu tercihen 10^6 kob/gr olmak üzere minimum 10^5 kob/gr olması gerektiği bildirilirken, düşük KM içeriğine sahip çayır otundan hazırlanacak silajlara daha yüksek inokulasyon dozları kullanılmaktadır (3,48,49,50).

Tablo 2.4. Mikrobiyal Silaj İnokulantlarında Yaygın Olarak Kullanılan Bakteriler ve Kullanım Amaçları (7,48).

Bakteri Türü	Bakteri Tipi	Kullanım Amacı	Oluşan Başlıca Ürün
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LAB, Homolaktik	Hızlı LA üretimi, yüksek asit toleransı	LA
<i>Pediococcus acidilactici</i>	LAB, Homolaktik	Hızlı LA üretimi, <i>Lactobacilluslara</i> göre hızlı gelişim, bazı hatlarının serin koşullarda hızlı gelişimi ve osmotoleranslarının iyi oluşu	LA
<i>Enterococcus faecium</i>	LAB, Homolaktik	Hızlı LA üretimi, <i>Lactobacilluslara</i> göre hızlı gelişim	LA
<i>Propionibacterium shermanii. jensenii</i>	LAB, Heterolaktik	Antifungal bileşiklerin üretimi	PA, AA, CO ₂
<i>Lactobacillus buchneri</i>	LAB, Heterolaktik	Antifungal bileşiklerin üretimi	PA, AA, CO ₂ , propanediol
<i>Streptococcus faecium</i>	LAB, Homolaktik	Hızlı LA üretimi	LA
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	LAB, Homolaktik	Hızlı LA üretimi, <i>Lactobacilluslara</i> göre hızlı gelişim, bazı hatlarının serin koşullarda hızlı gelişimi ve osmotoleranslarının iyi oluşu	LA
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	LAB, Homolaktik	Hızlı LA üretimi	LA
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	LAB, Homolaktik	Hızlı LA üretimi	LA
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LAB, Homolaktik	Hızlı LA üretimi	LA
<i>Streptococcus diacetylactis</i>	LAB, Homolaktik	Hızlı LA üretimi	LA
<i>Streptococcus cremoris</i>	LAB, Homolaktik	Hızlı LA üretimi	LA
<i>Streptococcus durans</i>	LAB, Homolaktik	Hızlı LA üretimi	LA
<i>Lactobacillus casei</i>	LAB, Homolaktik	Hızlı LA üretimi	LA

LA: laktik Asit; **PA:** Propiyonik Asit; **AA:** Asetik Asit; **CO₂:** Karbondioksit

Laktik asit bakteri inokulantlarda yaygın olarak kullanılan mikroorganizmalardan *Lactobacillus plantarum*'un silo içerisinde iyi bir yayılma özelliğine sahip olmasından dolayı silaj yapımında kullanılabilir en uygun bakteri türü olduğu ve ticari inokulantlarda mutlaka bulunması gerektiği bildirilmektedir (46). Her ne kadar *Lactobacillus plantarum* istenen çoğu özelliği bir arada taşısa da silaj ortamında pH değerini 5'in altına düşünceye kadar çok yavaş bir laktik asit üretimi şekillendirmektedir. Bu yüzden bazı ticari inokulantlar yüksek pH değerlerinde (5.0-6.5)

aktivite gösterebilen *Pediococcus* ve/veya *Streptococcus* gibi silo fermentasyon fazının ilk aşamalarında etkinlik gösterebilen mikroorganizmaları içermektedir. Bunun yanında *Lactobacillus plantarum* raf ömrü olarak depolama sürecinde canlılığını diğer bazı türlere göre daha kolay kaybedebildiğinden kullanım dozunun bu kayıpları karşılayacak düzeyde yüksek değerlerde olması gerektiği bildirilmektedir. *Lactobacillus plantarumun* ile ilgili bu olumsuzluğu giderebilmek için *Pediococcus* cinsine bağlı türlerin inokulantlara ilavesi ile inokulantların etkinliğinin artabileceği belirtilmektedir (51).

Laktik Asit Bakteri İnokulantlarının Silaj Kalitesi Üzerine Etkisi

Silaj katkı maddesi olarak kullanılan bakteriyel inokulantların silaj fermentasyonu üzerine etkileri inokulantın içeriğinde bulunan LAB'nin özelliğine göre değişmektedir. Fermentasyonda homolaktik LAB'nin baskın tür olması halinde, silo içerisindeki laktik asit konsantrasyonu, asetik asit ve etanola göre daha hızlı yükselir ve silaj pH değeri hızla düşer. Sonuç olarak silaj materyalinin etanol, bütirik asit ve asetik asit miktarları normal fermentasyona göre daha düşük olur. Silaj fermentasyonu esnasında üretilen asitlerin en kuvvetlisi laktik asit olup, etkili bir LAB inokulantı ilavesi ile silajda yüksek miktarda laktik asit oluşumu ve buna bağlı olarak düşük pH değeri elde edilir. Böylece laktik asit fermentasyonu pH değerinin LAB'nin aktivite gösteremeyeceği seviyeye düşünceye kadar devam eder (2). Bakteriyel inokulantlarla yapılan çalışmalarda inokulantların tek başına ya da enzimlerle kombinasyon halinde silaj materyaline ilave edilmesinin silaj fermentasyonu iyileştirmede etkili olduklarını göstermiştir (52). Bununla beraber mısır silajına inokulant ilavesiyle tutarsız sonuçlar alındığı ve inokulant kullanılarak yapılan araştırmaların sadece %40'luk kısmında fermentasyonda gelişmeler tespit edildiği; bununla beraber baklagil ve çayır otlarına bakteriyel inokulant ilavesiyle yapılmış çalışmaların %66'luk kısmında fermentasyonda gelişmeler sağlandığı bildirilmiştir (50). Bakteriyel inokulantların silajdaki en önemli etkilerinden biri de KM kaybının azaltılması üzerine olmuştur. Laktik asit bakteri inokulantları ile yapılan birçok çalışmada inokulant kullanımıyla KM kayıplarının ortalama olarak mısır silajlarında %1-2, baklagil ve çayır otu silajlarında ise %2-3 düzeyinde azaldığı bildirilmiştir (2,50). Silolama esnasında arzu edilmeyen fermentasyon sürecinde KM madde kaybının şekillenmesinin başlıca nedeni, karbondioksit oluşumundan kaynaklanmaktadır. Karbondioksit oluşumuna bağlı olarak

karbon atomu kaybı şekillenmekte dolayısıyla KM kaybına sebep olmaktadır (48). Bakteriyel inokulant ilavesiyle hazırlanan silajlarda enerji değerleri inokulant katkısından etkilenmez. Silaj fermentasyonu sırasında etanol gibi yüksek enerji değerine sahip bileşiklerin meydana gelmesinden dolayı elde edilen silaj, silaj materyalinden daha yüksek brüt enerji değerine sahip olabilir (3). Homofermantatif LAB daha az enerji kaybı ile 1 mol glukozdan 2 mol laktik asit oluştururken, heterofermantatif LAB'nde laktik asit üretimi 1 mole düşer ve bu olaydaki enerji kaybı daha yüksek olmaktadır (53). Bakteri inokulantlarında bulunan LAB silajdaki protein ve aminoasitleri fermente etmezler. İnokulant kullanımıyla silaj pH'sında sağlanan hızlı düşüş aminoasitleri fermente eden mikroorganizma ve bitki proteazlarının aktivitelerini baskılayarak gerçek proteinlerin bir kısmının korunmasını ve silajda NH₃-N konsantrasyonunun azalmasını sağlar (2,54). Laktik asit bakterileri bitki hücre duvarı polisakkaritlerini hidrolize edemediklerinden silajın lif içeriği inokulant kullanımından etkilenmez. İnokulant kullanımıyla silajın lif içeriğindeki azalma düşük pH'da hemiselülozun asitle hidrolizinden kaynaklanmaktadır. Hemiselülozik aktivite sadece çayır silajlarında önemli olup, çayır silajlarının NDF içeriğini %1-2 azaltabilir (2,3,48). LAB inokulantlarının enzimlerle (sellülaz, hemisellülaz, pentozanaz, amilaz) kombinasyon halinde kullanıldığı çalışmada silajın NDF ve ADF değerlerini düşürdüğü görülmüştür (55). Ticari LAB inokulantı ilave edilen silajlarda KM ve organik madde sindirilebilirliği artarken (55), bazılarında ise inokulant ilavesinden etkilenmemiştir (56). Ticari LAB inokulantı katılarak hazırlanan silajlarda oluşan başlıca fermentasyon ürünü laktik asit olup, laktik asitin rumende fermente olup ruminatlarca değerlendirilmesi sonucu, silajların KM ve organik madde sindirilebilirliklerinin arttığı bildirilmektedir (55). Silaj açıldığında silo içerisindeki anaerobik koşullar aerobik koşullara dönüşmektedir. Aerobik koşullar altında, silajın açılmadan öncesi şartlarda aktif durumda olmayan mikroorganizmalar çoğalmaya başlar. Bu süreçte şekillenen bozulmaya "aerobik bozulma" adı verilir. Silaj hazırlanmasında LAB inokulantı kullanımının, aerobik bozulmaya karşı etkilerini inceleyen çalışmalardan elde edilen bulgular arasında uyum görülmemiştir. Ticari LAB inokulantı kullanımının aerobik bozulmaya karşı herhangi bir etki göstermediği yönündeki bildirimlerin (57) yanı sıra, inokulant kullanımının aerobik bozulmayı kolaylaştırdığı doğrultusunda çalışmalara da rastlanmıştır (58). Yapılan çalışmalarda farklı bitkilerden yapılmış silajların aerobik

bozulmaya olan dirençleri bakımından farklı özellikler taşıdığını ortaya koymaktadır (9). Yüksek düzeyde SÇK içeriğine sahip bitkilerden elde edilen silajların aerobik bozulmaya karşı daha duyarlı oldukları bildirilmektedir (59). Aerobik bozulmadan sorumlu başlıca mikroorganizma grubu maya ve küfler olup söz konusu mikroorganizmalar ortamdaki SÇK'lar ile laktik ve asetik asit gibi fermentasyon ürünlerini kullanarak KM ve besin madde kayıplarına neden olurlar. Bunun sonucunda silo içerisinde karbondioksit ve su açığa çıkar, sıcaklık artar (55,60). Silajların yedirilmek üzere açıldığı ve tamamen sınırsız bir şekilde hava girişine maruz kaldıkları dönemde, silajlardaki yoğun karbondioksit üretimi ve pH seviyesindeki artış ile maya ve küf populasyonlarındaki artışın aerobik bozulmanın bir göstergesi olduğunu ve ayrıca fermentasyon sırasında oluşan yüksek düzeydeki laktik asit ve fermentasyon sonrasında kullanılmadan kalan SÇK varlığının silajların aerobik stabiliteğini düşürdüğü bildirilmiştir (61). İnokulant kullanımının silajın aerobik stabilitesi üzerine etkisinin incelendiği çalışmaların çoğunda aerobik stabilite homolaktik LAB ilavesinden olumsuz etkilenmiştir (55). Silajda mayaların gelişimi asetik, propiyonik ve bütirik asitler gibi uçucu yağ asitlerince baskılanır ve baskılanmanın derecesi düşük pH değerlerinde artar. Silajda uçucu yağ asidi değerinin azalmasına bağlı olarak silajın aerobik stabilitesi düşmektedir. Silaj hazırlanmasında LAB inokulantı kullanımına bağlı olarak fermentasyon sonrasında silo içerisinde daha fazla SÇK kalmaktadır. Silajın aerobik bozulmasına neden olan mikroorganizmaların çoğu aktiviteleri için fermentasyon ürünlerinden ziyade SÇK'ları substrat olarak kullandıklarından LAB inokulantı kullanılan silajların aerobik stabilite değerlerinin düşük olacağı düşünülmektedir. Sonuç olarak bakteriyel inokulant kullanımıyla, fermentasyon sonucunda oluşan pH, laktik asit, asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit ve karbonhidrat değerlerindeki değişime göre silajın aerobik stabilite değerleri artabilir ya da azalabilir (2,48,54). Silajın aerobik stabilitesini artırmak amacıyla homofermantatif LAB grubunda olmayan bazı mikroorganizmalar da silaj inokulantlarında kullanılmaktadır. Bu amaçla heterofermantatif özellikte olan *Propionibacteria* grubu mikroorganizmalar glikoz ve laktik asiti, laktik asitten daha fazla antifungal etki gösteren asetik ve propiyonik asitlere dönüştürmek amacıyla kullanılmaktadır. Ancak, *Propionibacteria* türünün silaj inokulantlarında katkı olarak kullanılmasıyla karbondioksit üretimi dolayısıyla KM kayıplarına neden olmaları ve proteolitik aktiviteye sahip olduklarından

bazı dezavantajları bulunmaktadır. Silajın aerobik stabilitesini artırmada potansiyel değer taşıyan bir diğer mikroorganizma heterolaktik LAB olan *Lactobacillus buchneri*'dir. *Lactobacillus buchneri*'nin silajda asetik asit ve propiyonik asit miktarını arttırarak aerobik stabilite değerlerini yükselttiği bildirilmektedir (7). Heterolaktik LAB'nin kullanımıyla silajın aerobik stabilitesindeki artışla beraber, KM kayıpları ve asetik asit miktarının yükselmesine bağlı olarak silaj tüketiminin olumsuz etkilendiği bildirilmektedir. Bununla beraber, *Lb. buchneri* ile son yıllarda yapılan çalışmalarda KM kayıplarının az olduğu ve hayvan performansının olumsuz etkilenmediği de bildirilmektedir (48,62,63). Homolaktik LAB olan *Enterococcus faecium*'un pH'nın 5.0'in üstünde olduğu durumlarda hızla üreyerek fermentasyonun başlangıcında laktik asit üretebildiği, bu etkiye bağlı olarak proteolitik aktivitenin ve küf oluşumunun azaldığı bildirilmiştir (37).

Laktik Asit Bakteri İnokulantlarının Silaj Fermentasyonunda Etkisiz Olma Nedenleri

Yapılan bazı çalışmalarda silaj katkısı olarak LAB inokulantlarının kullanımının silaj fermentasyonu üzerine olumlu bir etki göstermediği bildirilmiştir (2,48). İnokulant kullanımıyla silaj fermentasyonunda gelişme görülmemesinin muhtemel sebeplerinden biri, hasat esnasında silaj yapılacak materyaldeki doğal LAB popülasyonunun çeşitliliği ve sayısıdır. Biçim öncesi silajlık bitki üzerindeki aktif bakteri sayısının silaj yapılacak taze bitkinin gramında 10^1 ile 10^6 kob aralığında değiştiği bildirilmektedir (49). İnokulant katkısının silaj fermentasyonunda etkili olabilmesi için uygulanan inokulant dozunun silaj yapılacak bitki üzerinde bulunan doğal LAB sayısının en az %10'u düzeyinde olması gerekmektedir (64). Genel itibariyle inokulantların baklagil ve çayır silajlarına kıyasla mısır silajında daha az etkili olmasının muhtemel sebebinin, mısır bitkisindeki doğal LAB popülasyonun, yonca bitkisinden 10 kat daha yüksek olması dolayısıyla silaja ilave edilen LAB inokulantının bitki üzerinde bulunan doğal bakterilerini baskılayıp bu bakterilerin etki göstermesini engellemelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Laktik asit bakteri inokulantlarının silaj fermentasyonunda etkisiz olmasının diğer bir sebebi ise doğal LAB'nin inokulant kaynaklı LAB'ne benzer şekilde fermentasyonu etkilemesi olarak açıklanmaktadır. Mısır bitkisinden yapılan silajlardaki doğal fermentasyonda, normal bir süreç olarak yüksek laktik asit ve düşük asetik asit oluşumuna bağlı olarak silaj pH değerinin düşük

olması (3.8-3.9), mısır silajı için zaten iyi gelişen doğal fermentasyon sürecinde inokulantların önemli gelişmeler göstermesini güçleştirmektedir (50). İnokulantların silaj fermentasyonunda etkisiz olmalarının bir başka sebebi ise, inokulant katılan silaj materyalinin SÇK içeriğinin düşük olmasıdır. Suda çözünebilir karbonhidratlar, LAB'nin başlıca substratı olup, SÇK değerinin düşük olması silolamanın erken dönemlerinde pH değerini düşürmeye yeterli olsa bile silolamanın sonraki aşamalarında LAB'nin faaliyetleri için yeterli olmayacağından, SÇK içeriğinin düşük olması LAB inokulantlarının silaj kalitesi üzerine olumlu etkisini engelleyebilir (2,54). Yonca gibi SÇK içeriği düşük olan silaj materyallerinde istenen yönde fermentasyon oluşturmak ve pH değerinin azalmasını sağlamak için LAB diğer mikroorganizmalarla mücadeleye gireceklerinden, yonca gibi bitkilerden hazırlanan silajlarda LAB inokulantlarının etkisi sınırlı olmaktadır (65). Silaj hazırlanmasında, LAB inokulantı kullanılmadığı durumlarda istenen yönde fermentasyonun gelişimi için gerekli olan SÇK içeriğinin taze materyalin %3'ü, LAB inokulantı kullanıldığı durumlarda ise inokulant kaynaklı LAB'nin ortamda bulunan SÇK'ları daha etkin bir şekilde kullanmalarından dolayı SÇK içeriğinin taze materyalde %2 düzeyinde olmasının yeterli olduğu bildirilmiştir (54).

2. 5. 2. Fermente Edilmiş Laktik Asit Bakteri Sıvısı

Ticari LAB inokulantlarına alternatif olarak son zamanlarda geliştirilmiş ve fermente edilmiş LAB sıvısı olarak adlandırılan, yeni bir silaj katkı maddesi önem kazanmaya başlamıştır. Fermente edilmiş LAB sıvısı; silaj katkı maddesi olarak biyolojik kökenli olması, hazırlanmasının ve kullanımının oldukça kolay ve ekonomik olması, güvenli olması, toksik etkisinin olmaması, silaj yapımında kullanılan makinelerde korozyona sebep olmaması, çevre kirliliği yaratmaması ve doğal ürün olmaları gibi önemli avantajlara sahiptir (66). Yonca bitkisinden hazırlanan fermente edilmiş LAB sıvılarında yapılan tür tespitinde, *Lactobacillus plantarum*'un baskın tür olduğu ve izole edilen LAB'nin %90'dan daha fazlasının homofermentatif yapıda olduğu bildirilmiştir (67). Denek ve ark. (68) tarafından yapılmış bir çalışmada; arpa, buğday ve çayır otundan elde edilen taze yada dondurulmuş fermente edilmiş LAB sıvılarının pH değerlerinin; 3.75-3.86; LAB içeriklerinin ise 1.4×10^7 - 6.0×10^8 kob/ml arasında olduğu bildirilmiştir. Yonca bitkisine fermente edilmiş LAB sıvısı ilavesi ile

elde edilen silajların besin madde içeriği, fermentasyon kalitesi, *in vitro* sindirilebilirlik ve metabolik enerji değerlerinin arttığı bildirilmiştir (69).

Silaj yapımı sırasında silajlık materyale fermente edilmiş LAB sıvısı ilavesinin, özellikle düşük KM içeriğine (%30 ve altındaki) sahip bitkilerden yapılan silajlarda daha etkili olduğu, ayrıca kolay eriyebilir karbonhidrat kaynakları gibi katkı maddeleriyle beraber kullanmanın, fermente edilmiş LAB sıvılarının etkinliğini daha da arttırdığı bildirilmiştir (70). Bazı çalışmalarda ticari LAB inokulantlarının etkisiz olduğu durumlarda bile fermente edilmiş LAB sıvısının silaj pH değerini düşürmek suretiyle, silaj laktik asit ve *in vitro* organik sindirilebilirlik değerlerini arttırıp, NH₃-N ve bütirik asit değerlerini düşürdüğü yönünde bildirimler bulunmaktadır (71). Fermente edilmiş LAB sıvısının ticari LAB inokulantlarına göre silajı daha iyi korumasının muhtemel sebebinin, fermente edilmiş LAB sıvısının içeriğinde farklı türlerde LAB bulunmasından kaynaklanabileceği bildirilmektedir (72). Silaj katkı maddesi olarak fermente edilmiş LAB sıvısı kullanımı, silajın yapısında bulunan proteinleri aşırı yıkımlanmadan koruduğu ve LAB yoğunluğunun bir sonucu olarak silaj pH değerini azaltarak *Clostridiyal* aktiviteyi engellediği bildirilmiştir (73). Farklı bitkilerin üzerlerinde taşıdıkları LAB sayısı ve türünün farklı olabileceği varsayımından hareketle, silaj materyali ile aynı bitkiden hazırlanan fermente edilmiş LAB sıvılarının silaj kalitesini arttırmada daha etkili olabileceği bildirilmiştir (72,74,75).

2. 6. Laktik Asit Bakterileri Koruma Yöntemleri

Silaj katkısı olarak kullanılan LAB inokulantlarının muhafazasında; kısa süreli muhafaza yöntemleri (basit yöntemler) ve uzun süreli muhafaza yöntemleri (modern yöntemler) kullanılmaktadır. Kısa süreli muhafaza yöntemleri arasında transfer, sıvı parafin altında muhafaza, damıtık su içinde muhafaza ve kurutma yöntemleri bulunurken; uzun süreli koruma yöntemleri arasında liyofilizasyon ve derin dondurucuda muhafaza yöntemleri ön plana çıkmaktadır. Günümüzde gerek silaj katkısı olarak kullanılan ticari LAB inokulantlarının, gerekse mikrobiyoloji alanında kullanılan mikroorganizmaların korunmasında uzun süreli kurutma tekniklerinden liyofilizasyon ve derin dondurucuda muhafaza işlemleri tercih edilmektedir (76).

2. 6. 1. Liyofilizasyon İşlemi ile Laktik Asit Bakterilerinin Korunması

Liyofilizasyon, biyolojik kaynaklı, yüksek nem içeriğine sahip materyallerin ya da sulu çözeltilerin çok düşük basınç altında liyofilize edilecek materyaldeki donmuş serbest su taneciklerinin süblimasyonla uygun koşullar oluşturularak uzaklaştırılması (desorpsiyon) ile yapılan kurutma işlemidir (77). Mikroorganizmalardan birçok bakteri, maya, küf, virüs, bazı algler ve bazı protozoaların yanı sıra pek çok aşı, enzim, protein, eritrosit, spermatozoa, organ naklinde kullanılmak üzere kornea, serum plazma, diğer biyolojik materyal ve gıdalar liyofilizasyon tekniği ile kurutularak korunabilmektedir (78,79).

Liyofilizasyon işleminin temeli süblimleşme olup, süblimasyon bir maddedeki donmuş suyun erime olmaksızın maddenin sıvı hali atlanarak doğrudan buhar fazına geçmesi işlemidir (80). Liyofilize edilerek kurutma işleminde liyofilize edilecek materyal dondurulur ve daha sonra düşük nisbi neme sahip bir atmosfere maruz bırakılarak oluşan buz kristallerinin süblimasyonu sağlanır. Liyofilizasyon sonrası oluşan gözenekli kek görünümlü liyofilize ürün, vakum altında kurutulur ve raf ömrünün uzun olması amacıyla oksijensiz ve nemsiz ortamda ambalajlanarak depolanır. Liyofilizasyon işlemi sonrası elde edilen liyofilize ürün; liyofilizasyon öncesi şekle ve boyutlara sahiptir. Liyofilize edilmiş ürün kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında aylarca hatta yıllarca depolanabilir. Liyofilize edilerek kurutulmuş materyale tekrar su ilave edildiğinde, büzülmüş ve gözenekli yapısı sayesinde su alarak (rehidrasyon), kurutma öncesi yapısına çok yakın bir yapıya ulaşır (81,82).

Liyofilizasyon işlemi yavaş ve pahalı bir yöntem olmasına rağmen (83) diğer yöntemlerle kıyaslandığında kaliteli ürün elde edilmektedir (84). Liyofilizasyon işlemi ile elde edilen ürünün raf ömrünün uzaması, ağırlığının azalması, depolama alanından tasarruf edilmesi ve soğuk ortamda saklamaya gerek kalmadan oda sıcaklığında muhafaza edilebilmesi gibi avantajları bulunmaktadır (85). Buna karşın liyofilizasyon işleminin pahalı olması, enerji giderlerinin yüksek olması ve işlemin uzun sürmesi gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır.

Liyofilizasyon işleminde mikrobiyal canlılık ve aktiviteyi etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler; bakterinin cinsi, türü, suşu, yaşı, bulunduğu besi yeri ortamı, liyofilize işlem öncesi hücre yoğunluğu, kullanılan koruyucu ortamın

bileşimi, liyofilizasyon sonrası kültürün korunduğu atmosfer (vakum, inert gazlar vb.), kültürde kalan nem miktarı, depolama koşulları (sıcaklık, süre, ışık), sulandırmada kullanılan çözeltinin bileşimi ve sıcaklığı olarak sıralanabilir. Bunların dışında liyofilizasyonda kullanılan sistem, ön dondurma sıcaklığı vb. faktörlerin de mikrobiyal canlılık ve aktivite üzerinde etkili olduğu bilinmektedir.

Genel hatlarıyla liyofilizasyon işlemi; ön dondurma safhası, birincil kurutma safhası (süblimasyon) ve ikincil kurutma safhası (dezorpsiyon) aşamalardan oluşan üç temel evreden oluşmaktadır.

Ön dondurma safhasında liyofilize edilecek hücredeki metabolizma hızı ve bunun sonucu olarak da biyokimyasal reaksiyonlar çok yavaşlar. Liyofilizasyon işleminin ön dondurma aşamasında hücrelerin düşük sıcaklıklarda dondurulması işlemi imkânlar ölçüsünde çabuk yapılmalıdır. Ani dondurma ile hücre içinde büyük buz kristalleri oluşmaz, dolayısıyla hücre daha az zarar görür. Dondurma işlemi yavaş olduğunda, buz kristalleri büyük olur ve bu kristaller hücre arası boşluklarda bulunur. Bu durum hücre içi sıvısının dışarı çıkmasına ve hücre duvarının hasar görmesine neden olur. Liyofilizasyon işlemi öncesi yapılacak ön dondurma işleminin mikrobiyal canlılığın artışında önemli olduğu belirtilmiştir (86,87). Ön dondurma işleminin sonunda, başlangıçta liyofize edilen üründe bulunan suyun %65-90'ı donmuş, geri kalan %10-35'lik kısmı ise bağlı su (donmamış su) olarak kalır. Liyofilize edilecek materyal yeteri kadar donmadan yüksek vakum uygulandığında liyofilizasyon işlemi sırasında köpürme oluşur ve liyofilize edilecek materyal bulunduğu liyofilizasyon şişelerinden taşarak dışarı çıkar. Bu sorun kullanılan liyofilizatörün özelliğine bağlı olarak materyalin önce -40 °C'de dondurulması ve sonrasında vakum sistemine bağlanmasıyla çözülebilir (88).

Liyofilizasyon işleminin birincil kurutma aşamasında liyofilizasyon kabininde liyofilize edilecek materyale hafif bir vakum uygulanır ve ortamdaki sıcaklığın azalmasına bağlı olarak yüksek enerji halindeki moleküller liyofilize edilecek materyalden kendiliklerinden dışarı çıkarlar. Birincil kurutma aşamasında donmuş materyalin tümündeki buz kendiliğinden buharlaşamaz, ancak donmuş arayüz sürekli olarak dıştaki kuru kısma doğru hareket eder. Birincil kurutma aşaması oldukça uzun sürmektedir. Pınarkara (89)'nın yaptığı bir çalışmada bazı LAB'nin liyofilizasyon

işleminde birincil kurutma safhasının 15 saatte tamamlandığını bildirmektedir. Ancak bu süre liyofilize edilecek sıvının hacmine bağlı olarak uzayabilmektedir.

Liyofilizasyon işleminin birincil kurutma aşamasında, su buharının liyofilize edilen materyalden sürekli olarak uzaklaştırılmasını sağlayacak şartları oluşturmak için su buharı, liyofilizasyon cihazının kurutma hücrelerinden yoğunlaştırıcıya doğru vakum vasıtası ile sürekli şekilde taşınır. Böylece cihazdaki kurutma ünitesinin buhar basıncı, çözücünün süblimasyonunu sağlayacak şekilde düşük tutulur. Su molekülleri süblime olurken çok yüksek süblimasyon ısısı (2840 kJ/kg) kurutulacak materyalden alınırken, donmuş tabakanın sıcaklığı da düşmektedir (81). Liyofilize edilen ürünlerdeki süblimasyon oranı kısa bir süre içerisinde hızlı bir şekilde artar. Süblimasyon sonucu kuruyan ve hala donmuş halde olan tabaka arasında bir ara yüzey meydana gelir. Kuruyan alandaki gözenekler buhar akışına karşı direnç oluşturur. Bu direnç süblimasyon oranını azaltır ve zamanla “0”a yaklaşır. Serbest suyun tamamen süblimasyonu ile birincil kurutma periyodu liyofilize edilecek ürünlerdeki nem içeriğinin %7-8 olduğu aşamada tamamlanmış olur (85).

Liyofilizasyonla kurutma sistemlerinde, kurutulacak madde içerisindeki bütün donmuş çözücünün süblimasyonla uzaklaştırıldığı an (birincil kurutma safhasının sonu) ikincil kurutma safhasının başlangıcı olarak kabul edilir. Böylece ikincil kurutma safhası boyunca kurutulacak maddeden yalnızca bağlı haldeki su uzaklaştırılır. İkincil kurutma safhası; fiziksel adsorpsiyon, kimyasal adsorpsiyon ve kristalizasyon suyu olarak bulunan bağlı suyun desorpsiyonla uzaklaştırılması işlemidir (90). Liyofilizasyon ile kurutma işleminin en son aşaması olan ikincil kurutma safhasında liyofilize edilecek materyaldeki nem içeriğinin kabul edilebilir değere ulaşmaya kadar cihazdaki vakum maksimum seviyeye çıkarılır. İyi bir liyofilizasyon döngüsü bitiminde kurutma sonrası nihai ürünün nem değeri %1-2 düzeylerinde olmalıdır. Fakat liyofilize edilen ürüne göre bu değer daha yüksek de tutulabilir.

Liyofilizasyon yöntemi ile mikroorganizmaların kurutma işlemlerinde bazı bakteri türlerinde canlılığın uzun süre yüksek oranda kalmasını sağlarken, bazı türlerde liyofilizasyon işleminin bakterinin canlı kalmasında etkili olmadığı saptanmıştır (91). *St. faecalis* ve *St. bovis* gibi *Thermophilic streptococci* türü mikroorganizmalar liyofilizasyon işlemi ile kurutmaya karşı nispeten dirençli iken, *Lb. bulgaricus* ise en duyarlı LAB türleri arasındadır (92).

Liyofilizasyonun ilk aşaması olan dondurulma sürecinde hücrenin yapısında bulunan su, buz kristallerine dönüşüp hücre zarını parçalayarak hücreye zarar verebilir. Hücrenin kurutulma aşamasında ise hücre zarları büzülüp birbirlerine yapışırlar. Liyofilize edilen ürünlerin liyofilizasyonun aşamalarından olan ön dondurma işleminden geçmesi sürecinde hücre üzerindeki meydana gelecek zararların minimuma indirilmesi için kriyojenik etkili maddelerden faydalanılmalıdır. Mikroorganizmaların liyofilize edilerek kurutulması ile elde edilecek ürünlerde canlılık ve aktivite üzerine en önemli etkiyi kriyojenik katkıların yaptığı, bu konudaki hemen hemen tüm araştırmalarda önemle vurgulanmakta ve araştırmacılar farklı özelliklerde kryoprotektanlar önermektedirler (89). Liyofilize edilen bakteriler oksijene karşı duyarlı olup, genel olarak vakum altında depolanmaları tavsiye edilmektedir. Sodyum glutamat, liyofilizasyon işleminde oksijenin toksik etkisine karşı hücreleri koruyabilmektedir. Liyofilize edilen ürünün ambalajının su ve nem geçirmez olması önemli olup, ambalajın içinde oksijen bulunmaması liyofilize ürünün daha uzun süre raf ömrüne sahip olmasını sağlamaktadır. Liyofilize edilmiş kültürlerde 6 aydan fazla depolama süresinin kültürlerde önemli ölçüde aktivite azalmasına sebep olduğu belirlenmiştir (93).

2. 6. 2. Dondurma İşlemi ile Laktik Asit Bakterilerinin Korunması

Bakteriyel kültürler liyofilize edilebildikleri gibi dondurulmuş olarak da muhafaza edilebilirler. Dondurulmuş kültürler uygun şartlarda muhafaza edildiklerinde depolama süresince canlılıklarını devam ettirirler. Optimum şartlar altında muhafaza edildiklerinde yıllarca canlı kalabilir.

Mikroorganizmaların dondurulma işlemi uygulanan sıcaklık derecelerine göre; basit dondurma, derin dondurucuda dondurma ve ultra dondurma olarak sınıflandırılabilir. Dondurma yöntemleri basit laboratuvarlardan en gelişmiş kültür koleksiyonlarına kadar tümünde uygulanabilen bir mikrobiyal kültür muhafaza yöntemi olup, sıcaklık derecesi ne denli düşük olursa, kültürün korunmasında o kadar etkinlik sağlanmakta, buna karşın yatırım ve sistemin uygulanma maliyetlerine ek olarak özel deneyim ve tecrübe ihtiyacı da artmaktadır. Basit dondurma işlemi, dondurulacak kültürün bir buzdolabının buzluğunda (-10 ile -20 °C) dondurulma işlemidir. Derin dondurucuda dondurma işlemi, kültürlerin derin dondurucularda (-40 ile -80 °C)

korunmasıdır. Ultra dondurma işleminde ise sıvı azotun buhar fazında -140 °C’de veya sıvı azot içerisinde -196 °C’de kültürün korunmasıdır.

Yapılan çalışmalarda -30 °C’de derin dondurucuda dondurulmuş ve çeşitli kriyojenik bileşikler (trisodyum sitrat, sodyum-β-gliserofosfat, gliserol, yağsız süt, maya ekstraktı, sükröz, krema, pepton, laktoz gibi) ilave edilen, mezofilik LAB’nin (10^{11} - 10^{12} kob/gr) çok iyi korunduğu belirlenmiştir (94,95). Probiyotik etkili LAB kültürlerinin dondurulmasına yönelik yapılan bir çalışmada; dondurma işlemi sonucu, sıcaklığa ve süspansiyon ortamına bağlı olarak, *Lb. acidophilus*’un %24 ile %89 arasında canlılığını koruduğu bildirilmiştir (86). Aynı çalışmada, *Lb. acidophilus*’un doğrudan -80 °C’de dondurulması sonucu canlılık oranı %42.65 olarak bulunmasına karşın, sıcaklığın yavaş yavaş azaltılması sonucu (sırasıyla 37, 20, -4, -20, -80 °C) yapılan dondurma işleminde canlılığın %74’e çıktığı belirlenmiş, en yüksek hücre ölümünün ise -4 °C ile -20 °C arasında gerçekleştiği gözlenmiştir. Bir başka çalışmada *Lb. rhamnosus*’un 6 suşunun 3 farklı koruyucu ilavesi ile (yağsız süt, yağsız süt+glukoz, MRS besiyeri+gliserol) -20 ve -80 °C’de dondurulması ve 90 günlük depolanması sonucunda, sıcaklık, suş ve süspansiyona bağlı olarak, %84 ile %97 arasında canlılığın korunduğu tespit edilmiştir. Bakteri kültürlerinin -80 °C’de dondurularak saklanması yağsız sütün en iyi koruyucu ajan olduğu bildirilmiştir (87,96). Bakteri kültürlerinin dondurularak muhafazasının dezavantajı ise nakil ve taşınmalarının kuru buz ile yapılması ve bu nedenle nispeten pahalı olmasıdır (97).

Mikroorganizmaların liyofilize edilerek ve dondurularak muhafazasında koruyucu olarak kullanılan maddeler hücre içine girebilmelerine göre 2 ayrı grupta toplanabilir. Gliserol, dimetil sülfoksit (DMSO (Ds)) gibi maddeler hücre içine girerek donma aşamasındaki zararlara karşı mikroorganizmayı hem hücre içinden hem de dışından korurlar. Sakkaroz, laktoz, trehaloz, glikoz sorbitol, pepton mannitol, dekstran, nişasta gibi maddeler ise koruyucu etkilerini sadece hücre dışında gösterirler. Ayrıca yağı alınmış süt, jelatin, malt ekstraktı gibi kompleks besi yerleri de koruyucu özelliktedirler. Trisodyum sitrat (TRİS), pH’nın dengelenmesi ve tamponlama özelliği konusunda etkili bir kimyasal olup toksik etkiye sahip değildir. Liyofilize edilecek ürünün stabilliğini sağlamada tamponlayıcı olarak sodyum sitrat, sodyum fosfat, potasyum fosfat, sodyum hidroksit, trisodyum baz, trisodyum asetat kullanılmaktadır (98).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması 2 deneme halinde yürütülmüştür.

Çalışmanın birinci denemesinde, değişik seviyelerde (%3, %5 ve %10) sükröz katılan ve farklı sürelerde (2, 5 ve 10 gün) inkübasyona bırakılan fermente edilmiş LAB sıvıları hazırlanmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda fermente edilmiş LAB sıvılarına trisodyum sitrat (TRİS (Ts)) ve dimetil sülfoksit (DMSO (Ds)) ilave edilip dondurulan ve liyofilizasyon işlemi ile kurutulan LAB sıvıları bir ve üç ay süre ile depolanmış LAB sayıları belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci denemesinde ise, dondurulmuş ve liyofilize edilmiş LAB sıvılarının bir ve üç ay süre ile depolanmaları sonucunda, her bir depolama süresi için en yüksek LAB değerlerine sahip olan dört grup LAB sıvısı, yonca (*Medicago sativa*) bitkisinden hazırlanan silajlara ilave edilerek, yonca silajı kalitesi üzerine etkileri belirlenmiştir. Bu tez çalışması Harran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (HRÜ-HADYEK) 2017/04/10 sayılı kurul kararı doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

3. 1. Birinci Deneme

3. 1. 1. Fermente Edilmiş Laktik Asit Bakteri Sıvısının Hazırlanması

Bu çalışmada fermente edilmiş LAB sıvısının hazırlanmasında kullanılan yonca bitkisi (*Medicago sativa*) 20.03.2018 tarihinde Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde bulunan yonca üretim tarlasından temin edilmiştir. Fermente edilmiş LAB sıvısı temelinde Masuko ve ark. (99)'nın bildirdiği yöntemle hazırlanmış, ancak mikrobiyal yoğunluğu arttırmak amacıyla kullanılan saf su miktarı azaltılmıştır. Bu amaçla, 3000 gr taze yonca bitkisine 1000 ml saf su eklenerek elde edilen karışım karıştırıcı yardımıyla 2 dakika süre ile parçalanmıştır. İşlem sonrası elde edilen bitki sıvı karışımı iki kat tülbent bezinden süzülmüştür. Süzüntü, vida kapaklı 50 ml'lik steril plastik falkon tüplerine aktarılarak; katkısız, %3, %5 ve %10 sükröz ilave edilen gruplar oluşturulmuştur. Katkısız, %3, %5 ve %10 sükröz ilave edilen gruplar 2, 5 ve 10 günlük süre ile anaerobik koşullarda 30 °C'de inkübasyona bırakılmış, her bir inkübasyon süresi sonrasında fermente olmuş LAB yoğunluğunu arttırmak amacıyla falkon tüpleri

2000 rpm'de 4 dakika süre ile santrüfjü edilmiş, santrüfjü sonrası üstte kalan sıvı kısım %20 oranında uzaklaştırılmıştır. Her bir inkübasyon süresi sonunda liyofilizasyon ve dondurulma işlemleri için özel üretilmiş 10 ml hacimli steril şişelere 1'er ml fermente edilmiş LAB sıvısı konmuştur. Katkısız gruplara herhangi bir kryoprotektan madde ilave edilmemiş, TRİS (Ts) gruplarına %50'lik TRİS (Ts) çözeltisinden %20 oranında (v/v), DMSO (Ds) gruplarına ise %0.1 oranında (v/v) DMSO (Ds) ilave edilerek liyofilizasyonla kurutma ve derin dondurucuda dondurulma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Böylece her bir inkübasyon süresi (2, 5 ve 10 gün) için katkısız, %3, %5 ve %10 sükröz ilaveli gruplara TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) ilave edilerek liyofilizasyon ve derin dondurucu grupları oluşturulmuştur.



Şekil 3.1. Fermente Edilmiş Laktik Asit Bakteri Sıvılarının Fermentasyona Hazırlanması.



Şekil 3.2. Fermente Edilmiş Laktik Asit Bakteri Sıvılarının Fermentasyon Öncesi ve Sonrası.

3. 1. 2. Liyofilizasyon İşlemi

Birinci deneme kapsamında katkısız ve farklı seviyelerde sükröz (%3, %5 ve %10) ilavesi ve farklı sürelerde (2, 5 ve 10 gün) inkübasyona bırakılarak elde edilen LAB sıvılarına aseptik şartlarda %50'lik TRİS (Ts) çözeltisinden %20 (v/v) ve %0.1 oranında (v/v) DMSO (Ds) kroyoprotektanları ilave edilmiştir. Bu amaçla TRİS (TS) ve

(DMSO (Ds)) ilave edilmiş LAB sıvıları 10 ml ölçekli steril özel liyofilizasyon şişelerine 15 tekerrür olacak şekilde 1'er ml konarak liyofilizasyon şişelerinin yarıklı tıpları liyofilizasyon işlemine olanak sağlayacak şekilde yarım kapatılmıştır.



Şekil 3.3. Fermente Edilmiş Laktik Asit Bakteri Sıvılarının Fermentasyon Sonrası Liyofilizasyon Şişelerine Doldurulması.

Liyofilizasyon işleminin ilk aşamasında (ön dondurma safhası) liyofilizasyon şişeleri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat dondurulmuş ve liyofilizasyon işlemi başlamadan bir saat önce çalıştırılan liyofilizasyon cihazına (Scanvac Coolsafe 55-4) sıvı azot buharı altında nakledilerek liyofilizasyon cihazının raflarına yerleştirilmiştir. Liyofilizasyon cihazının vakum pompası çalıştırılarak liyofilizasyon işlemi başlatılmış ve birincil kurutma safhası 30 saat sürdürülmüştür. Liyofilizasyon işleminin bitiminde liyofilizasyon cihazına önceden adapte edilen mekanizma sayesinde liyofilizasyon şişelerinin yarıklı kapakları sistem hava almadan kapatılmıştır. Liyofilizasyon işleminin tamamlanmasından sonra her bir sükröz seviyesi, inkübasyon süresi ile katkısız, DMSO (Ds) ve TRİS (Ts) katkılı gruplar için liyofilize edilmiş LAB sıvılarının nem içerikleri

her bir grup için 3 tekerrür olacak şekilde belirlenmiştir. Liyofilize edilen ürünler depolama aşamasında buzdolabında +4 °C’de bir ve üç ay muhafaza edilmişlerdir.



Şekil 3.4. Fermente Edilmiş Laktik Asit Bakteri Sıvılarının Liyofilize Edilmeleri.

3. 1. 3. Dondurma İşlemi

Birinci deneme kapsamında katkısız ve farklı seviyelerde sükröz (%3, %5 ve %10) ilavesi ve farklı sürelerde (2, 5 ve 10 gün) inkübasyona bırakılarak elde edilen LAB sıvılarına aseptik şartlarda %50'lik TRİS (Ts) çözeltisinden %20 (v/v) ve %0.1 oranında (v/v) DMSO (Ds) kroyoprotektanları ilave edilmiştir. Laktik asit bakteri sıvıları 10 ml'lik steril özel aşı şişelerine 15 tekerrür olacak şekilde 1'er ml konmuş ve şişelerin tıparları kapatılmıştır. Dondurulma aşaması öncesinde kapakları kapalı olan şişelerinin içerisinde kalan hava, vakum motoru yardımıyla alınmıştır. Vakumlanmış LAB sıvılarını içeren şişeler depolama aşamasında -21 °C'de derin dondurucuda bir ve üç ay süreyle muhafaza edilmişlerdir.

3. 1. 4. Laktik Asit Bakterisi Sayımı

İnkübasyon öncesi, inkübasyon sonrası, bir ve üç ay süre ile depolama sonrası elde edilen fermente edilmiş LAB sıvılarının LAB sayımı, Tempo otomatik bakteri sayım cihazı test yöntemine göre her bir grup için 3 tekerrür olacak şekilde yapılmıştır. Bu amaçla Tempo LAB cihazı (bioMerieux, Marcy l'Etoile France) kullanılarak LAB sayımı için önerilen metot (REF-80 071) kapsamında gerçekleştirilmiştir. Fermente edilmiş LAB sıvılarına 1'e 9 oranında MRD (Maximum Recovery Diluent) zenginleştirme solüsyonu ilave edilerek aseptik koşullar altında stomacher yardımıyla homojenizasyon sağlanmıştır. Analizden 20 dakika önce 3.9 ml steril saf su eklenerek vortekslenen hazır Tempo LAB besiyeri şişelerine, MRD zenginleştirme solüsyonu içerisinde homojenize edilen fermente edilmiş LAB sıvılarından 0.1 ml ilave edilmiş ve Tempo LAB besiyeri şişeleri tekrar vortekslenmiştir. Besiyeri şişeleri ve besiyerine ait inkübasyon kartları dolun için Tempo Filler cihazına yerleştirilmiş, dolun sonrası Tempo Filler cihazından alınan kartlar 30 °C'de 40-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonrasında, mikrobiyal yoğunluğu tespit etmek amacıyla inkübatörden çıkarılan kartlar, Tempo Reader cihazına verilmiş ve sonuçlar kob/ml olarak cihaz tarafından sayılmıştır.

3. 2. İkinci Deneme

Çalışmanın ikinci denemesi, birinci deneme kapsamında hazırlanarak dondurularak ve liyofilize edilerek bir ve üç ay boyunca depolanan LAB sıvılarının her bir depolama süresi sonunda öncelikle mikroorganizma içeriklerinin belirlenmesi ve en yüksek LAB içeriğine sahip olan grupların yonca bitkisinden hazırlanan silajlara ilave edilmelerini kapsamaktadır.

Bu kapsamda bir aylık depolama süresi sonunda, kontrol grubuna ilaveten en yüksek LAB içeriğine sahip %5 süzkroz ilavesi ile 2 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı liyofilize (2G%5STsL); %10 süzkroz ilavesi ile 2 gün inkübasyon sonrasında DMSO (Ds) katkılı liyofilize (2G%10SDsL); %10 süzkroz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında DMSO (Ds) katkılı liyofilize (5G%10SDsL) ve %5 süzkroz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı derin dondurucu (5G%5STsDD) grupları muamele grubu silajlar olarak hazırlanmıştır. Üç aylık depolama süresi sonunda ise kontrol grubuna ilaveten en yüksek LAB içeriğine sahip %5 süzkroz ilavesi ile 2 gün inkübasyon sonrasında DMSO (Ds) katkılı liyofilize (2G%5SDsL); %5 süzkroz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı liyofilize (5G%5STsL); %10 süzkroz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı liyofilize (5G%10STsL) ve %10 süzkroz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı derin dondurucu (5G%10STsDD) grupları muamele grubu silajlar olarak hazırlanmıştır.

3. 2. 1. Liyofilize Edilen ve Derin Dondurucuda Dondurulan Fermente Edilmiş LAB Sıvılarının Aktifleştirilmesi

İkinci deneme kapsamında bir ve üç ay süre ile depolanarak muhafaza edilmiş katkısız, liyofilize edilerek kurutulan ve derin dondurucuda dondurulmuş LAB sıvılarından, liyofilize edilen gruplar 1 ml saf su ilave edilerek oda ısısında 3 saat, derin dondurucuda dondurulan gruplar ise saf su ilave edilmeden oda ısısında 3 saat çözünmeye bırakıldıktan sonra mikrobiyolojik analizleri yapılmıştır. Her bir depolama süresi (bir ve üç ay) sonunda LAB analizleri yapılan tüm gruplardan en yüksek LAB içeriğine sahip dört grup LAB sıvısı yonca bitkisinden hazırlanan silajlara ilave edilmiştir. Bu kapsamda bir aylık depolama sonunda yapılan mikrobiyolojik analizler

neticesinde, en yüksek LAB içeriğine sahip; 2G%5STsL, 2G%10SDsL, 5G%10SDsL ve 5G%5STsDD grupları muamele gruplarını, katkısız yonca silajı ise kontrol grubunu oluşturacak şekilde silaj grupları oluşturulmuştur. Üç aylık depolama sonucunda yapılan mikrobiyolojik analiz sonunda ise en yüksek LAB içeriğine sahip 2G%5SDsL, 5G%5STsL, 5G%10STsL ve 5G%10STsDD grupları muamele gruplarını, katkısız yonca silajı ise kontrol grubunu oluşturacak şekilde silaj gruplarını oluşturmuştur.

3. 2. 2. Yonca Silajlarının Hazırlanması ve Muameleler

Bir aylık depolama süresi sonunda hazırlanan silajlarda, silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisi (*Medicago sativa*) ikinci biçim (yabancı otlardan arı olması için) ve çiçeklenmenin %20 olduğu dönemde, üç aylık depolama süresi sonunda hazırlanan silajlarda, silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisi ise beşinci biçim ve çiçeklenmenin %20 olduğu dönemde Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Çiftliğinde yer alan yonca tarlasından biçilerek kullanılmıştır. Çalışmada silaj materyali olarak değerlendirilen yonca bitkisi mini silotrak (Can marka elektrikli mini silaj makinası) yardımı ile 5-7 cm boyutlarında parçalanmıştır. Her bir depolama süresi sonunda hazırlanan silajlar kontrol (katkısız) ve birinci denemenin sonuçlarına bir aylık depolama süresi sonunda (2G%5STsL, 2G%10SDsL, 5G%10SDsL ve 5G%5STsDD); üç aylık depolama süresinde ise (2G%5SDsL, 5G%5STsL, 5G%10STsL ve 5G%10STsDD) en yüksek LAB içeriğine sahip 4'er adet dondurulmuş ve/veya liyofilize edilmiş LAB sıvılarından, taze silaj materyaline 10^5 kob/gr dozunda püskürtülerek hazırlanmıştır. Bu aşamada silaj materyaline ilave edilen LAB sıvılarının homojen şekilde uygulanabilmesi amacıyla LAB sıvıları kilogram taze silaj materyali için 10 ml saf su içerisine ilave edilerek birbirinden bağımsız el spreylere ile püskürtülmüştür. Kontrol (katkısız) grupta ise muamele gruplarındaki KM etkisini homojenize etmek maksadıyla muamele grubuna ilave edilmiş miktarda saf su püskürtülmüştür. Laktik asit bakteri sıvılarının silaj materyaline ilave edilme işleminde çapraz kontaminasyonu önlemek için her bir grup için farklı olarak plastik eldiven ve el spreylere kullanılmıştır. Silajlar kontrol (katkısız) ve her bir muamele grubu için 4 tekerrür olacak şekilde 1,5 litrelik cam kavanozlarda sıkıştırılarak ağızları hava almayacak şekilde silolanmıştır. Böylece her depolama süresi (bir ay ve üç ay) için

20'şer adet kavanoz silaj hazırlanmıştır. Hazırlanan silajlar 60 gün süre ile oda ısısında kavanozların üzeri örtülerek karanlık bir ortamda muhafaza edilmişlerdir.

3. 2. 3. Silaj Kompozisyonunun Belirlenmesi

Kontrol (katkısız) ve LAB sıvıları katkılı hazırlanmış yonca silajları, altmış günlük silolama süresi sonunda açılarak fermente edilmiş LAB sıvısı katkısının yonca silajı kalitesi üzerine etkileri belirlenmiştir. İkinci deneme kapsamında (bir ve üç ay depolama süresi sonunda) hazırlanan silajlar fermentasyon süresi sonunda açılarak kavanozların üst kısmında bulunan 3-5 cm'lik kısmı atıldıktan sonra, homojen olarak alınan 25 g silaj örneği üzerine 100 ml saf su ilave edilerek karıştırıcı yardımı ile 2 dakika süre ile parçalanmış ve elde edilen silaj sıvısının pH değeri hızlı bir şekilde pH metre ölçüm cihazı (Hanna-HI-9813) ile ölçülmüştür (100). Karıştırıcı içerisinde bulunan silaj sıvısı tülbent bezinden süzülerek 10 ml'lik tüplere alınmış, NH₃-N analizi yapılacak örneklerin üzerine %1 (v/v) oranında ml 1N HCl; laktik asit ve uçucu yağ asidi analizi yapılacak örneklerin üzerine ise %25'lik metafosforik asit çözeltisinden %2.5 (v/v) oranında ilave edilerek analizlerin yapılacağı zamana kadar derin dondurucuda (-18 °C) saklanmıştır. Elde edilen silajların toplam azot (TN) içeriğindeki amonyak azotu oranı (NH₃-N/TN, %) değerleri AOAC (101)'nin bildirdiği yöntemle göre; laktik asit ve uçucu yağ asitleri (bütirik, asetik ve propionik asit) konsantrasyonları ise yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak Suzuki ve Lund (102)'un bildirdikleri yöntemle göre yapılmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen silajların aerobik stabilite değerleri Ashbell ve ark. (103)'ün bildirdiği yöntemle göre yapılmıştır. Çalışma kapsamında bir ve üç ay depolama süresi sonunda silajların hazırlanmasında silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisinin; SÇK içeriği Dubois ve ark. (104)'ün, tamponlama kapasitesi ise Playne ve McDonald (105)'in bildirdikleri yöntemle göre belirlenmiştir.

İkinci deneme kapsamında değerlendirilen silajlarının ham besin madde analizlerinde kullanılan kısmı oda ısısında kurutularak laboratuvar değirmeninde (Şimşek Labortechnik) 1 mm elekten geçecek şekilde öğütülmüş ve analizlere hazır hale getirilmişlerdir. Elde edilen silajların ve silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisinin KM, ham kül (HK) ve ham protein (HP) içerikleri AOAC (106)'in bildirdiği

metotla belirlenmiştir. Asit deterjan lif (ADF) ve nötr deterjan lif (NDF) içerikleri ise Van Soest ve ark. (107)'nin bildirdikleri yönteme göre yapılmıştır.

3. 3. İstatistiksel Analizler

Farklı sükroz seviyeleri (%3, %5 ve %10) ilavesi ve farklı inkübasyon süreleri (2, 5 ve 10 gün) sonucunda elde edilen LAB sıvılarına TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) ilavesi ile dondurularak ve liyofilize edilerek bir ve üç ay süre ile depolanmaları sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde 3x3x2x2x2 faktöriyel deneme desenine göre istatistiksel analiz uygulanmıştır. Bu kapsamda sükroz seviyesi, inkübasyon süreleri, kryoprotektan çeşidi ile liyofilizasyon ve derin dondurucuda dondurulma işlemleri ile bir ve üç ay depolama sürelerinin etkileri analiz edilmiştir. İkinci denemede silajlara katılan (bir ve üç ay sonrası) LAB SIVISI gruplarının belirlenmesi amacıyla birinci denemeden elde edilen LAB değerleri Log₁₀ tabanına göre hesaplanarak varyans analizine tabi tutulmuştur. İkinci denemede LAB SIVISI katkısının yonca silajının kalitesi üzerine etkileri varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Denemede elde edilen ortalamalar arasındaki farklılık Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiş (P<0.01), bu amaçla SAS (1989) paket programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4. 1. Birinci Denemenin Bulguları

Bu çalışmanın birinci denemesinde fermente edilmiş LAB sıvılarının hazırlanmasında kullanılan taze yonca bitkisinin (*Medicago sativa*) KM esasına göre KM, HK, HP, ADF ve NDF değerleri sırasıyla; %19.21, %13.19, %31.11, %18.70 ve %29.59; tamponlama kapasitesi 670 meq/kg KM; SÇK içeriği 64.6 g/kg KM ve LAB sayısı 1×10^5 kob/ml olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın birinci denemesinde farklı seviyelerde sükröz ilavesi (%3, %5 ve %10) ve değişik sürelerde (2, 5 ve 10 gün) inkübe edilerek TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkılı olarak derin dondurucuda dondurulmuş ve liyofilizasyon işlemi ile kurutulmuş LAB sıvılarının bir ve üç aylık depolanmalarına ilişkin interkasyon analizleri ve interkasyon kaynakları Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’de sunulmuştur. Tablo 4.1 ve Tablo 4.2 incelendiğinde sükröz seviyesi, inkübasyon süresi, kryoprotektan çeşidi, depolama şekli ve depolama süresine ilişkin interkasyonlar görülmüştür ($P < 0.01$).

Farklı seviyelerde sükröz ilavesi (%3, %5 ve %10) ve değişik sürelerde (2, 5 ve 10 gün) inkübe edilerek elde edilen taze, katkısız, TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkılı olarak derin dondurucuda dondurulan ve liyofilize edilerek kurutulan fermente edilmiş LAB sıvılarının bir ve üç ay süre ile depolanmaları öncesi toplam LAB sayıları Tablo 4.3 (Log_{10}) ve Tablo 4.4’te (kob/ml) verilmiştir. Taze olarak hazırlanmış (kryoprotektan ilave edilmemiş, dondurma ve liyofilizasyon işlemi uygulanmamış) fermente edilmiş LAB sıvılarında inkübasyon süreleri dikkate alındığında, en yüksek LAB sayısı 5 günlük inkübasyonda %10 sükröz (4.20×10^{11} kob/ml) ve 10 günlük inkübasyonda %3 sükröz (2.83×10^{11} kob/ml) ilave edilen gruptan elde edilmiştir ($P < 0.01$). Genel olarak taze hazırlanmış fermente edilmiş LAB sıvılarında 2 ve 5 günlük inkübasyon sürelerinde sükröz seviyesinin artışına bağlı olarak LAB sayıları artarken, 10 günlük inkübasyon süresinde ise azalma görülmüştür ($P < 0.01$). Benzer şekilde bir ve üç ay süre ile depolanma süresi öncesinde kryoprotektan katkısı yapılmadan katkısız olarak derin dondurucuda dondurulmuş LAB sıvılarında en yüksek LAB sayıları derin dondurucuda dondurulan grupta 2 ve 5 günlük inkübasyonda (2.00×10^{10} ve 9.23×10^9), liyofilize

edilerek kurutulan grupta ise 5 günlük inkübasyonda %10 süzkroz ilavesiyle (6.33×10^{10}) elde edilmiştir ($P < 0.01$). Kryoprotektan katkısı yapılmadan derin dondurucuda dondurulan ve liyofilizasyon işlemi ile kurutulan fermente edilmiş LAB sıvılarında 2 ve 5 günlük inkübasyon sürelerinde süzkroz seviyesinin artışına bağlı olarak LAB sayılarının arttığı, 10 günlük inkübasyon süresinde ise azalmanın olduğu görülmüştür ($P < 0.01$).

Tablo 4.1. Farklı Seviyelerde Süzkroz İlavesi (%3, %5 ve %10) ve Değişik Sürelerde (2, 5 ve 10 Gün) İnkübe Edilerek Trisodyum Sitrat ve Dimetil Sülfoksit Katkılı Olarak Derin Dondurucuda Dondurulmuş ve Liyofilize Edilerek Kurutulmuş LAB Sıvılarının Bir ve Üç Aylık Depolanmalarına İlişkin İnteraksiyon Analizleri (\log_{10}).

İnkübasyon süresi, gün.	Süzkroz seviyesi %	Koruyucu Türü	1 Ay Depolama Süresi		3 Ay Depolama Süresi	
			Depolama Şekli		Depolama Şekli	
			Derin Dondurucu	Liyofilizasyon	Derin Dondurucu	Liyofilizasyon
2	3	TRİS (Ts)	9.42	10.45	8.60	10.44
		DMSO (Ds)	8.63	10.00	5.00	9.97
	5	TRİS (Ts)	9.59	10.71	8.00	10.00
		DMSO (Ds)	8.90	10.64	5.48	10.62
	10	TRİS (Ts)	9.80	10.00	8.88	10.10
		DMSO (Ds)	9.15	10.98	6.56	10.86
5	3	TRİS (Ts)	7.48	10.48	6.78	10.48
		DMSO (Ds)	8.20	10.55	3.00	9.90
	5	TRİS (Ts)	10.73	10.71	9.52	10.60
		DMSO (Ds)	3.00	10.10	3.00	8.95
	10	TRİS (Ts)	10.00	10.95	9.92	10.66
		DMSO (Ds)	3.00	11.00	3.00	8.59
10	3	TRİS (Ts)	6.52	6.42	6.48	6.09
		DMSO (Ds)	4.48	7.48	2.00	6.84
	5	TRİS (Ts)	10.10	6.82	9.52	6.18
		DMSO (Ds)	3.00	7.75	2.00	7.75
	10	TRİS (Ts)	10.18	6.63	7.10	6.09
		DMSO (Ds)	3.00	8.07	2.00	8.00

İnkübasyon süresi: 2, 5 ve 10 gün; Süzkroz seviyesi: %3, %5 ve %10; TRİS (Ts): Trisodyum sitrat; DMSO (Ds): Dimetil sülfoksit.

Tablo 4.2. Farklı Seviyelerde Süzkroz İlavesi (%3, %5 ve %10) ve Değişik Sürelerde (2, 5 ve 10 Gün) İnkübe Edilerek Trisodyum Sitrat ile Dimetil Sülfoksit Katkılı Olarak Derin Dondurucuda Dondurulmuş ve Liyofilize Edilerek Kurutulmuş LAB Bakteri Sıvılarının Bir ve Üç Aylık Depolanmalarına İlişkin İnteraksiyon Kaynakları.

İnteraksiyon Kaynağı	F Değeri	Önem	P
Ay	12750.53	0.000	**
Süzkroz	699.23	0.000	**
İnkubasyon Süresi	40514.93	0.000	**
Koruyucu	49654.93	0.000	**
Depolama	79540.26	0.000	**
Ay*Süzkroz	145.95	0.000	**
Ay*İnkubasyon Süresi	83.27	0.000	**
Ay*Koruyucu	1619.90	0.000	**
Ay*Depolama	4236.08	0.000	**
Süzkroz*İnkubasyon Süresi	358.85	0.000	**
Süzkroz*Koruyucu	2440.17	0.000	**
Süzkroz*Depolama	158.72	0.000	**
İnkubasyon Süresi*Koruyucu	5402.52	0.000	**
İnkubasyon Süresi*Depolama	5846.40	0.000	**
Koruyucu*Depolama	62162.50	0.000	**
Ay*Süzkroz*İnkubasyon Süresi	278.06	0.000	**
Ay*Süzkroz*Koruyucu	923.60	0.000	**
Ay*Süzkroz*Depolama	414.73	0.000	**
Ay*İnkubasyon Süresi*Koruyucu	424.80	0.000	**
Ay*İnkubasyon Süresi*Depolama	701.76	0.000	**
Ay*Koruyucu*Depolama	592.70	0.000	**
Süzkroz*İnkubasyon Süresi*Koruyucu	1947.08	0.000	**
Süzkroz*İnkubasyon Süresi*Depolama	172.32	0.000	**
Süzkroz*Koruyucu*Depolama	3272.60	0.000	**
İnkubasyon Süresi*Koruyucu*Depolama	6270.91	0.000	**
Ay*Süzkroz*İnkubasyon Süresi*Koruyucu	197.33	0.000	**
Ay*Süzkroz*İnkubasyon Süresi*Depolama	595.45	0.000	**
Ay*Süzkroz*Koruyucu*Depolama	949.65	0.000	**
Ay*İnkubasyon Süresi*Koruyucu*Depolama	420.67	0.000	**
Süzkroz*İnkubasyon Süresi*Koruyucu*Depolama	666.44	0.000	**
Ay*Süzkroz *İnkubasyon Süresi*Koruyucu*Depolama	256.95	0.000	**

Ay: Depolama süresi 1 ve 3 ay; **Süzkroz:** Süzkroz seviyesi %3, %5 ve %10; **İnkubasyon Süresi:** 2, 5 ve 10 gün; **Koruyucu:** Trisodyum sitrat (TRİS (Ts)) ve Dimetil sülfoksit (DMSO (Ds)), **Depolama:** Derin dondurucu ve liyofilizasyon.

Derin dondurucuda TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkısı ile dondurulan fermente edilmiş LAB sıvılarında en yüksek LAB sayıları 2 günlük inkübasyonda %10 süzkroz ilave edilen gruptan (9.33x10¹⁰ ve 4.67x10⁹); liyofilize edilerek kurutulmuş grupta ise (Tablo 4.4) en yüksek LAB değerleri 5 günlük inkübasyon süresinde %5 ve %10

sükroz ilave edilen gruplardan (8.67×10^{10} ve 2.67×10^{11}) elde edilmiştir (Tablo 4.4, $P < 0.01$). TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) ilave edilerek derin dondurucuda dondurulan fermente edilmiş LAB sıvılarında 2 günlük inkübasyon sürelerinde sükroz seviyesinin artışına bağlı olarak LAB sayılarının arttığı, 5 ve 10 günlük inkübasyon sürelerinde ise sükroz seviyesinin artışına bağlı olarak LAB sayısının azaldığı görülmüştür ($P < 0.01$). TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) ilavesiyle liyofilizasyon işlemi uygulanarak kurutulan fermente edilmiş LAB sıvılarında 2 günlük inkübasyon süresinde sükroz seviyesinin artışına bağlı olarak LAB sayılarının azaldığı, 5 günlük inkübasyon süresinde TRİS (Ts) katkısında %5, DMSO (Ds) katkısında %10 sükroz seviyesinde artma, 10 günlük inkübasyon süresinde ise TRİS (Ts) katkılı gruplarda sükroz seviyesinin artışına bağlı olarak LAB sayısı azalırken, DMSO (Ds) katkılı grupta ise %5 sükroz ilaveli grupta azalmanın olduğu görülmüştür ($P < 0.01$). Farklı seviyelerde sükroz ilavesi (%3, %5 ve %10) ile farklı sürelerde (2, 5 ve 10 gün) inkübasyon ile elde edilen LAB sıvılarında, TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkısız ve katkılı grupların derin dondurucuda dondurulma ve liyofilize edilmeleri ile elde edilen LAB sayıları genel olarak değerlendirildiğinde (Tablo 4.3 ve Tablo 4.4) 5 günlük inkübasyon süresinde %5 ve %10 sükroz ilave edilerek liyofilizasyon işlemi ile kurutulan gruplarda (8.67×10^{10} ve 2.67×10^{11} kob/ml) en yüksek bulunmuştur ($P < 0.01$).

Farklı seviyelerde sükroz ilavesi ile değişik sürelerde inkübe edilerek elde edilen katkısız, TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkılı olarak derin dondurucuda dondurulan ve liyofilize edilerek kurutulan LAB sıvılarının bir ve üç ay depolama öncesi, taze olarak hazırlanmış grupla kıyaslanan LAB canlılık oranları Tablo 4.5'te verilmiştir. Derin dondurucuda katkısız, TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkısı ile dondurulan fermente edilmiş LAB sıvıları taze olarak hazırlanmış grupla kıyaslandığında en yüksek LAB canlılık oranları TRİS (Ts) katkılı gruplardan elde edilirken, liyofilize edilerek kurutulan sıvılarda en yüksek LAB canlılık oranları ise TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkılı gruplardan elde edilmiştir. Tablo 4.5 incelendiğinde katkısız, TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkılı tüm gruplarda liyofilize edilerek kurutma işlemi, derin dondurucuda dondurmaya göre LAB'nin canlılıklarını daha yüksek oranda koruduğu görülmüştür.

Tablo 4.3. Farklı Seviyelerde Sükroz İlavesi ile Değişik Sürelerde İnkübe Edilerek Elde Edilen Taze, Katkısız ile TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) Katkılı Olarak Hazırlanarak Derin Dondurucuda Dondurulan ve Liyofilize Edilerek Kurutulan LAB Sıvılarının Bir ve Üç Ay Depolama Öncesi LAB Sayıları (Log₁₀).

GRUP	Derin Dondurucu				Liyofilizasyon			SEM
	Taze	Katkısız	TRİS (Ts)	DMSO (Ds)	Katkısız	TRİS	DMSO (Ds)	
2G%3S	10.48 ^{f A}	9.00 ^{c D}	10.16 ^{bc AB}	8.52 ^{d E}	9.36 ^{f C}	10.10 ^{c B}	10.29 ^{cd AB}	0.164
2G%5S	10.73 ^{de A}	9.36 ^{b D}	10.46 ^{b B}	9.36 ^{b D}	9.97 ^{cd C}	10.59 ^{b AB}	9.86 ^{e C}	0.123
2G%10S	11.08 ^{bc A}	10.26 ^{a B}	10.97 ^{a A}	9.67 ^{a D}	9.80 ^{de CD}	10.00 ^{c BC}	9.59 ^{e D}	0.131
5G%3S	10.88 ^{cd A}	8.00 ^{e E}	9.67 ^{d C}	8.85 ^{c D}	9.73 ^{e C}	10.69 ^{b B}	10.59 ^{c B}	0.221
5G%5S	10.77 ^{de A}	9.00 ^{c D}	9.36 ^{de C}	8.63 ^{d E}	10.46 ^{b B}	10.94 ^{a A}	10.26 ^{d B}	0.194
5G%10S	11.61 ^{a A}	9.97 ^{a C}	9.06 ^{e D}	7.36 ^{g E}	10.80 ^{a B}	10.00 ^{c C}	11.42 ^{a A}	0.313
10G%3S	11.45 ^{a A}	9.26 ^{bc E}	10.36 ^{bc CD}	8.48 ^{d F}	10.10 ^{c D}	10.52 ^{b C}	10.90 ^{b B}	0.214
10G%5S	11.15 ^{b A}	9.10 ^{bc D}	9.48 ^{d C}	8.30 ^{e F}	8.82 ^{g E}	10.00 ^{c B}	10.20 ^{d B}	0.203
10G%10S	10.63 ^{ef A}	8.33 ^{d E}	10.13 ^{c B}	8.00 ^{f F}	8.67 ^{g D}	9.00 ^{d C}	10.46 ^{cd A}	0.234
SEM	0.071	0.134	0.123	0.132	0.134	0.114	0.103	

^{a-g}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.01); ^{A-E}: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.01); **2G**: 2 gün; **5G**: 5 gün; **10G**: 10 gün; **%3S**: %3 sükroz; **%5S**: %5 sükroz; **%10S**: %10 sükroz; **Taze**: Farklı sükroz ve inkübasyon süreleri sonunda elde edilen fermente edilmiş LAB sıvısı; **Katkısız**: Kryoprotektan ilave edilmemiş; **TRİS (Ts)**: Trisodyum sitrat; **DMSO (Ds)**: Dimetil sülfoksit.

Tablo 4.4. Farklı Seviyelerde Sükroz İlavesi ile Değişik Sürelerde İnkübe Edilerek Elde Edilen Taze, Katkısız ile TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) Katkılı Olarak Hazırlanarak Derin Dondurucuda Dondurulan ve Liyofilize Edilerek Kurutulan LAB Sıvılarının Bir ve Üç Ay Depolama Öncesi LAB Sayıları (kob/ml).

GRUP	Derin Dondurucu				Liyofilizasyon			SEM
	Taze	Katkısız	TRİS (Ts)	DMSO (Ds)	Katkısız	TRİS	DMSO (Ds)	
2G%3S	3.01x10 ^{10f} A	1.00x10 ^{9c} D	1.67x10 ^{10bc} AB	1.10x10 ^{9d} E	2.33x10 ^{9f} C	1.33x10 ^{10c} B	1.97x10 ^{10cd} AB	0.164
2G%5S	5.43x10 ^{10de} A	2.33x10 ^{9b} D	3.00x10 ^{10b} B	2.33x10 ^{9b} D	9.33x10 ^{9cd} C	4.00x10 ^{10b} AB	7.33x10 ^{9e} C	0.123
2G%10S	1.20x10 ^{11bc} A	2.00x10 ^{10a} B	9.33x10 ^{10a} A	4.67x10 ^{9a} D	6.33x10 ^{9de} CD	1.00x10 ^{10c} BC	4.00x10 ^{9e} D	0.131
5G%3S	7.67x10 ^{10cd} A	1.00x10 ^{8e} E	4.67x10 ^{9d} C	7.00x10 ^{8c} D	5.33x10 ^{9e} C	5.00x10 ^{10b} B	4.00x10 ^{10c} B	0.221
5G%5S	6.00x10 ^{10de} A	1.00x10 ^{9c} D	2.33x10 ^{9de} C	4.33x10 ^{8d} E	3.00x10 ^{10b} B	8.67x10 ^{10a} A	2.00x10 ^{10d} B	0.194
5G%10S	4.20x10 ^{11a} A	9.23x10 ^{9a} C	1.17x10 ^{9e} D	2.33x10 ^{7g} E	6.33x10 ^{10a} B	1.00x10 ^{10c} C	2.67x10 ^{11a} A	0.313
10G%3S	2.83x10 ^{11a} A	2.00x10 ^{9bc} E	2.33x10 ^{10bc} CD	3.00x10 ^{8d} F	1.33x10 ^{10c} D	3.33x10 ^{10b} C	8.00x10 ^{10b} B	0.214
10G%5S	1.47x10 ^{11b} A	1.33x10 ^{9bc} D	3.00x10 ^{9d} C	2.00x10 ^{8e} F	6.67x10 ^{8g} E	1.00x10 ^{10c} B	1.67x10 ^{10d} B	0.203
10G%10S	4.33x10 ^{10ef} A	2.17x10 ^{8d} E	1.37x10 ^{10c} B	1.00x10 ^{8f} F	4.67x10 ^{8g} D	1.00x10 ^{9d} C	3.00x10 ^{10cd} A	0.234
SEM	0.071	0.134	0.123	0.132	0.134	0.114	0.103	

^{a-g}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.01); ^{A-E}: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.01); **2G**: 2 gün; **5G**: 5 gün; **10G**: 10 gün; **%3S**: %3 sükroz; **%5S**: %5 sükroz; **%10S**: %10 sükroz; **Taze**: Farklı sükroz ve inkübasyon süreleri sonunda elde edilen fermente edilmiş LAB sıvısı; **Katkısız**: Kriyoprotektan ilave edilmemiş; **TRİS (Ts)**: Trisodyum sitrat; **DMSO (Ds)**: Dimetil sülfoksit.

Tablo 4.5. Farklı Seviyelerde Sükroz İlavesi ile Değişik Sürelerde İnkübe Edilerek Elde Edilen Taze, Katkısız ile TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) Katkılı Olarak Hazırlanarak Derin Dondurucuda Dondurulan ve Liyofilize Edilerek Kurutulan LAB Sıvılarının Bir ve Üç Ay Depolama Öncesi LAB Canlılık Oranları, %.

GRUP	Taze	Derin Dondurucu			Liyofilizasyon		
		Katkısız	TRİS (Ts)	DMSO (Ds)	Katkısız	TRİS (Ts)	DMSO (Ds)
2G%3S	100	86	97	81	89	96	98
2G%5S	100	87	97	87	93	99	92
2G%10S	100	93	99	87	88	90	87
5G%3S	100	74	89	81	89	98	97
5G%5S	100	84	87	80	97	99	95
5G%10S	100	86	78	63	93	86	98
10G%3S	100	81	90	74	88	92	95
10G%5S	100	82	85	74	79	90	91
10G%10S	100	78	95	75	82	85	98

2G: 2 gün; **5G:** 5 gün; **10G:** 10 gün; **%3S:** %3 sükroz; **%5S:** %5 sükroz; **%10S:** %10 sükroz; **Taze:** Farklı sükroz ve inkübasyon süreleri sonunda elde edilen fermente edilmiş LAB sıvısı; **Katkısız:** Kryoprotektan ilave edilmemiş; **TRİS (Ts):** Trisodyum sitrat; **DMSO (Ds):** Dimetil sülfoksit.

Farklı seviyelerde sükroz (%3, %5 ve %10) ilavesi ve değişik sürelerde (2, 5 ve 10 gün) inkübe edilerek elde edilmiş fermente edilmiş LAB sıvılarının liyofilize edilerek kurutulmaları sonucu elde edilen LAB sıvılarının nem (rutubet) içerikleri Tablo 4.6’te sunulmuştur. Liyofilize edilerek kurutulan LAB sıvılarında en düşük nem içeriği 2 günlük inkübasyon ve %3 sükroz ilaveli gruplardan (%8.22, %8.39 ve %8.95) elde edilirken, en yüksek nem içeriği ise tüm gruplarda 10 günlük inkübasyon ve %10 sükroz ilavesi ile (%15.09, %11.59 ve %16.64) elde edilmiştir ($P<0.01$). Genel olarak inkübasyon süresindeki artışa bağlı olarak liyofilize edilerek kurutulan LAB sıvılarında nem oranında artışlar meydana gelmiştir ($P<0.01$). Her bir inkübasyon süresinde sükroz seviyesinin artışına bağlı olarak kryoprotektan katkısız ve katkılı (TRİS (Ts) ve (DMSO (Ds)) grupların nem içerikleri yükselmiştir ($P<0.01$).

Farklı seviyelerde sükroz ilavesi ve farklı sürelerde inkübe edilerek hazırlanan fermente edilmiş LAB sıvılarının derin dondurucuda dondurularak ve liyofilize edilerek bir ay süre ile depolanması sonucunda LAB değerleri Tablo 4.7 (\log_{10}) ve Tablo 4.8’de (kob/ml) sunulmuştur. Derin dondurucuda bir ay süre ile depolanan örneklerde en yüksek LAB değerleri, TRİS (Ts) ilave edilen grupta 5 günlük inkübasyon süresinde %5 sükroz (5.33×10^{10} kob/ml); DMSO (Ds) ilave edilen grupta ise 2 günlük inkübasyon süresinde %10 sükroz (1.47×10^9 kob/ml) ilavesi ile elde edilmiştir ($P<0.01$).

Liyofilizasyon işlemi ile kurutulan ve bir ay süre ile depolanan örneklerde en yüksek LAB değerleri, TRİS (Ts) ilave edilen grupta 5 günlük inkübasyon süresinde %10 süzkroz (9.00×10^{10} kob/ml); DMSO (Ds) ilave edilen grupta ise 2 günlük inkübasyon süresinde %10 süzkroz (9.47×10^{10} kob/ml) ve 5 günlük inkübasyon süresinde %10 süzkroz (1.00×10^{11} kob/ml) ilavesi ile elde edilmiştir ($P < 0.01$). Bir aylık depolama süresi sonunda genel olarak TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) ilavesiyle liyofilize edilerek kurutulan LAB sıvılarında 10 günlük inkübasyon süresinin LAB sayısı üzerine olumsuz etki yaptığı görülmüştür.

Tablo 4.6. Liyofilizasyon İşlemi ile Kurutularak Elde Edilmiş LAB Sıvılarının Nem İçerikleri, %.

GRUP	Katkısız	TRİS (Ts)	DMSO (Ds)	SEM
2G%3S	8.22 ^e	8.39 ^c	8.95 ^f	0.225
2G%5S	10.97 ^{bcd A}	9.20 ^{c B}	11.27 ^{d A}	0.350
2G%10S	10.02 ^{d B}	11.46 ^{b A}	9.88 ^{e B}	0.272
5G%3S	10.56 ^{cd AB}	9.37 ^{c B}	11.16 ^{d A}	0.297
5G%5S	11.44 ^{bcd}	12.05 ^{ab}	12.42 ^{bc}	0.304
5G%10S	12.42 ^b	12.65 ^a	13.06 ^b	0.131
10G%3S	10.63 ^{cd B}	12.23 ^{ab A}	12.36 ^{bc A}	0.289
10G%5S	12.20 ^{bc}	11.92 ^{ab}	12.11 ^c	0.122
10G%10S	15.09 ^{a B}	11.59 ^{ab C}	16.64 ^{a A}	0.752
SEM	0.368	0.296	0.407	

^{a-f}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($P < 0.01$); ^{A-C}: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($P < 0.01$); **2G**: 2 gün; **5G**: 5 gün; **10G**: 10 gün; **%3S**: %3 süzkroz; **%5S**: %5 süzkroz; **%10S**: %10 süzkroz; **Katkısız**: Kryoprotektan ilave edilmemiş; **TRİS (Ts)**: Trisodyum sitrat; **DMSO (Ds)**: Dimetil sülfoksit.

Liyofize edilerek kurutulan LAB bakteri sıvılarının bir aylık depolama sonrası en düşük LAB sayısı TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkılı gruplarda 10 günlük inkübasyon ve %3 süzkroz (2.67×10^6 ve 3.00×10^7 kob/ml) ilavesi ile elde edilmiştir ($P < 0.01$). Benzer şekilde derin dondurucuda TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) ilavesiyle dondurulmuş LAB sıvılarında 10 günlük inkübasyon süresinin bir aylık depolama sonrası canlı LAB sayısı üzerine olumsuz etki yaptığı görülmüştür. Bir aylık depolama sonunda derin dondurucuda dondurulan LAB sıvılarında en düşük LAB sayısı TRİS (Ts) katkılı 10 günlük inkübasyon süresinde %3 süzkroz (3.33×10^6 kob/ml), DMSO (Ds) katkılı grupta ise 5 ve 10 günlük inkübasyon sürelerinde %5 ve %10 süzkroz ilaveleri sonucunda elde edilmiştir ($P < 0.01$). TRİS (Ts) katkısı ile derin dondurucuda dondurulan 5 günlük

inkübasyon ve %5 sükröz; liyofilize edilerek kurutulan örneklerde ise 5 günlük inkübasyon ve %10 sükröz ilavesinden elde edilen değerler en yüksek bulunmuştur. DMSO (Ds) katkısı ile derin dondurucuda dondurulan örneklerden elde edilen değerler genel olarak düşük bulunurken; liyofilize edilerek kurutulan örneklerde ise 2 ve 5 günlük günlük inkübasyon ve %10 sükröz ilavesinden elde edilen değerler en yüksek bulunmuştur (P<0.01).

Tablo 4.7. Farklı Seviyelerde Sükröz İlave Edilerek Farklı Sürelerde İnkübe Edilmiş LAB Sıvılarının Dondurularak ve Liyofilize Edilerek Bir Ay Süre ile Depolanması Sonucunda LAB Değerleri (Log₁₀).

GRUP	Derin Dondurucu		Liyofilizasyon		SEM
	TRİS (Ts)	DMSO (Ds)	TRİS (Ts)	DMSO (Ds)	
2G%3S	9.42 ^{d C}	8.63 ^{c D}	10.45 ^{c A}	10.00 ^{c B}	0.206
2G%5S	9.59 ^{d B}	8.90 ^{b C}	10.71 ^{b A}	10.64 ^{b A}	0.228
2G%10S	9.80 ^{c B}	9.15 ^{a C}	10.00 ^{d B}	10.98 ^{a A}	0.198
5G%3S	7.48 ^{e C}	8.20 ^{d B}	10.48 ^{c A}	10.55 ^{b A}	0.411
5G%5S	10.73 ^{a A}	3.00 ^{f C}	10.71 ^{b A}	10.10 ^{c B}	0.984
5G%10S	10.00 ^{b B}	3.00 ^{f C}	10.95 ^{a A}	11.00 ^{a A}	1.001
10G%3S	6.52 ^{f B}	4.48 ^{e C}	6.42 ^{g B}	7.48 ^{f A}	0.329
10G%5S	10.10 ^{b A}	3.00 ^{f D}	6.82 ^{e C}	7.75 ^{e B}	0.772
10G%10S	10.18 ^{b A}	3.00 ^{f D}	6.63 ^{f C}	8.07 ^{d B}	0.782
SEM	0.256	0.538	0.366	0.266	

^{a-g}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.01); ^{A-D}: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.01). **2G**: 2 gün; **5G**: 5 gün; **10G**: 10 gün; **%3S**: %3 sükröz; **%5S**: %5 sükröz; **%10S**: %10 sükröz; **Katkısız**: Kriyoprotektan ilave edilmemiş; **TRİS (Ts)**: Trisodyum sitrat; **DMSO (Ds)**: Dimetil sülfoksit.

Tablo 4.8. Farklı Seviyelerde Sükroz İlave Edilerek Farklı Sürelerde İnkübe Edilmiş LAB Sıvılarının Dondurularak ve Liyofilize Edilerek Bir Ay Süre ile Depolanması Sonucunda LAB Değerleri (kob/ml).

GRUP	Derin Dondurucu		Liyofilizasyon		SEM
	TRİS (Ts)	DMSO (Ds)	TRİS (Ts)	DMSO (Ds)	
2G%3S	2.67x10 ^{9d} C	4.33x10 ^{8c} D	2.83x10 ^{10c} A	1.00x10 ^{10c} B	0.206
2G%5S	4.00x10 ^{9d} B	8.00x10 ^{8b} C	5.10x10 ^{10b} A	4.43x10 ^{10b} A	0.228
2G%10S	6.33x10 ^{9c} B	1.47x10 ^{9a} C	1.00x10 ^{10d} B	9.47x10 ^{10a} A	0.198
5G%3S	3.03x10 ^{7e} C	1.67x10 ^{8d} B	3.00x10 ^{10c} A	3.53x10 ^{10b} A	0.411
5G%5S	5.33x10 ^{10a} A	1.00x10 ^{3f} C	5.13x10 ^{10b} A	1.33x10 ^{10c} B	0.984
5G%10S	1.00x10 ^{10b} B	1.00x10 ^{3f} C	9.00x10 ^{10a} A	1.00x10 ^{11a} A	1.001
10G%3S	3.33x10 ^{6f} B	3.00x10 ^{4e} C	2.67x10 ^{6g} B	3.00x10 ^{7f} A	0.329
10G%5S	1.33x10 ^{10b} A	1.00x10 ^{3f} D	6.67x10 ^{6e} C	5.67x10 ^{7e} B	0.772
10G%10S	1.50x10 ^{10b} A	1.00x10 ^{3f} D	4.33x10 ^{6f} C	1.20x10 ^{8d} B	0.782
SEM	0.256	0.538	0.366	0.266	

^{a-b}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.01); ^{A-D}: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.01). **2G**: 2 gün; **5G**: 5 gün; **10G**: %3S: %3 sükroz; %5S: %5 sükroz; %10S: %10 sükroz; **Katkısız**: Kryoprotektan ilave edilmemiş; **TRİS (Ts)**: Trisodyum sitrat; **DMSO (Ds)**: Dimetil sülfoksit.

Farklı seviyelerde sükroz ilavesi ile değişik sürelerde inkübe edilerek elde edilen TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkılı olarak derin dondurucuda dondurulan ve liyofilize edilerek kurutulan LAB sıvılarının bir ay süre ile depolanması sonucunda LAB canlılık oranları Tablo 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4.9. Farklı Seviyelerde Sükroz İlave Edilerek Farklı Sürelerde İnkübe Edilmiş LAB Sıvılarının Dondurularak ve Liyofilize Edilerek Bir Ay Süre ile Depolanması Sonucunda LAB Canlılık Oranları, %.

GRUP	Taze	Derin Dondurucu		Liyofilizasyon	
		TRİS (Ts)	DMSO (Ds)	TRİS (Ts)	DMSO (Ds)
2G%3S	100	90	82	99	95
2G%5S	100	89	83	99	99
2G%10S	100	88	83	90	99
5G%3S	100	67	75	96	97
5G%5S	100	99	28	99	94
5G%10S	100	86	26	94	95
10G%3S	100	57	39	56	68
10G%5S	100	91	27	61	70
10G%10S	100	96	28	62	76

2G: 2 gün; **5G**: 5 gün; **10G**: %3S: %3 sükroz; %5S: %5 sükroz; %10S: %10 sükroz; **Taze**: Farklı sükroz ve inkübasyon süreleri sonunda elde edilen fermente edilmiş LAB sıvısı; **Katkısız**: Kryoprotektan ilave edilmemiş; **TRİS (Ts)**: Trisodyum sitrat; **DMSO (Ds)**: Dimetil sülfoksit.

Derin dondurucuda TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkısı ile dondurulan fermente edilmiş LAB sıvıları taze olarak hazırlanan grupla kıyaslandığında en yüksek LAB canlılık oranları TRİS katkılı gruplardan elde edilirken, DMSO (Ds) katkılı gruplarda ise, inkübasyon süresinin uzamasına bağlı olarak mikrobiyal canlılık oranı %82'den %28'e azalmıştır. Liyofilize edilerek kurutulan sıvılarda en yüksek LAB canlılık oranları 2 ve 5 günlük inkübasyonlarda TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkılı gruplardan (%94-%99) elde edilirken, 10 günlük inkübasyon süresinde ise canlılık oranları azalmıştır. Taze olarak hazırlanan fermente edilmiş LAB sıvısı ile kıyaslandığında TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkıları ilave edilerek liyofilizasyon işlemi ile kurutulan LAB sıvılarında 2 ve 5 günlük inkübasyon sürelerinde sükröz (%3, %5 ve %10) katkısının mikrobiyal canlılık oranlarının korunmasında etkili olduğu görülmüştür.

Farklı sükröz seviyeleri (%3, %5 ve %10) ilave edilerek hazırlanan fermente edilmiş taze LAB sıvılarının Tablo 4.4'te gösterilen toplam LAB içerikleri, 2 günlük inkübasyon süresi için 3.01×10^{10} ile 1.20×10^{11} kob/ml, 5 günlük inkübasyon süresi için 7.67×10^{10} ile 4.2×10^{11} kob/ml, 10 günlük inkübasyon süresi için ise 4.33×10^{10} ile 2.83×10^{11} kob/ml aralığında belirlenmiştir. Bir aylık depolama süreci sonunda Tablo 4.8'de elde edilen değerler incelendiğinde, genel olarak TRİS (Ts) katkılı gruplarda 2 ve 5 günlük inkübasyon sürelerinde taze LAB sıvısından elde edilen değerlere (Tablo 4.4) yakın değerler elde edildiği ve LAB kaybının az olduğu görülmektedir. Bunun aksine farklı sükröz seviyeleri (%3, %5 ve %10) ilave edilerek 10 günlük inkübasyon süresi sonunda bir aylık depolamaya bırakılan TRİS (Ts) katkılı gruplardan elde edilen değerler, taze LAB sıvısından elde edilen değerlerden (Tablo 4.4) düşük bulunmuş ve LAB kaybının bu gruplarda fazla olduğu görülmüştür. Tablo 4.8'te sunulan değerler incelendiğinde DMSO (Ds) ilave edilerek derin dondurucuda bir ay süre ile depolanmış gruplarda inkübasyon süresinin uzamasına bağlı olarak LAB sayısında azalmalar görülmüştür ($P < 0.01$). Bu çalışmada farklı seviyelerde sükröz (%3, %5 ve %10) ilavesi ve değişik sürelerde (2, 5 ve 10 gün) inkübe edilerek hazırlanan LAB sıvılarının derin dondurucuda dondurularak ve liyofilizasyon işlemi ile kurutularak bir aylık depolama süresi sonunda elde edilen LAB değerleri (Tablo 4.8) incelendiğinde; liyofilizasyon işleminin derin dondurucuda dondurulma işlemine göre, TRİS (Ts) katkısının DMSO (Ds) katkısına göre, 2 ve 5 günlük inkübasyon süresinin ise 10 günlük inkübasyon süresine göre LAB sayısı açısından daha avantajlı olduğu görülmektedir.

Farklı seviyelerde sükröz ilave edilerek farklı sürelerde inkübe edilerek hazırlanan fermente edilmiş LAB sıvılarının derin dondurucuda dondurularak ve liyofilize edilerek üç ay süre ile depolanması sonucunda LAB değerleri Tablo 4.10 (Log_{10}) ve 4.11'da (kob/ml) verilmiştir. Derin dondurucuda üç ay süre ile depolanan örneklerde en yüksek LAB değerleri, TRİS (Ts) ilave edilen grupta 5 günlük inkübasyon süresinde %10 sükröz (8.33×10^9 kob/ml); DMSO (Ds) ilave edilen grupta ise 2 günlük inkübasyon süresinde %10 sükröz (3.67×10^6 kob/ml) ilavesi ile elde edilmiştir ($P < 0.01$). Liyofilizasyon işlemi ile kurutulan ve üç ay süre ile depolanan LAB sıvılarında en yüksek LAB değerleri; TRİS (Ts) ilave edilen grupta 5 günlük inkübasyon süresinde %10 sükröz (4.60×10^{10} kob/ml); DMSO (Ds) ilave edilen grupta ise 2 günlük inkübasyon süresinde %5 sükröz (7.33×10^{10} kob/ml) ilavesi ile elde edilmiştir ($P < 0.01$). Genel olarak liyofilize edilerek kurutulan LAB sıvılarında TRİS (Ts) katkısında 10 günlük inkübasyon süresinin, DMSO (Ds) katkısında ise 5 ve 10 günlük inkübasyon süresinin üç aylık depolama süresi sonrasında canlı LAB sayısı üzerine olumsuz etki yaptığı görülmüştür. Liyofize edilerek kurutulan LAB sıvılarında üç aylık depolama süresi sonrası en düşük canlı LAB sayıları, TRİS (Ts) katkılı gruplarda 10 günlük inkübasyon ve %3, %5 ve %10 sükröz (1.23×10^6 , 1.50×10^6 ve 1.27×10^6 kob/ml) ilavesi ile elde edilirken, DMSO (Ds) katkılı gruplarda ise 10 günlük inkübasyon süresi ve %3 sükröz seviyesinde (7.00×10^6 kob/ml) elde edilmiştir ($P < 0.01$). Benzer şekilde DMSO (Ds) ilavesiyle derin dondurucuda dondurulmuş LAB sıvılarında tüm inkübasyon sürelerinde (2, 5 ve 10 gün) üç aylık depolama süresinin LAB sayısı üzerine olumsuz etki yaptığı görülmüştür.

Tablo 4.10. Farklı Seviyelerde Sükroz İlave Edilerek Farklı Sürelerde İnkübe Edilmiş LAB Sıvılarının Dondurularak ve Liyofilize Edilerek Üç Ay Süre ile Depolanması Sonucunda LAB Değerleri (Log₁₀).

GRUP	Derin Dondurucu		Liyofilizasyon		SEM
	TRİS (Ts)	DMSO (Ds)	TRİS (Ts)	DMSO (Ds)	
2G%3S	8.60 ^d C	5.00 ^c D	10.44 ^c A	9.97 ^c B	0.621
2G%5S	8.00 ^e C	5.48 ^b D	10.00 ^d B	10.86 ^a A	0.550
2G%10S	8.88 ^c C	6.56 ^a D	10.10 ^d B	10.62 ^b A	0.469
5G%3S	6.78 ^g C	3.00 ^d D	10.48 ^{bc} A	9.90 ^c B	0.756
5G%5S	9.52 ^b B	3.00 ^d D	10.60 ^{ab} A	8.95 ^d C	0.770
5G%10S	9.92 ^a B	3.00 ^d D	10.66 ^a A	8.59 ^e C	0.850
10G%3S	6.48 ^h B	2.00 ^e D	6.09 ^e C	6.84 ^h A	0.447
10G%5S	9.52 ^b A	2.00 ^e D	6.18 ^e C	7.75 ^g B	0.632
10G%10S	7.10 ^f B	2.00 ^e D	6.09 ^e C	8.00 ^f A	0.556
SEM	0.238	0.314	0.396	0.255	

^{a-h}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.01); ^{A-D}: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.01). **2G**: 2 gün; **5G**: 5 gün; **10G**: 10 gün; **%3S**: %3 sükroz; **%5S**: %5 sükroz; **%10S**: %10 sükroz; **Katkısız**: Kryoprotektan ilave edilmemiş; **TRİS (Ts)**: Trisodyum sitrat; **DMSO (Ds)**: Dimetil sülfoksit.

Derin dondurucuda dondurulan LAB sıvılarında üç aylık depolama süresi sonrası en düşük LAB sayısı TRİS (Ts) katkılı grupta 5 günlük inkübasyon ve %3 sükroz (6.00×10^6 kob/ml), DMSO (Ds) katkılı grupta ise 10 günlük inkübasyon süresinde %3, %5 ve %10 sükroz ilavesi sonucunda elde edilmiştir (P<0.01). TRİS (Ts) katkısı ile hazırlanarak derin dondurucuda dondurulan ve liyofilize edilerek üç ay süre ile depolanan gruplarda 5 günlük inkübasyon ve %10 sükroz ilavesinden elde edilen değerler (8.33×10^9 ve 4.60×10^{10} kob/ml) en yüksek bulunmuştur (P<0.01). DMSO (Ds) katkısı ile hazırlanarak derin dondurucuda dondurulan örneklerden elde edilen değerler genel olarak düşük bulunurken; liyofilize edilerek kurutulan örneklerde ise 2 günlük inkübasyon ve %5 sükroz ilavesinden elde edilen değer (7.33 kob/ml) en yüksek bulunmuştur (P<0.01).

Tablo 4.11. Farklı Seviyelerde Sükroz İlave Edilerek Farklı Sürelerde İnkübe Edilmiş LAB Sıvılarının Dondurularak ve Liyofilize Edilerek Üç Ay Süre ile Depolanması Sonucunda LAB Değerleri (kob/ml).

GRUP	Derin Dondurucu		Liyofilizasyon		SEM
	TRİS (Ts)	DMSO (Ds)	TRİS (Ts)	DMSO (Ds)	
2G%3S	4.00x10 ^{8d} C	1.00x10 ^{5c} D	2.80x10 ^{10c} A	9.33x10 ^{9c} B	0.621
2G%5S	1.00x10 ^{8e} C	3.00x10 ^{5b} D	1.00x10 ^{10d} B	7.33x10 ^{10a} A	0.550
2G%10S	7.67x10 ^{8c} C	3.67x10 ^{6a} D	1.27x10 ^{10d} B	4.13x10 ^{10b} A	0.469
5G%3S	6.00x10 ^{6g} C	1.00x10 ^{3d} D	3.00x10 ^{10bc} A	8.00x10 ^{9c} B	0.756
5G%5S	3.33x10 ^{9b} B	1.00x10 ^{3d} D	4.00x10 ^{10ab} A	9.00x10 ^{8d} C	0.770
5G%10S	8.33x10 ^{9a} B	1.00x10 ^{3d} D	4.60x10 ^{10a} A	4.00x10 ^{8e} C	0.850
10G%3S	3.00x10 ^{6h} B	1.00x10 ^{2e} D	1.23x10 ^{6e} C	7.00x10 ^{6h} A	0.447
10G%5S	3.47x10 ^{9b} A	1.00x10 ^{2e} D	1.50x10 ^{6e} C	5.67x10 ^{7g} B	0.632
10G%10S	1.00x10 ^{7f} B	1.00x10 ^{2e} D	1.27x10 ^{6e} C	1.00x10 ^{8f} A	0.556
SEM	0.238	0.314	0.396	0.255	

^{a-h}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.01); ^{A-D}: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.01). **2G**: 2 gün; **5G**: 5 gün; **10G**: 10 gün; **%3S**: %3 sükroz; **%5S**: %5 sükroz; **%10S**: %10 sükroz; **Katkısız**: Kryoprotektan ilave edilmemiş; **TRİS (Ts)**: Trisodyum sitrat; **DMSO (Ds)**: Dimetil sülfoksit.

Üç aylık depolama süresi sonunda elde edilen değerler (Tablo 4.11) incelendiğinde genel olarak TRİS (Ts) katkılı olarak liyofilizasyon işlemi ile kurutulan gruplarda 2 ve 5 günlük inkübasyon sürelerinde elde edilen LAB sayılarının taze olarak hazırlanmış LAB sıvısından elde edilen değerlere (Tablo 4.4) yakın bulunmuş ve TRİS (Ts) katkısına bağlı olarak LAB kaybının az olduğu görülmüştür. Bunun aksine farklı sükroz seviyeleri (%3, %5 ve %10) ilave edilerek 10 günlük inkübasyon süresi sonunda liyofilize edilerek kurutularak üç ay süre ile depolamaya bırakılan TRİS (Ts) katkılı gruplardan elde edilen değerler, taze olarak hazırlanmış LAB sıvısından elde edilen değerlerden (Tablo 4.4) düşük bulunmuş ve LAB kaybının bu gruplarda fazla olduğu görülmüştür. Üç aylık depolama süresi sonunda Tablo 4.11’de sunulan değerler incelendiğinde DMSO (Ds) ilave edilerek derin dondurucuda depolanmış gruplarda inkübasyon süresinin uzamasına bağlı olarak LAB sayısında azalmalar görülmüştür (P<0.01).

Farklı seviyelerde sükroz ilavesi ile değişik sürelerde inkübe edilerek elde edilen TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkılı olarak derin dondurucuda dondurulan ve liyofilize edilerek kurutulan LAB sıvılarının üç ay süre ile depolanması sonucunda LAB canlılık oranları Tablo 4.12’de verilmiştir. Derin dondurucuda TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkısı ile dondurulan fermente edilmiş LAB sıvıları, taze olarak hazırlanmış grupla

kıyaslandığında en yüksek LAB canlılık oranları TRİS (Ts) katkılı gruplardan elde edilirken, DMSO (Ds) katkılı gruplarda ise inkübasyon süresinin uzamasına bağlı olarak canlılık oranı %59'dan %17'ye azalmıştır. Liyofilize edilerek kurutulan LAB sıvılarında en yüksek canlılık oranları 2 ve 5 günlük inkübasyon sürelerinde TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkılı gruplardan (%74-%99) elde edilirken, 10 günlük inkübasyon süresinde ise canlılık oranlarının azaldığı görülmüştür.

Tablo 4.12. Farklı Seviyelerde Sükroz İlave Edilerek Farklı Sürelerde İnkübe Edilmiş LAB Sıvılarının Dondurularak ve Liyofilize Edilerek Üç Ay Süre ile Depolanması Sonucunda LAB Canlılık Oranları, %.

GRUP	Taze	Derin Dondurucu		Liyofilizasyon	
		TRİS (Ts)	DMSO (Ds)	TRİS (Ts)	DMSO (Ds)
2G%3S	100	82	48	99	95
2G%5S	100	75	51	93	99
2G%10S	100	80	59	91	96
5G%3S	100	62	28	96	91
5G%5S	100	88	28	98	83
5G%10S	100	85	26	92	74
10G%3S	100	39	17	53	60
10G%5S	100	85	18	55	70
10G%10S	100	67	19	57	75

2G: 2 gün; 5G: 5 gün; 10G: %3S: %3 sükroz; %5S: %5 sükroz; %10S: %10 sükroz; Taze: Farklı sükroz ve inkübasyon süreleri sonunda elde edilen fermente edilmiş LAB sıvısı; Katkısız: Kriyoprotektan ilave edilmemiş; TRİS (Ts): Trisodyum sitrat; DMSO (Ds): Dimetil sülfoksit.

Bu çalışmada farklı seviyelerde sükroz (%3, %5 ve %10) ilavesi ve değişik sürelerde (2, 5 ve 10 gün) inkübe edilerek hazırlanan LAB sıvılarının, derin dondurucuda dondurularak ve liyofilizasyon işlemi ile kurutularak üç aylık depolama süresi sonunda elde edilen LAB değerleri (Tablo 4.11) incelendiğinde; liyofilizasyon işleminin derin dondurucuda dondurulma işlemine göre, TRİS (Ts) katkısının DMSO (Ds) katkısına göre, 2 ve 5 günlük inkübasyon süresinin ise 10 günlük inkübasyon süresine göre LAB sayısı açısından daha avantajlı olduğu görülmüştür.

Bu çalışmanın birinci denemesinde hazırlanarak bir ve üç ay süre ile depolanan LAB sıvılarından elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde; inkübasyon ve depolama süresinin uzamasına bağlı olarak elde edilen LAB sıvılarındaki LAB sayılarında azalmalar görüldüğü, ayrıca TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkısının canlılık oranları üzerine olumlu etki yaptığı, liyofilizasyon işleminin derin dondurucuda dondurulma işlemine göre avantajlı olduğu belirlenmiştir.

4. 2. İkinci Denemenin Bulguları

4. 2. 1. Bir Ay Süre ile Depolanmış Laktik Asit Bakteri Sıvıları Katılmış Yonca Silajları

Farklı seviyelerde sükröz ilave edilerek farklı sürelerde inkübe edilmiş LAB sıvılarının dondurularak ve liyofilize edilerek bir ay süre ile depolanması sonucunda elde edilen veriler ışığında (Tablo 4.7, 4.8 ve 4.9) kontrol (katkısız) grubunun yanısıra, en yüksek LAB içeriğine sahip %5 sükröz ilavesi ile 2 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı liyofilize (2G%5STsL); %10 sükröz ilavesi ile 2 gün inkübasyon sonrasında DMSO (Ds) katkılı liyofilize (2G%10SDsL); %10 sükröz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında DMSO (Ds) katkılı liyofilize (5G%10SDsL) ve %5 sükröz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı derin dondurucu (5G%5STsDD) grupları muamele grubu silajlar olarak hazırlanmıştır. Bu çalışmanın ikinci denemesinde bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının katılmasıyla elde edilen yonca silajlarının hazırlanmasında kullanılan yonca bitkisinin KM esasına göre KM, HK, HP, ADF ve NDF değerleri sırasıyla; %20.30, %9.95, %23.70, %37.96 ve %39.14; tamponlama kapasitesi 620 meq/kg KM; SÇK içeriği ise 71.10 g/kg KM olarak belirlenmiştir.

Bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının yonca silajının ham besin madde değerleri üzerine etkisi Tablo 4.13'te sunulmuştur. Bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının yonca silajının ham besin madde değerleri üzerine istatistiksel farklılık oluşturmamıştır. Elde edilen silajların KM değerleri kontrol, 2G%5STsL, 2G%10SDsL, 5G%10SDsL ve 5G%5STsDD grupları için sırasıyla %17.72, %18.33, %18.24, %17.67 ve %18.19 olarak belirlenmiş ve gruplar arasında fark görülmemiştir. Kontrol silajından elde edilen HP değeri (%23.34) ile fermente edilmiş LAB sıvısı ilave edilen grupların HP değerleri (%24.02, %24.31, %23.36 ve %23.82) benzer bulunmuştur. Bir aylık depolama süresi sonunda elde edilen silajların ADF ve NDF değerleri incelendiğinde kontrol grubu ile katkılı gruplar arasında istatistiksel fark bulunmamıştır.

Tablo 4.13. Bir Aylık Depolama Süresi Sonunda En Yüksek LAB Değerlerine Sahip LAB Sıvılarının Yonca Silajının Ham Besin Madde Değerleri Üzerine Etkisi.

GRUP	KM	HK	HP	ADF	NDF
Kontrol	17.72	11.57	23.34	30.06	31.57
2G%5STsL	18.33	10.90	24.02	29.99	32.56
2G%10SDsL	18.24	11.05	24.31	29.45	31.65
5G%10SDsL	17.67	11.44	23.36	30.99	32.04
5G%5STsDD	18.19	11.25	23.82	32.86	30.83
SEM	0.091	0.085	0.145	0.412	0.310

KM: Kuru madde, %; **HK:** Ham kül, %KM; **HP:** Ham protein, % KM; **ADF:** Asit deterjanda çözünmeyen lif, % KM; **NDF:** Nötral deterjanda çözünmeyen lif, % KM; **2G%5STsL:** %5 sükröz ilavesi ile 2 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı liyofilize LAB sıvısı; **2G%10SDsL:** %10 sükröz ilavesi ile 2 gün inkübasyon sonrasında DMSO (Ds) katkılı liyofilize LAB sıvısı; **5G%10SDsL:** %10 sükröz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında DMSO (Ds) katkılı liyofilize LAB sıvısı; **5G%5STsDD:** %5 sükröz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı derin dondurucuda dondurulan LAB sıvısı.

Bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının yonca silajının fermentasyon kalitesi üzerine etkisi Tablo 4.14'de sunulmuştur. Elde edilen silajların pH değerleri incelendiğinde; kontrol grubundan elde edilen pH değeri (5.01), katkılı gruplardan elde edilen pH değerleri ile benzer bulunurken, en yüksek pH değeri (5.33) 5G%10SDsL katkılı gruptan elde edilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel fark bulunmamasına karşın 2G%5STsL ve 2G%10SDsL gruplarından elde edilen pH değerleri (4.75 ve 4.76) rakamsal olarak azalmıştır. Bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının yonca bitkisine katılmasıyla hazırlanan silajların NH₃-N/TN değerleri incelendiğinde; 2G%5STsL ve 2G%10SDsL gruplarından elde edilen NH₃-N/TN değerleri (%40.57 ve %42.93) kontrol silajından elde edilen değerden (50.71) düşük bulunurken; 5G%10SDsL grubundan elde edilen NH₃-N/TN değeri (%55.07) kontrol silajından yüksek bulunmuştur (P<0.01). Elde edilen silajların aerobik stabilitelelerinin değerlendirilmesinde önemli bir parametre olan CO₂ üretiminde ise bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvıları CO₂ değerlerinde azalmalara neden olmuştur (P<0.01). En yüksek CO₂ üretimi (9.07 g/kg KM) kontrol grubundan elde edilirken, en düşük CO₂ üretimi 2G%10SDsL (5.42 g/kg KM) ve 2G%5STsL (6.03 g/kg KM) gruplarından elde edilmiştir (P<0.01).

Tablo 4.14. Bir Aylık Depolama Süresi Sonunda En Yüksek LAB Değerlerine Sahip LAB Sıvılarının Yonca Silajının Fermentasyon Kalitesi Üzerine Etkisi.

GRUP	pH	NH ₃ -N/TN	CO ₂	LA	AA	PA	BA
Kontrol	5.01 ^{ab}	50.71 ^b	9.07 ^a	28.41 ^b	13.29 ^c	0.00	5.31 ^b
2G%5STsL	4.75 ^b	40.57 ^c	6.03 ^c	45.89 ^a	18.49 ^{bc}	0.00	3.10 ^c
2G%10SDsL	4.76 ^b	42.93 ^c	5.42 ^c	35.44 ^b	19.50 ^{ab}	0.00	3.65 ^c
5G%10SDsL	5.33 ^a	55.07 ^a	7.17 ^b	26.96 ^b	24.25 ^{ab}	0.00	7.42 ^a
5G%5STsDD	5.06 ^{ab}	53.76 ^{ab}	6.92 ^b	25.64 ^b	25.31 ^a	0.00	7.51 ^a
SEM	0.066	1.385	0.296	1.946	1.133	-	0.465

^{a-b}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.01), **NH₃-N/TN**: Toplam azot (TN) içeriğindeki amonyak azotu oranı, NH₃-N/TN, %; **LA**: Laktik Asit, g/kg KM; **AA**: Asetik Asit, g/kg KM; **PA**: Propiyonik Asit, g/kg KM; **BA**: Bütirik Asit, g/kg KM; **2G%5STsL**: %5 sükröz ilavesi ile 2 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı liyofilize LAB sıvısı; **2G%10SDsL**: %10 sükröz ilavesi ile 2 gün inkübasyon sonrasında DMSO (Ds) katkılı liyofilize LAB sıvısı; **5G%10SDsL**: %10 sükröz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında DMSO (Ds) katkılı liyofilize LAB sıvısı; **5G%5STsDD**: %5 sükröz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı derin dondurucuda dondurulan LAB sıvısı.

Bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının yonca bitkisine katılmasıyla hazırlanan silajların önemli fermentasyon kriterlerinden biri olan laktik asit içeriklerine etkisi değerlendirildiğinde (Tablo 4.14), en yüksek laktik asit içeriği 2G%5STsL grubundan (45.89 g/kg KM) elde edilmiştir (P<0.01). Bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının yonca bitkisine katılmasıyla hazırlanan 2G%10SDsL, 5G%10SDsL ve 5G%5STsDD grubu silajlarda kontrol silajına kıyasla asetik asit değerlerinde artış görülmüştür (P<0.01). En yüksek asetik asit içeriği (25.31 g/kg KM) ile 5G%5STsDD belirlenirken (Tablo 4.14), en düşük asetik asit değeri ise kontrol grubu yonca silajından elde edilmiştir (P<0.01). Bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının yonca bitkisine katılmasıyla hazırlanan yonca silajlarının hiçbirinde propiyonik asit belirlenemezken (Tablo 4.14), bütirik asit ise en yüksek 5G%10SDsL ve 5G%5STsDD gruplarında sırasıyla 7.42 ve 7.51 g/kg KM olarak; en düşük bütirik asit değeri ise 2G%5STsL grubunda 3.10 g/kg KM olarak belirlenmiştir (P<0.01).

4. 2. 2. Üç Ay Süre ile Depolanmış Laktik Asit Bakteri Sıvıları Katılmış Yonca Silajları

Farklı seviyelerde sükröz ilave edilerek farklı sürelerde inkübe edilmiş LAB sıvılarının dondurularak ve liyofilize edilerek üç ay süre ile depolanması sonucunda elde edilen veriler ışığında (Tablo 4.10 ve 4.11) kontrol (katkısız) grubun yanısıra, en yüksek LAB içeriğine sahip %5 sükröz ilavesi ile 2 gün inkübasyon sonrasında DMSO (Ds) katkılı liyofilize (2G%5SDsL); %5 sükröz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı liyofilize (5G%5STsL); %10 sükröz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı liyofilize (5G%10STsL) ve %10 sükröz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı derin dondurucu (5G%10STsDD) grupları muamele grubu silajlar olarak hazırlanmıştır. Bu çalışmanın ikinci denemesinde üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının katılmasıyla elde edilen yonca silajlarının hazırlanmasında kullanılan yonca bitkisinin KM esasına göre KM, HK, HP, ADF ve NDF değerleri sırasıyla; %23.80, %10.81, %19.73, %37.44 ve %43.11; tamponlama kapasitesi 500 meq/kg KM; SÇK içeriği ise 76.20 g/kg KM olarak belirlenmiştir.

Üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının yonca silajının ham besin madde değerleri üzerine etkisi Tablo 4.15'de sunulmuştur.

Tablo 4.15. Üç Aylık Depolama Süresi Sonunda En Yüksek LAB Değerlerine Sahip LAB Sıvılarının Yonca Silajının Ham Besin Madde Değerleri Üzerine Etkisi.

GRUP	KM	HK	HP	ADF	NDF
Kontrol	23.78	11.56	20.07 ^a	28.92	35.07
2G%5SDsL	23.49	11.50	19.45 ^b	29.79	34.83
5G%5STsL	23.95	11.17	19.22 ^b	31.55	35.57
5G%10STsL	23.75	11.38	19.53 ^b	30.59	34.81
5G%10STsDD	23.98	11.41	19.23 ^b	30.61	35.87
SEM	0.158	0.052	0.087	0.337	0.321

^{a-b}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (P<0.01), **KM**: Kuru madde, %; **HK**: Ham kül, %KM; **HP**: Ham protein, % KM; **ADF**: Asit deterjanda çözünmeyen lif, % KM; **NDF**: Nötral deterjanda çözünmeyen lif, % KM; **2G%5SDsL**: %5 sükröz ilavesi ile 2 gün inkübasyon sonrasında DMSO (Ds) katkılı liyofilize LAB sıvısı; **5G%5STsL**: %5 sükröz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı liyofilize LAB sıvısı; **5G%10STsL**: %10 sükröz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı liyofilize LAB sıvısı; **5G%10STsDD**: %10 sükröz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı derin dondurucuda dondurulan LAB sıvısı.

Elde edilen silajların KM değerleri kontrol, 2G%5SDsL, 5G%5STsL, 5G%10STsL ve 5G%10STsDD grupları için sırasıyla %23.78, %23.49, %23.95, %23.75 ve %23.98 olarak belirlenmiş ve gruplar arasında istatistiksel fark görülmemiştir. Kontrol silajından elde edilen HP değeri (%20.07), fermente edilmiş LAB sıvısı ilave edilen grupların HP değerlerinden (%19.45, %19.22, %19.53, %19.23) yüksek bulunurken ($P<0.01$); ADF ve NDF değerleri bakımından kontrol ile katkılı silajlar arasında fark bulunmamıştır.

Üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip laktik asit bakterisi sıvılarının yonca silajının fermentasyon kalitesi üzerine etkisi Tablo 4.16'de sunulmuştur. Elde edilen silajların pH değerleri incelendiğinde; kontrol grubundan elde edilen değer (5.15), katkılı gruplardan elde edilen pH değerlerinden yüksek bulunurken, en düşük (4.91) pH değeri 2G%5SDsL grubundan elde edilmiştir (Tablo 4.16, $P<0.01$). Üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının yonca bitkisine katılmasıyla hazırlanan silajların $\text{NH}_3\text{-N/TN}$ değerleri incelendiğinde (Tablo 4.16), 2G%5SDsL grubundan elde edilen $\text{NH}_3\text{-N/TN}$ değeri (%25.40) kontrol grubundan elde edilen değerden düşük bulunmuştur ($P<0.01$). Elde edilen silajların aerobik stabilitelelerinin değerlendirilmesinde önemli bir parametre olan CO_2 üretiminde ise üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının katılmasıyla hazırlanan silajlarda kontrol silajına kıyasla istatistiksel fark görülmemiştir.

Tablo 4.16. Üç Aylık Depolama Süresi Sonunda En Yüksek LAB Değerlerine Sahip LAB Sıvılarının Yonca Silajının Fermentasyon Kalitesi Üzerine Etkisi.

GRUP	pH	$\text{NH}_3\text{-N/TN}$	CO_2	LA	AA	PA	BA
Kontrol	5.15 ^a	29.66 ^a	5.12	14.19 ^b	14.25	0.00	4.31 ^a
2G%5SDsL	4.91 ^c	25.40 ^b	4.55	26.09 ^a	18.50	0.00	2.92 ^b
5G%5STsL	4.92 ^c	27.08 ^{ab}	4.84	25.41 ^a	16.99	0.00	2.98 ^b
5G%10STsL	4.90 ^c	26.82 ^{ab}	4.54	23.68 ^a	15.02	0.00	2.95 ^b
5G%10STsDD	5.03 ^b	29.12 ^a	4.56	12.67 ^b	17.57	0.00	4.12 ^a
SEM	0.024	0.440	0.121	1.375	0.665	-	0.415

^{a-c}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($P<0.01$), $\text{NH}_3\text{-N/TN}$: Toplam azot (TN) içeriğindeki amonyak azotu oranı, $\text{NH}_3\text{-N/TN}$, %; **LA**: Laktik Asit, g/kg KM; **AA**: Asetik Asit, g/kg KM; **PA**: Propiyonik Asit, g/kg KM; **BA**: Bütirik Asit, g/kg KM; **2G%5SDsL**: %5 süzkroz ilavesi ile 2 gün inkübasyon sonrasında DMSO (Ds) katkılı liyofilize LAB sıvısı; **5G%5STsL**: %5 süzkroz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı liyofilize LAB sıvısı; **5G%10STsL**: %10 süzkroz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı liyofilize LAB sıvısı; **5G%10STsDD**: %10 süzkroz ilavesi ile 5 gün inkübasyon sonrasında TRİS (Ts) katkılı derin dondurucuda dondurulan LAB sıvısı.

Üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sınıflarının yonca bitkisine katılmasıyla hazırlanan silajların CO₂ üretim değerleri rakamsal olarak azalmıştır (Tablo 4.16). Üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sınıflarının yonca bitkisine katılmasıyla hazırlanan silajların önemli fermentasyon kriterlerinden biri olan laktik asit içerikleri etkisi değerlendirildiğinde (Tablo 4.16), en yüksek laktik asit içerikleri 2G%5SDsL, 5G%5STsL ve 5G%10STsL gruplarından sırasıyla 26.09, 25.41 ve 23.68 g/kg KM; en düşük laktik asit değerleri ise kontrol ve 5G%10STsDD gruplarından sırasıyla 14.19 ve 12.67 g/kg KM olarak belirlenmiştir (P<0.01). Üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sınıflarının yonca bitkisine katılmasıyla hazırlanan silajların asetik asit değerleri kontrol grubu ile benzer bulunmuştur. Rakamsal olarak en yüksek asetik asit değeri (18.50 g/kg KM) 2G%5SDsL grubunda belirlenirken, en düşük asetik asit değeri ise kontrol grubu yonca silajından (14.25 g/kg KM) elde edilmiştir (Tablo 4.16). Üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sınıflarının yonca bitkisine katılmasıyla hazırlanan yonca silajlarının hiçbirinde propiyonik asit belirlenemezken, bütirik asit ise en yüksek kontrol ve 5G%10STsDD grubu silajlarda 4.31 ve 4.12 g/kg KM olarak; en düşük bütirik asit değerleri ise 2G%5SDsL, 5G%5STsL ve 5G%10STsL gruplarında sırasıyla 2.92, 2.98 ve 2.95 g/kg KM olarak belirlenmiştir ((Tablo 4.16), P<0.01).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın birinci denemesinde fermente edilmiş LAB sıvısının hazırlanmasında kullanılan yonca bitkisi ile birinci denemenin sonuçlarına göre bir ve üç ay depolama süresi sonunda silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkilerinin tamponlama kapasiteleri ise sırasıyla 670, 620 ve 500 meq/kg KM olarak belirlenmiştir. Bu değerler; Turan ve Önenç (108), Çotuk (109) ile Ohshima ve ark. (75)'nin yonca bitkisinin tamponlama kapasitesi için bildirdikleri değerlerden (720, 728 ve 683 meq/kg KM) düşük; Zheng ve ark. (110)'nın bildirdiği değerler (522-589 meq/kg KM) ile benzer; Qinhua ve ark. (111), Ohshima ve ark. (75); Wang ve ark. (71) ile Nishino ve ark. (73)'nin bildirdikleri değerlerden (226, 470, 460 ve 426 meq/kg KM) yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada fermente edilmiş LAB sıvısının hazırlanmasında ve depolanan (bir ve üç ay süre ile) LAB sıvılarının ilave edilmesi ile hazırlanan silajlarda silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisinin HP değerlerinin azalmasına (%31.1, %23.70 ve %19.73 KM) bağlı olarak kullanılan yonca bitkilerinin tamponlama kapasitesi değerlerinde de azalmalar (670, 620 ve 500 meq/kg KM) meydana gelmiştir. Bitkilerin tamponlama özelliklerinin büyük bir kısmı yapılarındaki anyonlardan (organik asit tuzları, ortofosfatlar, sülfatlar, nitratlar ve klorürler) kaynaklanırken, yaklaşık %10-20'lik bir kısmı ise bitkinin protein içeriğinden kaynaklanmaktadır (112). Bitkilerin tamponlama kapasiteleri bitkinin türü, vejetasyon dönemi, toprağın gübrelenmesi ve soldurma işlemi gibi faktörlerden de etkilenmektedir (113,114). Suda çözünebilir karbonhidrat (SÇK) ve nişasta içeriği yüksek bitkiler düşük tamponlama kapasitesine sahipken, baklagil otları ise yüksek tamponlama kapasitesine sahiptir. Bitkinin vejetasyon döneminin ilerlemesine bağlı olarak tamponlama kapasitesi azalırken, toprağın azotlu gübreler ile gübrelenmesi ise tamponlama kapasitesini artırmaktadır. Soldurma işlemi bitkinin yapısında bulunan organik asitlerinin azalmasına bağlı olarak tamponlama kapasitesini düşürmektedir. Silolanan bitkinin yüksek tamponlama kapasitesine sahip olduğu durumlarda *Clostridia* türü bakteriler silo ortamında baskın hale geçerler, bunun sonucunda silaj fermentasyonu *Clostridial* fermentasyona doğru kayar ve elde edilen silajların pH ve bütirik asit değerleri yükselirken, laktik asit değerleri azalır (15,24,113,114).

Bu çalışmanın birinci denemesinde fermente edilmiş LAB sıvısının hazırlanmasında kullanılan yonca bitkisi ile bir ve üç ay süre ile depolanmış LAB sıvıları ilave edilerek hazırlanan silajlarda silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisinin SÇK değerleri sırasıyla (51.30, 71.10 ve 76.20 g/kg KM) olarak belirlenmiştir. Bu değerler yonca bitkisi için Çotuk (109) ile Turan ve Önenç (108) yaptıkları çalışmalardan elde ettikleri değerlerden (78.0 ve 84.0 g/kg KM) düşük; Bai ve ark. (115), Ohshima ve ark. (75); Nishino ve ark. (73)'nın bildirdikleri değerler (56.0, 57.9 ve 61.7 g/kg KM) ile benzer; Qinhua ve ark. (111), Zheng ve ark. (110), Okuyucu ve ark. (116) ile Wang ve ark. (71)'nin bildirdikleri değerlerden (50.8, 45.0, 15.0 ve 49.4 g/kg KM) yüksek bulunmuştur. Yonca gibi yüksek tamponlama kapasitesine sahip baklagil kaba yemlerinde partikül boyutunun azaltılması ve soldurma işleminin süresine bağlı olarak bitkinin KM değerinin yükselmesi (%30-50 KM) bitkinin SÇK içeriğini arttırmaktadır (24,43). Kendall (11) baklagil otlarının doğal olarak yetersiz miktarda SÇK ihtiva ettiğini, genel olarak bitkilerin SÇK içeriği üzerine vejetasyon döneminin, hasat metodunun, hava durumunun ve üretim aşamasında gübre kullanımının etkili olduğunu bildirmektedir. Benzer şekilde Haigh (117) silajlık bitkilerde SÇK içeriğinin iklim koşullarından etkilendiğini, güneş ışığının az ve fazla yağışlı bölgelerde yetişen bitkilerin SÇK içeriğinin düşük olduğunu bildirmektedir. Silajlık materyallerde SÇK içeriğinin yüksek olması silaj fermentasyonu sürecinde meydana gelebilecek KM kaybını azaltmaktadır (24,118). Bu çalışmada da kaynak bilgilerine uyumlu olarak bir ve üç ay süre ile depolanan LAB sıvılarının ilavesiyle hazırlanan silajlarda kullanılan yonca bitkisinin SÇK değerleri sırasıyla 71.10 ve 76.20 g/kg KM; KM değerleri ise sırasıyla %20.30 ve %23.80 olarak tespit edilmiş, KM değerinin artışına bağlı olarak silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisinin SÇK değerlerinde kısmi artışlar görülmüştür.

5. 1. Birinci Deneme

Bu çalışmanın birinci denemesinde fermente edilmiş LAB sıvılarının hazırlanmasında kullanılan taze yonca bitkisinin LAB sayısı 1×10^5 kob/ml olarak tespit edilmiştir. Bu değer Bureenok ve ark. (119), Ohshima ve ark. (75) ve Wang ve ark. (71)'nin yonca bitkisinin LAB sayılarına ilişkin bildirişleri (1×10^4 , 3×10^5 ve 4.32×10^4 kob/ml) ile uyumlu bulunmuştur. Biçim öncesi bitkiye bulaşık olan LAB sayısı 1×10^1

kob/gr'dan 1.0×10^7 kob/gr'a kadar değişebilmekte ve silajı yapılacak bitkilere bulaşık olan LAB sayısında ve türlerinde farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılıkların sebepleri arasında; çevre sıcaklığı, ultraviyole ışınlar, çevresel nem ile bitkinin kendisi ile alakalı birçok faktör sayılabilir. Yapılan bazı çalışmalarda silajlık bitkilerin parçalanmasının bitkinin yapısında bulunan bakteri sayısını arttırdığı yönünde bildirimler bulunmaktadır (49,54).

Bu çalışmada taze olarak hazırlanan fermente edilmiş LAB sıvılarında; sükröz seviyesinin artışına bağlı olarak on günlük inkübasyon süresi sonunda toplam LAB sayısı azalırken; iki ve beş günlük inkübasyon sürelerinde ise bu durumun aksine toplam LAB sayısında genel olarak bir artış eğilimi görülmüştür (Tablo 4.3, 4.4 ve 4.5). Sükröz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı olarak, %3 ve %5 sükröz katkılı gruplarda iki, beş ve on günlük, %10 sükröz katkılı gruplarda ise 5 günlük inkübasyon sürelerinde LAB'nin logaritmik artış döneminin devam ettiği; %10 sükröz katkılı grupta on günlük inkübasyon süresinde LAB sayısında azalmanın olduğu görülmüştür ($P < 0.01$). On günlük inkübasyon süresi ve %10 sükröz katkılı gruptaki LAB sayısındaki azalmanın nedeni; ortamda sayıca artan LAB'nin ihtiyacı olan besin maddelerinin zamana bağlı olarak azalması, toksik madde miktarındaki artış (laktik asit, asetaldehit, peroksit vb.) ve ortam pH değerinin düşmeye başlamasından kaynaklanabilmektedir. Bu durumun sonucu olarak ortamda kalabilen canlı mikroorganizma sayısında azalma, aktivitesini yitiren mikroorganizma sayısında ise artış şekillenmektedir (14).

Mikroorganizmaların dondurularak saklanmasında uygulanan dondurma işleminin şekli ve hızlı soğutma maksimum hücre canlılığının sağlanmasında önem taşımaktadır (120,121). Bakteri hücre zarında dondurulma işlemi ile oluşan hasar, hücrenin bulunduğu ortamın yüksek çözelti konsantrasyonuna ve hücre içi buz kristallerine bağlı olabileceği bildirilmektedir (122,123). Mikroorganizmaların dondurularak muhafaza edilmesinde kryoprotektan kullanılması dondurulma işlemi sırasında hücre içinde ve hücre dışında büyük buz kristali oluşumunu engelleyerek dondurulmuş mikroorganizmaların yüksek mikrobiyal canlılığa ulaşmalarını sağlamaktadırlar (122).

Bu çalışmada taze olarak hazırlanmış LAB sıvıları ile kıyaslandığında, derin dondurucuda kryoprotektan katkısı yapılmadan dondurulan (katkısız) gruplarda iki ve beş günlük inkübasyon sürelerinde sükröz seviyesindeki (%3, %5 ve %10) artışa bağlı

olarak mikrobiyal canlılık oranları iki günlük inkübasyon süresinde %86, %87 ve %93; beş günlük inkübasyon süresinde ise %74, %84 ve %86 olarak tespit edilmiş, iki ve beş günlük inkübasyon sürelerinde süzkroz seviyesinin artışına bağlı olarak canlılık oranının yükseldiği ve en yüksek canlılık oranlarının %10 süzkroz katkısından elde edildiği görülmüştür. On günlük inkübasyon süresinde ise en yüksek canlılık oranı %5 süzkroz katkılı gruptan (%82) elde edilmiştir (Tablo 4.5).

Farklı seviyelerde süzkroz ilavesi ve değişik sürelerde inkübe edilerek elde edilen LAB sıvılarına TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) kryoprotektanları ilave edilerek derin dondurucuda dondurulmuş LAB sıvılarının (Tablo 4.3, 4.4 ve 4.5) bir ve üç ay depolama öncesi LAB canlılık oranları, taze LAB sıvısı ile kıyaslandığında en yüksek canlılık oranlarının 2G%3S, 2G%5S ve 2G%10S gruplarında TRİS (Ts) katkısı ile %97, %97 ve %99 olarak, DMSO katkısında ise %81, %87 ve %87 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.5). Aynı gruplarda (2G%3S, 2G%5S ve 2G%10S) bir aylık depolama süresi sonunda TRİS (Ts) katkısı ile mikrobiyal canlılık oranı %90, %89 ve %88 olarak bulunurken, üç ay depolama süresi sonunda ise aynı gruplar için mikrobiyal canlılık oranı %82, %75 ve %80 olarak tespit edilmiş ve depolama süresinin uzamasına bağlı olarak mikrobiyal canlılık oranında taze LAB sıvılarına kıyasla azalmalar görülmüştür (Tablo 4.9 ve 4.12). Bu çalışmada 2G%3S, 2G%5S ve 2G%10S gruplarında DMSO (Ds) katkısına bağlı olarak canlılık oranları bir aylık depolama süresi sonunda %82, %83 ve %83 olarak belirlenirken (Tablo 4.9), üç aylık depolama süresi sonunda aynı gruplar için %48, %51 ve %59 olarak belirlenmiş ve depolama süresinin uzamasına bağlı olarak mikrobiyal canlılık oranında taze LAB sıvılarına kıyasla azalmalar görülmüştür (Tablo 4.12).

Bu çalışmada derin dondurucuda dondurularak bir ve üç ay depolama süresi sonrasında hazırlanan yonca silajlarında katkı olarak kullanılan 5G%5TsDD grubunun canlılık oranı %99'dan %88'e, 5G%10TsDD grubunun ise canlılık oranı ise %86'dan %85'e düşmüştür. Greaves (124)'ın yaptığı çalışmada dondurularak muhafaza edilen mikroorganizmaların korunmasında en uygun şeker kaynağının süzkroz olduğu bilgisi, bu çalışmada süzkroz seviyesinin artışına bağlı olarak belirlenen yüksek canlılık oranları ile uyumlu bulunmuştur.

Saf mikroorganizma kültürlerinin steril süt içerisinde eksi 30-40 °C'de dondurulması halinde bakterilerin birkaç ay canlılıklarını koruyabileceklerini

belirlenmektedir (125). Bâati ve ark. (86) *Lb. acidophilus*'un dondurularak saklanması ile ilgili yapmış olduğu çalışmada; *Lb. acidophilus*'a uygulanan dondurma işleminin sıcaklığına ve süspansiyon ortamına bağlı olarak %24 ile %89 arasında mikrobiyal canlılığın koruduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada *Lb. acidophilus* bakterisinin doğrudan -80 °C'de dondurulması sonucu mikrobiyal canlılık oranı %42.65 olarak belirlenmesine karşın, dondurulma sıcaklığının yavaş yavaş azaltılması sonucu (sırasıyla 37, 20, -4, -20, -80 °C) yapılan dondurma işleminde mikrobiyal canlılığın %74'e çıktığı belirlenmiştir. En fazla mikrobiyal kayıp ise -4 °C ile -20 °C arasında gerçekleştiği gözlenmiştir. Mikroorganizmalara uygulanacak dondurma işlemi öncesi yapılacak olan bir ön dondurma işleminin mikrobiyal canlılığın artışında önemli olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada depolama öncesi (1 ve 3 ay süre ile) derin dondurucuda dondurularak elde edilen mikrobiyal canlılık oranı katkısız gruplarda %74-%93, TRİS (Ts) katkılı gruplarda %85-%99, DMSO (Ds) katkılı gruplarda ise %63-%87 aralığında belirlenmiştir. Bu çalışmada dondurulan fermente edilmiş LAB gruplarında, depolama süresinin uzamasına (1 ve 3 ay) bağlı olarak TRİS (Ts) katkılı gruplardan elde edilen mikrobiyal canlılık oranları, katkısız ve DMSO (Ds) katkılı gruplara göre daha yüksek bulunmuştur. Derin dondurucuda dondurulan gruplarda genel olarak depolama süresinin uzamasına bağlı olarak TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkılı gruplarda mikrobiyal canlılık azalmıştır.

Liyofilizasyon işlemi ile kurutularak elde edilmiş LAB sıvılarının nem içerikleri Tablo 4.6'te sunulmuştur. Genel olarak liyofilize edilmiş kültürlerdeki nem içeriğinin %2 veya daha düşük düzeyde olması istenmekte ve nem içeriğinin %2 veya altında bulunması liyofilizasyonun işleminin başarısının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (126). Bu çalışma kapsamında liyofilize edilerek kurutulmuş LAB sıvılarındaki nem içerikleri %8.22 ile %16.64 aralığında bulunmuştur. Bu çalışmada liyofilizasyon işlemi sonucunda elde edilen LAB sıvılarının nem içerikleri önceden yapılmış çalışmalarla kıyaslandığında, bu çalışmadan elde edilen nem değerlerinin yüksek olduğu görülmüştür (127,128) Bu çalışmada liyofilizasyon işlemi ile elde edilen LAB sıvılarında daha yüksek nem değerlerinin tespit edilmesinin sebebi; liyofilizasyon işleminin son basamağı olan ve ürün içerisindeki bağıl su miktarını azaltan sekonder kurutma zamanının kısa tutulması ile açıklanabilir (128).

Mikroorganizmaların ve hücre kültürlerinin liyofilize edilerek kurutulma işleminde mikrobiyal canlılık ve aktiviteyi etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler arasında bakterinin cinsi, türü, suşu ve yaşı, üretim ortamı, işlem öncesi hücre yoğunluğu, ortam şartları, kryoprotektan çeşidi, işlem sonrası kültürün korunduğu ortam şartları, kültürde kalan nem miktarı, depolama koşulları (sıcaklık, süre, ışık), sulandırmada kullanılan çözeltinin bileşimi ve sıcaklığı sayılabilir. Bu faktörlerin dışında liyofilizasyon işlemi sırasında kullanılan sistem, sublimasyonun fazla olması, başlangıç dondurulma ısısı, bakteriyofaj riski vb. faktörlerin de liyofilize edilmiş kültürlerin canlılık ve aktiviteleri üzerine etkili olduğu bilinmektedir (129).

Farklı seviyelerde süzkroz ilavesi ile değişik sürelerde inkübe edilerek elde edilen taze, katkısız ile TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkılı olarak hazırlanarak derin dondurucuda dondurulmuş ve liyofilize edilerek kurutulmuş LAB sıvılarının bir ve üç ay depolama öncesi LAB canlılık oranları Tablo 4.5'te verilmiştir. Taze olarak hazırlanmış LAB sıvıları ile kıyaslandığında, liyofilizasyon işlemi ile kurutulan katkısız gruplarda en yüksek canlılık oranlarının iki ve beş günlük inkübasyon sürelerinde %5 süzkroz katkılı gruplarda %93 ve %97 olarak tespit edilirken, on günlük inkübasyon süresinde ise %3 süzkroz katkılı grupta %88 olarak belirlenmiştir. Derin dondurucuda dondurulan gruplarda ise en yüksek mikrobiyal canlılık 2 gün inkübasyon %10 süzkroz katkılı grupta %93 olarak tespit edilmiştir. Taze olarak hazırlanmış LAB sıvıları ile derin dondurucuda dondurulan gruplar kıyaslandığında; TRİS (Ts) katkılı gruplarda en yüksek canlılık oranlarının iki günlük inkübasyon süresinde %3, %5 ve %10 süzkroz (%97, %97, %99) ve on günlük inkübasyon süresinde ise %3 ve %10 süzkroz katkılı gruplarda (%90, %95) tespit edilmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde; derin dondurucuda TRİS (Ts) katkılı gruplarda en yüksek mikrobiyal canlılık oranı tespit edilirken, en düşük mikrobiyal canlılık oranı ise DMSO (Ds) katkılı gruplarda (%63-%87) belirlenmiştir. Taze olarak hazırlanmış LAB sıvıları ile liyofilizasyon işlemi ile kurutulan gruplar kıyaslandığında; TRİS (Ts) katkılı gruplarda en yüksek canlılık oranının iki ve beş günlük inkübasyon süresinde %3 ve %5 süzkroz katkılı gruplarda (%96-%99) tespit edilmiştir. DMSO katkılı gruplarda ise; en yüksek canlılık oranları 2, 5 ve 10 gün inkübasyon sürelerinde %3 süzkroz (%97-98) ve 10 günlük inkübasyon süresinde %10 süzkroz (%98) katkılı gruplarda belirlenmiştir (Tablo 4.5). Genel olarak değerlendirildiğinde; liyofilizasyon işlemi ile kurutulmada TRİS (Ts) katkılı grup en

yüksek mikrobiyal canlılık oranını korurken, en yüksek mikrobiyal kayıp oranı katkısız gruplarda belirlenmiştir.

Bu çalışmada taze olarak elde edilmiş fermente edilmiş LAB sıvıları ile kıyaslandığında; liyofilize edilerek kurutulan LAB sıvılarının bir aylık depolama süresi sonunda TRİS (Ts) katkılı gruplarda en yüksek canlılık oranının iki günlük inkübasyon süresinde %3 ve %5 sükroz katkılı gruplarda %99 ve %93; beş günlük inkübasyon süresinde %3 ve %5 sükroz katkılı gruplarda ise %96 ve %98 olarak tespit edilmiştir. Liyofilize edilerek kurutulan LAB sıvılarında bir aylık depolama süresi sonunda DMSO (Ds) katkılı gruplarda en yüksek canlılık oranları iki ve beş günlük inbasyon sürelerinde %94-%99 aralığında belirlenmiştir (Tablo 4.9).

Farklı seviyelerde sükroz ilavesi ve değişik sürelerde inkübe edilerek hazırlanan sükroz katkılı (%3, %5 ve %10) LAB sıvılarına TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) ilave edilerek liyofilizasyon işlemi ile kurutulmuş LAB sıvılarının bir ay süre ile depolanması sonucunda iki ve beş günlük inkübasyon sürelerinde tüm sükroz seviyesinde mikrobiyal canlılık oranları %90'ın üzerinde bulunurken, on günlük inkübasyon süresinde ise mikrobiyal canlılık oranları %75'in altına düşmüştür.

Bu çalışmada liyofilize edilerek bir aylık depolama süresi sonrasında hazırlanan yonca silajlarında katkı olarak kullanılan 2G%5STsL, 2G%10DsL ve 5G%10SDsL gruplarındaki LAB'nin canlılık oranları sırasıyla %99, %99 ve %95 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.9). Liyofilize edilerek üç aylık depolama süresi sonrasında hazırlanan yonca silajlarında katkı olarak kullanılan 2G%5SDsL, 5G%5STsL ve 5G%10STsL gruplarındaki LAB'nin canlılık oranları ise %99, %98 ve %92 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.12).

Bu çalışmada liyofilizasyon işlemi ile kurutulan gruplarda, depolama süresinin uzamasına (bir ve üç ay) bağlı olarak TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkılı gruplardan elde edilen canlılık oranları, depolama süresinin uzamasına bağlı olarak azalmıştır. Canlılık oranındaki en yüksek kayıp on günlük inkübasyon sürelerinde görülmüştür (Tablo 4.9 ve 4.12).

Ferry (130)'nin yaptığı bir çalışmada liyofilizasyon işlemi ile kültür korunmasında %5 ile %10 arası şeker katkısının en ideal olduğunu belirtirken, Greaves (124) ise sükroz oranının %10'u aşmaması gerektiğini, kullanılan sükroz oranının %10-20

arasında olduğu durumda liyofilize edilen kültürün canlılık oranında zamana bağlı olarak azalma olduğunu belirtmektedir.

Bu çalışmada anaerob ve aerotolerant özellik gösteren laktik asit bakterilerinin, liyofilize edilerek kurutulması ile elde edilen liyofilize LAB sıvılarında yüksek mikrobiyal canlılıklarını devam ettirmeleri, gıda mikrobiyolojisi alanında anaerob ve özellikle aerotolerant mikroorganizmaların korunması ve muhafaza edilmesinin daha kolay olduğu bildirimini ile uyumlu bulunmuştur (129).

Laktik asit bakterilerinin korunmasında derin dondurucuda dondurma ve liyofilizasyon yöntemleri kullanılmakla birlikte özellikle liyofilizasyon işlemi uygulanarak yapılan kurutma yönteminde mikrobiyal kültür yoğunluğunun yüksek miktarlarda korunması sağlanmaktadır (131). De Giulio ve ark. (131)'nin bildirimini ile uyumlu olarak bu çalışmada da liyofilizasyon yönteminin, derin dondurucuda dondurma işlemine göre mikrobiyal canlılığı daha fazla koruduğu görülmüştür.

Yoğurt üretiminde kullanılan bakterilerin liyofilize edilmeleri üzerine yapılan çeşitli araştırmalarda liyofilizasyon işleminden hemen sonra %100 düzeyinde canlılık elde edilmesine karşılık, canlılık oranının depolama süresinin uzamasına bağlı olarak azalması (94), bu çalışmada liyofilize edilen LAB sıvılarının bir ve üç ay süre ile depolanmaları sonunda canlılık oranlarının azalması sonucu ile uyumlu bulunmuştur.

Pınarkara (89) liyofilizasyon işlemi ile kurutularak bir ve üç ay süre ile depolanan farklı türlerdeki LAB'nin canlılık oranları üzerine sükröz, TRİS ve DMSO katkılarının etkilerini araştırmıştır. Araştırmada liyofilizasyon işlemi öncesinde %5 seviyesinde sükröz katkısına bağlı olarak *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus* ve *Lactobacillus bulgaricus*'un bir aylık depolama süresi sonunda canlılık oranları sırasıyla %98, %99, %97, %95, %94, %98, %93 ve %98 olarak bulunurken; aynı mikroorganizmalar için üç aylık depolama süresi sonunda elde edilen canlılık oranları sırasıyla %85, %87, %86, %81, %85, %97, %89 ve %87 olarak belirlenmiştir. Pınarkara (89)'nin çalışmasında liyofilizasyon işlemi öncesinde %10 seviyesinde TRİS katkısına bağlı olarak *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus* ve *Lactobacillus*

bulgaricus'un bir aylık depolama süresi sonunda canlılık oranları sırasıyla %98, %97, %98, %95, %97, %98, %97 ve %98 olarak bulunurken; aynı mikroorganizmalar için üç aylık depolama süresi sonunda elde edilen canlılık oranları sırasıyla %88, %93, %91, %88, %90, %94, %94 ve %90 olarak belirlenmiştir. Aynı araştırmada (89) liyofilizasyon işlemi öncesinde %0.1 oranında DMSO katkısına bağlı olarak *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus* ve *Lactobacillus bulgaricus*'un bir aylık depolama süresi sonunda canlılık oranları sırasıyla %91, %99, %94, %94, %98, %99, %95 ve %98 olarak bulunurken; aynı mikroorganizmalar için üç aylık depolama süresi sonunda elde edilen canlılık oranları sırasıyla %85, %90, %87, %89, %79, %92, %85 ve %78 olarak belirlenmiştir.

De Giulio ve ark. (131) %32 sakkaroz ilavesiyle *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus salivarius ssp. Thermophilus* suşlarının liyofilizasyon işlemi sonrasında canlılık oranlarının %95; Morichi (92) ise bu sonucun aksine sakkaroz ilavesi ile *Lactobacillus bulgaricus*'un canlılık oranının %38 düzeyinde korunduğunu bildirmektedir. Bu çalışmada taze olarak hazırlanmış fermente edilmiş LAB sıvıları ile kıyaslandığında, %3 ve %5 sükroz ilavesi ile kryoprotektan olarak TRİS (Ts) katkısıyla liyofilize edilmiş LAB sıvılarının canlılık oranları değerleri De Giulio ve ark. (131) ve Pınarkara (89)'nın elde ettikleri sonuçlarla uyumlu bulunmuştur.

5. 2. İkinci Deneme

Bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının katılmasıyla elde edilen 2G%5STsL, 2G%10SDsL ve 5G%5STsDD katkılı grupların KM değerleri (%18.33, %18.24 ve %18.19) kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel fark görülmemesine karşın, muamele gruplarında rakamsal artışlar tespit edilmiştir (Tablo 4.13). Ohshima ve ark. (72)'nin yonca bitkisine fermente edilmiş LAB sıvısı ilavesiyle hazırladıkları silajların KM değerlerinin kontrol grubuna kıyasla azaldığını; Koç ve ark. (132) ile Nishino ve ark. (73)'nin yaptıkları çalışmalarda ise KM değerlerinin bu çalışmada olduğu gibi LAB sıvısı katkılı gruplarda arttığı belirlenmiştir. Silaj materyalinin silolanma sürecindeki KM kaybının %10-12'den daha düşük düzeyde

olduğu silajlarda istenen yönde fermentasyon, %20'den daha fazla KM kaybının şekillendiği silajlarda ise istenmeyen fermentasyonun şekillendiği kabul edilmektedir (133). Bu çalışmada kontrol grubu silaj ile kıyaslandığında bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sınıflarının katılmasıyla elde edilen yonca silajlarında (2G%5STsL, 2G%10SDsL ve 5G%5STsDD) silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisinin (%20.30 KM) KM kaybının %12'den daha az düzeyde olduğu görülmüştür. Üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sınıflarının katılmasıyla hazırlanan 2G%5SDsL, 5G%5STsL, 5G%10STsL ve 5G%10STsDD katkılı gruplarının KM değerleri (Tablo 4.15) sırasıyla %23.49, %23.95, %23.75 ve %23.98 olarak belirlenmiş ve kontrol grubundan elde edilen değer (%23.78) ile istatistiksel fark oluşmamıştır. Bu çalışmanın üç aylık depolama süresi sonunda hazırlanan kontrol ve tüm katkılı silajlarda, silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisinin (%23.80 KM) KM kaybının genel olarak olmadığı görülmüştür. Basmacıoğlu ve Ergül (24), kaliteli bir silaj elde edilebilmesi için silolanacak materyalin KM değerlerinin %25-35, Mohd Setapar ve ark. (118) ise %25-40 arasında olması gerektiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada bir ve üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sınıflarının katılmasıyla elde edilen yonca silajlarının hazırlanmasında kullanılan yonca bitkisinin KM değerleri (%20.30 ve %23.80) bu bildirimlerin altındadır. Henderson ve ark. (30)'ı silo içerisinde pH değerindeki azalmaya bağlı olarak, bütirik asit bakterileri ve birçok mikroorganizmanın inhibe edilmesi ile silaj KM değerinin arttığını bildirmektedirler. Benzer şekilde, silo içerisinde homofermentatif LAB'nin glikoz ve fruktoz gibi karbonhidratları laktik aside çevirerek, ortamdaki laktik asit miktarındaki artışa bağlı olarak KM kaybının azaldığı bildirilmektedir (133). Bu çalışmada bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sınıflarının katılmasıyla elde edilen yonca silajlarından 2G%5STsL ve 2G%10SDsL katkılı gruplarda KM değerlerinin (%18.33 ve %18.24) rakamsal olarak yükselmesi ve bu gruplarda pH ve bütirik asit değerlerinin düşük, laktik asit değerlerinin ise yüksek bulunması, bu gruplarda homofermentatif LAB'nin etkinliğinin daha fazla olduğunu düşündürmektedir.

Bir aylık depolama süresi sonunda silaj hazırlanmasında kullanılan yonca bitkisinin HP değeri %23.70 KM olarak belirlenmiştir. Kontrol silajı ile kıyaslandığında bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sınıflarının

katılmasıyla elde edilen yonca silajlarının (2G%5STsL, 2G%10SDsL, 5G%5STsDD ve 5G%10SDsL) HP değerlerinde (Tablo 4.13) istatistiksel fark görülmemesine karşın rakamsal artışlar tespit edilmiştir. Üç aylık depolama süresi sonunda silaj hazırlanmasında kullanılan yonca bitkisinin HP değeri %19.73 KM olarak, üç aylık depolama süresi sonunda hazırlanan 2G%5SDsL, 5G%5STsL, 5G%10STsL ve 5G%10STsDD katkılı grupların HP değerleri sırasıyla %19.45, %19.22, %19.53 ve %19.23 KM olarak belirlenmiş ve kontrol grubu (%20.07) ile istatistiksel fark oluşmamıştır (Tablo 4.15). Bu çalışmada bir aylık depolama süresi sonunda silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisinin HP değerinin (%23.70 KM) yüksek bulunması bitkinin ikinci biçim ve çiçeklenme başlangıcında, henüz körpe iken biçilerek silolanmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Bir ve üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sınırlarının katılmasıyla elde edilen yonca silajlarının ADF ve NDF değerleri (Tablo 4.13 ve Tablo 4.15) üzerine LAB sınırlarının etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu çalışmada ADF ve NDF parametreleri açısından elde edilen sonuçlar, LAB'nin hücre duvarı elemanlarını yıkımlayıcı etkisinin olmaması nedeniyle silajların selüloz değeri üzerine etkisinin az ya da hiç olmadığı bildirimini ile uyumlu bulunmuştur (2, 134).

Silajların pH değerleri inokulant kaynağı olarak kullanılan LAB türüne, bitkinin tamponlama kapasitesine, SÇK içeriğine, bitkide bulunan mikrobiyal floranın yapısı ile silajın hazırlanmasında uygulanan işlem gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sınırlarının katılmasıyla hazırlanan yonca silajlarının pH değerleri incelendiğinde, 2G%5STsL ve 2G%10SDsL katkılı silajlardan elde edilen değerler (4.75 ve 4.76) kontrol grubu silajdan elde edilen değerden (5.01) rakamsal olarak düşük; 5G%10SDsL ve 5G%5STsDD katkılı gruplardan elde edilen değerler (5.33 ve 5.06) ise kontrol grubu ile benzer bulunmuştur (Tablo 4.14). Üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sınırlarının katılmasıyla hazırlanan yonca silajlarının pH değerleri incelendiğinde, 2G%5SDsL, 5G%5STsL, 5G%10STsL ve 5G%10STsDD katkılı silajlardan elde edilen değerler (4.91, 4.92, 4.90 ve 5.03) kontrol grubu silajdan elde edilen değerden (5.15) düşük bulunmuştur ($P < 0.01$, Tablo 4.16).

Bir aylık depolama süresi sonunda hazırlanan silajların 2G%5STsL ve 2G%10SDsL katkılı gruplarından elde edilen pH değerleri (4.75 ve 4.76), Kung ve

Shaver (135)'nin kaliteli baklagil silajlar için pH değerinin 4.3-4.7 aralığında olması bildirimine yakın bulunmuştur. Bir ve üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının katılmasıyla hazırlanan yonca silajlarından bir aylık depolama süresi sonunda 2G%5STsL ve 2G%10SDsL; üç aylık depolama süresi sonunda ise 2G%5SDsL, 5G%5STsL, 5G%10STsL ve 5G%10STsDD katkılı gruplardaki pH değerlerinin kontrol ve diğer katkılı gruplara düşük bulunması bu gruplarda laktik asit içeriğinin diğer gruplardan daha yüksek bulunmuş olmasına bağlanabilir. Silajlarda asetik asitin artışı, laktik asit değerlerinin ise azalması ile silaj pH değerinin yükselmesi, asetik asitin laktik asitten daha zayıf bir asit olmasıyla açıklanabilir (136). Homofermentatif LAB silajlık bitki yapısında bulunan SÇK'dan temel ürün olarak laktik asit oluştururken, heterofermentatif LAB ise laktik asitin yanı sıra, etil alkol, asetik asit, diasetil ve karbondioksit gibi ikincil ürünleri üretirler (137). Böylece silo içerisinde artan laktik ve asetik asit miktarları silaj pH değerini düşürmektedir (138). Heterofermentatif LAB olan *L. buchneri*'nin laktik asiti yıkılmayarak silaj pH değerinin yükselmesine, laktik asit değerinin ise azalmasına neden olmaktadır (139,140). Bu çalışmanın bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının katılmasıyla hazırlanan yonca silajlarında laktik asit, asetik asit, pH ve NH₃-N/TN değerleri genel olarak değerlendirildiğinde; 2G%5STsL ve 2G%10SDsL katkılı gruplarda homofermentatif, 5G%10SDsL ve 5G%5STsDD katkılı gruplarda ise heterofermentatif LAB'nin silo içerisinde daha etkin olduklarını düşündürmektedir (Tablo 4.14). Bu çalışmanın üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının katılmasıyla hazırlanan yonca silajlarında laktik asit, asetik asit, pH ve NH₃-N/TN değerleri genel olarak değerlendirildiğinde; 2G%5SDsL, 5G%5STsL ve 5G%10STsL katkılı gruplarda homofermentatif, 5G%10STsDD katkılı grupta ise heterofermentatif LAB'nin silo içerisinde daha etkin oldukları düşünülmektedir (Tablo 4.16). Bu çalışmada bir ve üç ay depolama süresi sonunda hazırlanan kontrol silajlarının pH değerlerinin (5.01 ve 5.15) diğer çalışmalara (68,71,72,73,110,111,115,132) ve beklenen sonuca göre düşük bulunması; silajların hazırlanmasında kullanılan yonca bitkisinin taşıdığı epifitik mikroorganizma yükünden, türünden, vejetasyon döneminden, soldurma işleminden ve parçalama boyutundan kaynaklanabilir (141). Bu çalışmada silajların hazırlanmasında kullanılan yonca bitkisi 3-5 cm uzunluğunda parçalanmış ve bu işleme bağlı olarak

serbest kalan bitki enzimlerinin, daha önce bitki üzerinde bulunan, ancak aktif olmayan bakterileri aktive etmesi, özelliklede LAB popülasyonunu arttırması (31) ve silajın iyi sıkıştırılması ile açıklanabilir.

Bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının katılmasıyla hazırlanan yonca silajlarının $\text{NH}_3\text{-N/TN}$ değerleri incelendiğinde (Tablo 4.14), 2G%5STsL ve 2G%10SDsL katkılı silajlardan elde edilen değerler (%40.57 ve %42.93) kontrol grubu silajdan elde edilen değerden (%50.71) düşük ($P<0.01$) bulunmuştur. Bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının katılmasıyla hazırlanan yonca silajlarından 5G%10SDsL grubundan elde edilen $\text{NH}_3\text{-N/TN}$ değeri (%55.07) kontrol grubu silajdan elde edilen değerden (%50.71) yüksek ($P<0.01$) bulunmuştur. Üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının katılmasıyla hazırlanan yonca silajlarının $\text{NH}_3\text{-N/TN}$ değerleri incelendiğinde (Tablo 4.16), 2G%5SDsL katkılı silajdan elde edilen değer (%25.40) kontrol grubu silajdan elde edilen değerden (%29.66) düşük ($P<0.01$) bulunmuştur. Bu sonuçlar yonca bitkisine fermente edilmiş LAB sıvısı katılarak yapılan birçok çalışmada bu katkının ilavesine bağlı olarak elde edilen silajların $\text{NH}_3\text{-N}$ değerlerini düşürmesi sonucu ile uyumlu bulunmuştur (68,72,73,110,115,142). Homofermentatif LAB inokulant katkısının genellikle silaj $\text{NH}_3\text{-N}$ değerini düşürdüğü, heterofermantatif LAB olan *L. buchneri* inokulasyonunun ise silajlarda maya ve küf sayısını azalttığı, $\text{NH}_3\text{-N}$ üretimini ise arttırdığı bildirilmiştir (63,134,139,143,144). Silo içerisinde meydana gelen proteolizis olayı sırasında bitki bünyesinde bulunan proteaz enzimleri bitkinin yapısında bulunan proteinleri, başta aminoasitler ve amonyak olmak üzere, peptid ve amidlere parçalar, bunun sonucu olarak silaj $\text{NH}_3\text{-N}$ değerlerinde artışlar şekillenir (9). Silonun iyi sıkıştırılıp sıkıştırılmaması, silo içerisindeki laktik asit üretim hızı ve silajlık bitkinin KM içeriği silaj $\text{NH}_3\text{-N}$ değeri ile yakından ilişkilidir. Silo içerisinde laktik asit artışına bağlı olarak proteinlerin yıkılması ve proteolizis azalır (36). Bu çalışmada bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının katılmasıyla hazırlanan yonca silajlarından 2G%5STsL ve 2G%10SDsL katkılı gruplarda tespit edilen laktik asit değerlerinin (45.89 ve 35.44 g/kg KM) kontrol grubundan (28.41 g/kg KM) yüksek bulunması, 2G%5STsL ve 2G%10SDsL katkılı gruplarda $\text{NH}_3\text{-N/TN}$ değerlerinin düşük belirlenmesinin bir sebebi olarak düşünülebilir. Carpintero ve ark.

(145) silaj $\text{NH}_3\text{-N/TN}$ değerinin %11 ve altında bir değerde bulunması halinde o silajın kaliteli silaj olarak değerlendirilebileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada bir ve üç aylık depolama süresi sonunda hazırlanan silajların $\text{NH}_3\text{-N/TN}$ değerleri (Tablo 4.14 ve 4.16) genel olarak değerlendirildiğinde, elde edilen değerler Carpintero ve ark. (145)'nın bildirdikleri değerden çok yüksek bulunmuş ve bu çalışmada hazırlanan yonca silajlarında proteolizisin yoğun şekilde olduğu kanaatine varılmıştır.

Biçim öncesi bitkiye bulaşık olan LAB sayısı 1×10^1 kob/gr'dan 1.0×10^7 kob/gr'a kadar değişebilmekte ve silajı yapılacak bitkilere bulaşık olan LAB sayısında ve türlerinde farklılıklar olabilir. Taze yonca materyalindeki epifitik LAB sayısı üzerine, bitkiye uygulanan soldurma işlemi, sıcak çevresel koşullar ve biçim dönemi ve sayısı bitkinin doğal yapısında bulunan LAB değerlerini arttırıcı yönde etki gösterdiği bildirilmektedir (31, 44). Bu çalışmada bir aylık depolama süresi sonunda hazırlanan silajlarda kullanılan bitki materyali ikinci biçim olup, hava ve çevresel sıcaklığın henüz yükselmediği dönemde (Mayıs ayı) biçilen yoncadan, üç aylık depolama süresi sonunda hazırlanan silajlarda kullanılan bitki materyali ise beşinci biçim olup, hava ve çevresel sıcaklığın en yüksek olduğu dönemde (Temmuz ayı) biçilen yoncadan oluşmuş ve her iki dönemde de silaj hazırlanması öncesinde bitkiye soldurma işlemi uygulanmıştır. Silaja ilave edilen LAB inokulantlarının etkili olabilmesi için kullanılan doz değerinin, silajı yapılacak bitkinin yapısında bulunan doğal LAB sayısından daha fazla miktarda olması gerektiği bildirilmektedir (46). Bu çalışmada bir ve üç ay süre ile depolanan LAB sıvılarının ilave edilmesi ile hazırlanan silajların pH ve $\text{NH}_3\text{-N}$ değerlerinin beklenen ve arzu edilen sonuçlara ulaşmamasının nedeni; silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisi üzerindeki epifitik LAB sayısının 10^5 kob/gr den daha fazla olduğu ve bu çalışmada kullanılan LAB sıvılarının uygulama dozunun yetersiz kalmasından kaynaklanmış olabileceği olarak düşünölebilir.

Bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının katılmasıyla hazırlanan silajların laktik asit değerleri (Tablo 4.14) incelendiğinde, 2G%5STsL katkılı gruptan elde edilen değer (45.89 g/kg KM); kontrol grubu silajdan elde edilen değerden (28.41 g/kg KM) yüksek bulunmuştur ($P < 0.01$). Üç aylık depolama süresi sonunda hazırlanan silajların laktik asit değerleri (Tablo 4.16) incelendiğinde ise, 2G%5SDsL, 5G%5STsL ve 5G%10STsL katkılı gruplardan elde edilen değerler (26.09, 25.41 ve 23.68 g/kg KM); kontrol ve 5G%10STsDD katkılı

silajlardan elde edilen değerlerden (14.19 ve 12.67 g/kg KM) yüksek bulunmuştur ($P<0.01$). Bu çalışmada bir aylık depolama süresi sonunda hazırlanan 2G%5STsL ve 2G%10SDsL grubu silajların laktik asit değerleri yapılmış bazı çalışmalardan elde edilen değerler ile uyumlu bulunmuştur (66,68,71,72,73,115,142). Fermente edilmiş LAB sıvıları katılarak hazırlanan silajlarda laktik asit değerinin artışı, silo içerisinde LAB'nin fermentasyonuna bağlı olarak silaj pH değerinin azalmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (146). Kaliteli bir silajda laktik asit oranının toplam silaj asitlerinin %65-70'i düzeyinde olması gerekmektedir (135). Bu çalışmanın bir aylık depolama süresi sonunda kontrol, 5G%10SDsL ve 5G%5STsDD katkılı grupların toplam silaj asitleri içerisindeki laktik asit oranları (%60, %46 ve %44) belirtilen oranın altında kalırken, 2G%5STsL ve 2G%10SDsL katkılı grupların toplam silaj asitleri içerisindeki laktik asit oranları (%62 ve %66) yakın bulunmuştur. Bu çalışmanın üç aylık depolama süresi sonunda kontrol, 2G%5SDsL, 5G%5STsL, 5G%10STsL ve 5G%10STsDD katkılı grupların toplam silaj asitleri içerisindeki laktik asit oranları (%50, %58, %60, %61 ve %42) Kung ve Shaver (135) bildirdiği oranın altında kalmıştır.

Bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının katılmasıyla hazırlanan yonca silajlarının asetik asit değerleri (Tablo 4.14) incelendiğinde; 2G%10SDsL, 5G%10SDsL ve 5G%5STsDD katkılı gruplardan elde edilen değerler (19.50, 24.25 ve 25.31 g/kg KM), kontrol grubu silajdan elde edilen değerden (13.29 g/kg KM) yüksek bulunmuştur ($P<0.01$). Kontrol grubu ile kıyaslandığında fermente edilmiş LAB sıvısı katkısına bağlı olarak silajların asetik asit değerlerindeki artışlar bu konuda yapılmış bazı çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur (68,72,73). Üç aylık depolama süresi sonunda hazırlanan silajların asetik asit değerleri (Tablo 4.16) incelendiğinde, katkılı gruplardan elde edilen değerler rakamsal olarak artış göstermelerine karşın kontrol grubundan elde edilen değer ile benzer bulunmuştur.

Bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının katılmasıyla hazırlanan yonca silajlarının aerobik stabilite parametresine ilişkin CO₂ değerleri incelendiğinde, tüm katkılı gruplardan elde edilen CO₂ değerleri kontrol grubu silajdan elde edilen değerden (9.07 gr/kg KM) düşük bulunmuş ($P<0.01$), üç aylık depolama süresi sonunda hazırlanan silajlarda ise istatistiksel fark

görülmemesine karşın rakamsal olarak azalma belirlenmiştir (Tablo 4.14, Tablo 4.16). Silaj asetik asit değeri ile silajın aerobik stabilite değerleri arasında doğru bir ilişki bulunmaktadır. Asetik asit silaj açıldıktan sonra silajın bozulmasına neden olan mikroorganizmalara karşı inhibitör etki yapmakta, mayaların üremesini ve aktivite göstermelerini engellemektedir (139, 140). Heterofermentatif LAB'nin ürettikleri asetik asit miktarının artışına bağlı olarak silajın aerobik stabilite değerinin arttığı ve silajın yedirme sürecinde aerobik bozulma süresinin uzadığı görülmüştür (143). Üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sınıflarının katılmasıyla hazırlanan yonca silajlarının aerobik stabilite parametresine ilişkin asetik asit ve CO₂ değerlerinde incelendiğinde; tüm katkılı gruplardan elde edilen asetik asit değerleri, kontrol grubu silajlardan elde edilen değerlerden istatistiksel fark görülmemesine karşın rakamsal olarak artış belirlenirken, CO₂ değerleri ise; kontrol grubu silajdan elde edilen değerden (5.12 gr/kg KM) istatistiksel fark görülmemesine karşın rakamsal olarak azalma belirlenmiştir (Tablo 4.16). Asetik asitin CO₂ üretimini azaltıcı yani aerobik stabilite değerlerini yükseltici etkisi üç aylık depolama süresi sonunda hazırlanan silajlarda belirgin olarak görülmüştür. Heterofermentatif LAB silo içerisinde bulunan SÇK artışına bağlı olarak asetik asit üretimini artırmaktadırlar. Bu nedenle silajlarda laktik:asetik asit oranı fermente edilebilen SÇK içeriğine göre değişmektedir. Silaj fermentasyonu sürecinde silo içerisinde anaerobik mikroorganizmalardan olan *L. brevis* veya *L. buchneri* gibi LAB'nin etkin olması istenirken, *Clostridia*, *Enterobacteriaceae*, *Bacilli* ve *Listeria* gibi bakteriler, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Issatchenkia* ve *Saccharomyces* türü mayalar, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Pencillium* türü küf mantarlarının üremesi ve aktivite göstermeleri istenmemektedir. Bu tür bakteri, maya ve küflerin gelişimi silajın pH değerini yükselterek silaj kalitesinin düşmesine ve dolayısıyla silajın aerobik stabilite değerlerinin azalmasına neden olmaktadır (24,140,147,148). Söz konusu mikroorganizmalar özellikle gelişme ve çoğalma dönemlerinde silo içerisinde bulunan SÇK, laktik ve asetik asit gibi fermentasyon ürünlerini tüketerek yüksek miktarlarda besin madde kaybına neden olurlar. Bunun sonucunda silo içerisinde CO₂ ve su açığa çıkarak silo içi sıcaklık değerleri artar (149). Silolanan materyalin KM içeriği elde edilen silajın aerobik stabilite değerini etkileyen önemli bir faktördür. Nitekim KM içeriği düşük olan materyallerle yapılan silajların aerobik stabilite değerlerinin düştüğü bildirilmektedir (61). Bu çalışmada bir aylık

depolama süresi sonunda hazırlanan silajlar için kullanılan yonca bitkisinin KM değeri (%20.30), üç aylık depolama süresi sonunda hazırlanan silajlar için kullanılan yonca bitkisinin KM değerinden (%23.80) düşük tespit edilmiştir. Bir aylık depolama sonunda hazırlanan kontrol ve katkılı silajların CO₂ üretim değerleri, üç aylık depolama sonunda hazırlanan silajların CO₂ üretim değerlerinden yüksek bulunmasının sebebi, bir aylık depolama süresi sonunda hazırlanan silajlarda, silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisinin KM değerinin düşük olmasından kaynaklanabilir.

Bir aylık depolama süresi sonunda hazırlanan silajların bütirik asit değerleri (Tablo 4.14) incelendiğinde, 2G%5STsL ve 2G%10SDsL katkılı gruplardan elde edilen değerler (3.10 ve 3.65 g/kg KM) kontrol grubundan elde edilen değerden (5.31 gr/kg KM) düşük, 5G%10SDsL ve 5G%5STsDD katkılı gruplardan elde edilen değerler ise (7.42 ve 7.51 g/kg KM) yüksek bulunmuştur (P<0.01). Üç aylık depolama süresi sonunda hazırlanan silajların bütirik asit değerleri incelendiğinde (Tablo 4.16), kontrol ve 5G%10STsDD grubu silajlarda 4.31 ve 4.12 g/kg KM olarak; kontrol grubu ile kıyaslandığında 2G%5SDsL, 5G%5STsL ve 5G%10STsL gruplarında bütirik asit değerleri sırasıyla 2.92, 2.98 ve 2.95 g/kg KM düşük olarak belirlenmiştir (P<0.01). Bir aylık depolama süresi sonunda 2G%5STsL ve 2G%10SDsL; üç aylık depolama süresi sonunda ise 2G%5SDsL, 5G%5STsL ve 5G%10STsL katkılı gruplardan elde edilen bütirik asit değerlerinin kontrol grubundan düşük bulunması, bu gruplarda pH değerlerinin düşük, laktik asit değerlerinin ise yüksek bulunması ile açıklanabilir. Taze silajlık materyallerde *Clostridia* türü mikroorganizmalar ya çok az bulunur ya da hiç bulunmaz iken, hasat esnasında topraktan silaj materyaline önemli ölçüde *Clostridia* türü mikroorganizma kontaminasyonu söz konusu olabilmektedir (150). *Clostridialar*; sakkarolitik ve proteolitik *Clostridialar* olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Sakkarolitik olanlar, SÇK ve laktik asiti, bütirik aside fermente ederek silajın pH değerinin yükselmesine neden olurken, proteolitik *Clostridialar* ise çoğunlukla aminoasitler olmak üzere çeşitli bileşikleri asetik asit, bütirik asit, amin ve amonyak gibi çeşitli ürünlere fermente ederler (15). Bütirik asitin silaj pH değerini yükseltmesi, laktik asite kıyasla bütirik asitin daha zayıf bir asit olmasından kaynaklanmaktadır. Kuru madde içeriği %30-35'den daha düşük olan silajlık materyallerden hazırlanan silajlarda *Clostridial* fermentasyonun olduğu bildirilmektedir (11). Bu çalışmada bir ve üç aylık depolama süreleri sonunda silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisinin,

HP değerlerinin (%23.70 ve %19.73 KM) yüksek, KM (%20.30 ve %23.80) ve SK içeriğinin (71.10 ve 76.20 g/kg KM) düşük olması, *Clostrodial* bakterilerin gelişimini inhibe etmek için gerekli olan laktik asit üretiminin yetersizliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (143). Bu çalışmada bir ve  aylık depolama süresi sonunda hazırlanan silajlarda, silaj materyali olarak kullanılan yonca bitkisinin KM ve SK değerlerinin düşüklüğüne bağlı olarak sakkarolitik *Clostridialar*'ın, bitki yapısındaki SK ve silajda oluşan organik asitleri bütirik aside dönüştürmüş olabileceklerini düşündürmektedir (15).

Kaliteli bir baklagil silajında KM değerinin %30-40, pH değerinin 4.3-4.7, laktik asit değerinin 70-80 g/kg KM, asetik asit değerinin 20-30 g/kg KM, propiyonik ve bütirik asit değerlerinin 5 g/kg KM, NH₃-N/TN değerinin ise yaklaşık %10-15 civarında olması tercih edilmektedir (135). Bu çalışmada bir ve  aylık depolama süreleri sonunda hazırlanan silajlara LAB sıvılarının katılması ile elde edilen silajların KM ve laktik asit değerlerinin belirtilen değerlerden düşük, pH değerleri ise yüksek tespit edilmiştir. Bu çalışmada bir aylık depolama süresi sonunda hazırlanan silajlara LAB sıvılarının katılması ile elde edilen katkılı grupların tamamından elde edilen asetik asit değerleri ile 2G%5STsL ve 2G%10SDsL gruplarından elde edilen bütirik asit değerleri Kung ve Shaver (135)'in bildirimini ile uyumlu bulunurken,  aylık depolama süresi sonunda hazırlanan silajların tamamından elde edilen asetik ve bütirik asit değerleri düşük bulunmuştur.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmanın birinci denemesinde farklı seviyelerde süzkroz (%3, %5 ve %10) ilavesi ve farklı sürelerde (2, 5 ve 10 gün) inkübasyonla hazırlanmış fermente edilmiş LAB sıvılarına kryoprotektan olarak TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) ilave edilerek derin dondurucuda dondurularak ve liyofilizasyon işlemi ile kurutularak bir ve üç ay süre ile depolanması sonucunda elde edilen LAB sıvılarının LAB değerlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında elde edilen bulgulara göre derin dondurucuda dondurulma ve liyofilizasyon ile kurutulma işlemi uygulanmadan taze olarak kullanılacak fermente edilmiş LAB sıvılarında %10 süzkroz ilavesi ile iki veya beş günlük inkübasyon süresinin yüksek düzeyde LAB elde edilmesi için yeterli olacağı düşünülmektedir. Fermente edilmiş LAB sıvılarının bir aylık depolama süresinde liyofilazasyon işleminin derin dondurucuda dondurulma işlemine göre canlılık oranlarını daha iyi koruduğu ve en yüksek LAB değerlerinin %10 süzkroz ilavesiyle iki ve beş günlük inkübasyon süresinde kryoprotektan olarak DMSO (Ds) katılarak liyofilize edilmiş gruplarda (9.47×10^{10} ve 1.00×10^{11} kob/ml) olduğu belirlenmiştir. Üç aylık depolama süresinde de liyofilazasyon işleminin derin dondurucuda dondurulma işlemine göre canlılık oranlarını daha iyi koruduğu ve en yüksek LAB değerlerinin %5 ve %10 süzkroz ilavesi ve beş günlük inkübasyon süresinde kryoprotektan olarak TRİS (Ts) katılarak liyofilize edilmiş gruplarda (4.00×10^{10} ve 4.60×10^{10} kob/ml), DMSO (Ds) katılarak liyofilize edilmiş iki günlük inkübasyon süresinde %5 süzkroz katkılı grupta (7.33×10^{10}) olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmanın birinci denemesinde hazırlanarak bir ve üç ay süre ile depolanan LAB sıvılarından elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde; inkübasyon ve depolama süresinin uzamasına bağlı olarak elde edilen LAB sıvılarındaki canlılık oranlarında azalmaların görüldüğü, ayrıca TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) katkısının canlılık oranları üzerine olumlu etki yaptığı, liyofilizasyon işleminin ise derin dondurucuda dondurulma işlemine göre avantajlı olduğu söylenebilir. Dolayısıyla fermente edilmiş LAB sıvılarının uzun süreli depolanmalarında TRİS (Ts) veya DMSO (Ds) kryoprotektanları ilave edilerek liyofilizasyon işlemi ile kurutulmaları tavsiye edilebilir.

Çalışmanın ikinci denemesinde ise, birinci denemeden elde edilen veriler ışığında bir ve üç ay süre ile dondurulmuş ve liyofilize edilmiş LAB sıvılarından en yüksek LAB değerlerine sahip olan fermente edilmiş LAB sıvılarından her bir depolama süresi için dört grup olacak şekilde yonca bitkisinden hazırlanan silajlara ilave edilerek yonca silajı kalitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Bir aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının ilave edilmesi ile hazırlanan yonca silajlarında CO₂ değerlerinin azaldığı dolayısıyla aerobik stabilite değerlerinin arttığı görülmüştür. En yüksek laktik asit içeriği %5 sükroz katkısı ile iki günlük inkübasyon süresi sonunda TRİS (Ts) ilavesi ve liyofilizasyon işlemi ile kurutulan grupta (2G%5STsL); en yüksek asetik asit içeriği %5 sükroz katkısı ile beş günlük inkübasyon süresi sonunda TRİS (Ts) ilavesi ve derin dondurucuda dondurulan grupta (5G%5STsDD) belirlenmiştir. Üç aylık depolama süresi sonunda en yüksek LAB değerlerine sahip LAB sıvılarının ilave edilmesi ile hazırlanan yonca silajlarında pH değerlerinin azaldığı, laktik asit değerlerinin ise arttığı görülmüştür. Farklı seviyelerde sükroz ilavesi ile değişik sürelerde inkübasyona bırakılarak elde edilen LAB sıvılarının liyofilize edilerek ve derin dondurucuda dondurularak depolanmaları (1 ve 3 ay) ile elde edilen katkıların yonca bitkisinden hazırlanan silajlara ilave edilmeleri ile silaj fermentasyon kalitesinin kısmi olarak yükseldiği görülmüştür. Bu çalışmada fermente edilmiş LAB sıvıları genel olarak silajlara LAB inokulantı katılması yönünde bildirilen dozda (taze silaj materyaline 10⁵ kob/gr) ilave edilmiştir. Ancak bu çalışmada silaj materyali olan yonca bitkilerinin SÇK değerlerinin düşük, tamponlama kapasitelerinin ise yüksek olduğu gözönünde bulundurulduğunda, bu çalışmada pH ve NH₃-N/TN parametreleri açısından beklenen ve arzu edilen sonuçlara ulaşamamasının nedeni; çalışmada kullanılan dozun yetersiz kalmasından kaynaklanmış olabilir. Baklagiller ile yapılacak çalışmalarda katkı dozunun, taze silaj materyaline 10⁵ kob/gr'dan daha yüksek olması gerektiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada LAB sıvılarının TRİS (Ts) ve DMSO (Ds) kryoprotektanları katkıları ile liyofilize edilerek kurutulmalarından elde edilen yüksek canlılık oranları dikkate alındığında elde edilen LAB sıvılarının silaj katkısı olarak kullanılabilme ve ticarileştirme potansiyelinin yüksek olduğu görülmektedir. Ancak uygulamanın pratikte kullanılabilmesi için liyofilize edilerek elde edilen LAB sıvısının ticari LAB

inokulantları ile karşılaştırmalı olarak büyük silolarda ve değişik silaj materyalleri ile hazırlanacak silajlarda araştırılmasının gerektiği kanısına varılmıştır.



7. KAYNAKLAR

1. Tümer S. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayın No:104 Menemen, İzmir, 2001.
2. Muck RE. Inoculation of Silage and Its Effects on Silage Quality. In: Informational Conference with Dairy and Forage Industries. US Dairy Forage Res Center 1996. p. 43-51.
3. McDonald P, Edwards JFD. Animal Nutrition. Printed by Ashford Colour Pres Ltd., Gosport; 2002.
4. Zimmer E. Factors Affecting Silage Fermentation in Silo. Technological Papers Presented at International Silage Research Conference, December 6-8, Washington, D.C., Iowa, USA, 1971.
5. Bolsen KK, Brent BE, Siefers MK, Huck GL, Turner JE, Young Matthew A. Kansas State University. Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service 2010.
6. Filya İ. Silaj fermentasyonu. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 2001; 32 (1):87-93.
7. Keleş G, Yazgan O. Bakteriyel İnokulantların Silaj Fermentasyonu ve Hayvan Performansına Etkileri. Hay Araş Derg 2005, 15(1):26-34.
8. Bolsen KK, Ashbell G; Weinberg ZG. Silage Fermentation and Additives. AJAS Reviews 1996; 9 (5):483-489.
9. McDonald P, Henderson A, Heron SJE. The Biochemistry of Silage (2nd Ed.). Chalcombe Publ., Churchiane, Kingston, Canterbury, Kent, UK. 1991.
10. Muck RE. Silage Microbiology and Its Control Through Additives. Revista Brasileira de Zootecnia 2010; 39:183-191.
11. Kendall NVG. Anormal Silages and Silage Related Disease Problems. In: Literature Review on Fermentation of Silage- A Review. Edt. M.E. McCullough. Grants-in-Aid Committee. National Feed Ingredients Association. One Corporate Place, Suite 360 West Des Moines, Iowa 1978; 50265, 281:332.
12. Seglar B. Fermentation Analysis and Silage Quality Testing. Retrieved from the University of Minnesota Digital Conservancy, 2003.
13. Kılıç A. Silo Yemi (Öğretim, Öğrenim ve Uygulama Önerileri) İzmir: Bilgehan Basımevi; 1986.
14. Rasic JR, Kurmann JA. Cultures and Starters. Scientific Grounds, Technology, Manufacture and Preparations Yoghurt. Technical Dairy Publishing House Jyllingevej 1978; 39:186-214.
15. McDonald P. The Biochemistry of Silage. John Wiley, Sons. Chalcome Publications 1981; p. 226
16. Thomas JW. Preservatives for Conserved Forage Crops. Journal of Animal Science 1978; 47(3):721-735.
17. Pitt RE. A Model of Cellulase and Amylase Additives in Silage. Journal of Dairy Science 1990b; 73(7): 1788-1799.
18. Messi P, Bondi M, Sabia C, Batini R, Manicardi G. Detection and Preliminary Characterization of a Bacteriocin (Plantaricin 35d) Produced By a Lactobacillus Plantarum Strain. International Journal of Food Microbiology 2001; 64:193-198.

19. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock Biology of Microorganisms. Vol. 11. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall; 1997.
20. Davies DR, Merry RJ, Bakewell EL. The Effect of Timing of Slurry Application on the Microflora of Grass and Changes Occurring During Silage Fermentation. Grass and Forage Science 1996.
21. Honig H. Silage Quality and Losses Farm Scale Silage Experiments. Proceedings of the Eurobac Conference, 12-16 August, Uppsala, Sweden 1986a; 60-64.
22. Zimmer E. Evaluation of Fermentation Parameters from the Silage Experiments. Proceedings of Eurobac Conference, 12-16 August 1986, Uppsala, Sweden, 1986; 19-44.
23. Kurtoğlu V. Mikrobiyel İnokulant ile Hazırlanan Yonca Silajının Süt İneklerinde Süt Verimi ve Bileşimi ile İnokulasyonun Silaj Kalitesi Üzerine Etkisi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Konya, 1998.
24. Basmacıoğlu H, Ergül M. Silaj mikrobiyolojisi. Hayvansal Üretim 2002. 43.(1):12-24.
25. Pitt RE, Muck RE, Leibensperger RY. A Quantitative Model of the Ensilage Process in Lactate Silages. Grass Forage Science 1985; 40:279-303.
26. Ünlütürk A. Süt ve Süt Ürünlerinde Mikrobiyolojik Bozulmalar. Patojen Mikroorganizmalar ve Muhafaza Yöntemleri, Ünlütürk A, Turantaş F (ed): Gıda Mikrobiyolojisi. İzmir: Mengi Tan Basım Evi; 1998. 298-307.
27. Woolford MK. The Detrimental Effects of Air on Silage. Journal of Applied Bacteriology 1990; 68(2):101-116.
28. Jonsson A. The Role of Yeasts and Clostridia in Silage Deterioration, Identification and Ecology 1991; 0376-0376.
29. Woolford MK. A Preliminary Investigation into the Role of Yeasts in the Ensiling Process. Journal of Applied Bacteriology 1976; 41(1):29-36.
30. Henderson AR, McDonald P, Woolford MK. Chemical Changes and Losses during the Ensilage of Wilted Grass Treated with Formic Acid. Journal of the Science of Food and Agriculture 1972; 23 (9):1079-1087.
31. Lin C, Bolsen KK, Brent BE, Fung DYC. Epiphytic Lactic Acid Bacteria Succession during the Pre-Ensiling and Ensiling Periods of Alfalfa and Maize. Journal of Applied Bacteriology 1992; 73 (5):375-387.
32. Ruppel KA, Pitt RE, Chase LE, Galton DM. Bunker Silo Management and Its Relationship to Forage Preservation on Dairy Farms. Journal of Dairy Science 1995; 78(1): 141-153.
33. Gray ML, Killinger AH. Listeria Monocytogenes and Listeric Infections. Bacteriological Reviews 1966; 30 (2):309.
34. Haigh PM, Appletont M, Clench SF. Effect of Commercial Inoculant and Formic Acid±Formalin Silage Additives on Silage Fermentation and İntake and on Liveweight Change of Young Cattle. Grass and Forage Science 1987; 42(4): 405-410.
35. Pahlow G. Wie Lassen Sich Silagen Verbessern. Agrar - press Nr. 5/89 7. Honorar Erbeten Auf PSK Köln, 1989; 171604-504.
36. Davies DR, Merry RJ, Williams AP, Bakewell EL, Leemans DK, Tweed JKS. Proteolysis During Ensilage of Forages Varying in Soluble Sugar Content. Journal of Dairy Science 1998; 81 (2):444-453.

37. Oliveira AS. et al. Meta-analysis of Effects of Inoculation with Homofermentative and Facultative Heterofermentative Lactic Acid Bacteria on Silage Fermentation, Aerobic Stability, and the Performance of Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 2017; 100 (6):4587-4603.
38. Weinberg ZG, Muck RE. New Trends and Opportunities in the Development and Use of Inoculants for Silage. *FEMS Microbiol. Rev* 1996; 19: 53-68.
39. Ashbell G, Weinberg ZG, Hen Y, Filya I. The Effects of Temperature on the Aerobic Stability of Wheat and Corn Silages. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2002; 28 (5):261-263.
40. Yıldız C, Öztürk İ, Erkmén Y. Hasat Dönemi, Kıyma Boyutu ve Sıkıştırma Basıncının Sorgum-Sudanotu Melezi (*Sorghum Sudanense* Staph.) Silajının Yem Niteliği Üzerine Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 2011; 41(2):137-143.
41. Hutnik E, Sylwester K. Density of Silage Stored in Horizontal Silos. *Acta Agrophysica* 2012; 19: 3.
42. Filya İ. Silaj Yapımı, Teknolojisi ve Kullanımı. *Süt Hayvancılığı Eğitim Merkezi Yayınları, Hayvancılık Serisi* 2005; 8:25-26.
43. Leibensperger RY, Pitt RE. A Model of Clostridial Dominance in Ensilage. *Grass and Forage Science* 1987; 42 (3):297-317.
44. Lindgren S, Pettersson K, Kaspersson A, Jonsson A, Lingvall P. Microbial Dynamics During Aerobic Deterioration of Silages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1985; 36 (9):765-774.
45. Laytimi A, Bolsen K, Schurhammer J, Kirch B. Effect of Enzyme and Inoculant Additives on Preservation and Feeding Value of Wheat and Forage Sorghum Silages. *Kansas Agric. Experiment Station Research Reports* 1988; 1:99-207.
46. Pahlow G, Honig H. Wirkungsweise Und Einsatzgrenzen Von Silage-Impfkulturen Aus Milchsäurebakterien. 1. Mitteilung. *Das Wirtschaftseigene Futter* 1986; 32 (1):20-35.
47. Spoelstra SF, Hindle VA, Inoculating Grass for Silage By Spraying the Standing Crop. *Proceedings of the Eurobac Conference, 1986 August 12-16; 115-125 Uppsala, Sweden.*
48. Kung JrL. Silage fermentation and additives. *Science and Technology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's 17th Annual Symposium* 2001. 145:159
49. Jones R, Gogerddan P. The Importance of Quality Fermentation in Silage Making and Future Trends in Forage Production. *Alltech. 8 th Annual European Lecture Tour, February-21. Marc* 1994; 9 (33):5.
50. Muck R. Inoculants for Corn Silage. *Focus on Forage.* 2000. 2:2
51. Pahlow G. Microbiology of Inoculants, Crops and Silages: Small Scale Silage Experiments, *Proceedings of the Eurobac Conference; 12-16 August 1986 45-59; Uppsala, Sweden.*
52. Ozduven M, Onal ZK, Koc F. The Effects of Bacterial Inoculants and/or Enzymes on the Fermentation, Aerobic Stability and in Vitro Dry and Organic Matter Digestibility Characteristics of Triticale Silages. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2010; 16 (5):751-756.
53. Woolford MK. *The Science and Technology of Silage Making. Alltech Technical Publ.* 1999.

54. Jones R. Role of Biological Additives in Crop Conservation. Biotechnology in the Feed Industry, Proc. of the 11th Annual Symposium; (TP Lyons and KA Jacques, Eds.), Nottingham Univ. Press; 1995. p. 627.
55. Filya I. Laktik Asit Bakteri ve Laktik Asit Bakteri Enzim Karışımı Silaj İnokulantlarının Mısır Silajı Üzerine Etkileri. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 2002; 26: 679-687.
56. Filya I, Sucu E, Hanoğlu H. Biyolojik Silaj Katkı Maddeleri Kullanılarak Yapılan Küçük Plastik Balya Mısır Silajlarının Kalite Özellikleri, Yem Değeri ve Kuzu Besisinde Kullanımı Üzerine Bir Araştırma. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi 2004; 10 (2):158-162.
57. Rust SR, Kim HS, Enders GL. Effects of A Microbial Inoculant on Fermentation Characteristics and Nutritional Value of Corn Silage. Journal of Production Agriculture 1989; 2(3):235-241.
58. Moon MJ, Ely LO, Sudweeks EM. Aerobic Deterioration Wheat, Lucerne and Maize Silages Prepared with *L. Acidophilus* and *A. Candida* Spp. Journal of Applied Bacteriology 1980; 49:75.
59. Woolford MK. The Aerobic Deterioration of Silage. Common. Agric. Bur., Farnham Royal, Slough SL2 3BN, England, 1978.
60. Weinberg ZG, Ashbell G, Azrieli A, Brukental I. Ensiling Peas, Ryegrass and Wheat with Additives of Lactic Acid Bacteria (LAB) and Cell Wall Degrading Enzymes. Grass and Forage Science 1993; 48(1):70-78.
61. Filya I, Ashbell G, Hen Y, Weinberg ZG. The Effect of Bacterial Inoculants on the Fermentation and Aerobic Stability of Whole Crop Wheat Silage. Animal Feed Science and Technology 2000; 88 (1-2):39-46.
62. Filya I. The Effect of *Lactobacillus Buchneri*, with or without Homofermentative Lactic Acid Bacteria, on the Fermentation, Aerobic Stability and Ruminal Degradability of Wheat, Sorghum and Maize Silages. Journal of Applied Microbiology 2003; 95 (5):1080-1086.
63. Kung JrL, Taylor CC, Lynch MP, Neylon JM. The Effect of Treating Alfalfa with *Lactobacillus Buchneri* 40788 on Silage Fermentation, Aerobic Stability, and Nutritive Value. J. Dairy Science 2003; 86:336-343.
64. Contreras-Govea FE, Marsalis MA, Lauriault LM. Silage Microbial Inoculants: Use in Hot Weather Conditions. NM State University, Cooperative Extension Service; 2009.
65. Kung L, Muck RE. Animal Response to Silage Additives. Silage Field to Feedbunk 1997; 72:200-210.
66. Jin-ling H, Li-ke W, Si-fa D. Effects of Previously Fermented Juice on Nutritive Value and Fermentative Quality of Rice Straw Silage. Journal of Northeast Agricultural University (English Edition) 2013; 20 (2):48-52.
67. Chunjian L, Bolsen KK, Fung DY, Fung B. Epiphytic Lactic Acid Bacteria Succession During the Pre-Ensiling Periods of Alfalfa and Maize. Journal of Applied Bacteriology, 1992; 73(5), 375-387.
68. Denek N, Can A, Avci M, Aksu T, Durmaz H. The Effect of Molasses-Based Pre-Fermented Juice on the Fermentation Quality of First-Cut Lucerne Silage. Grass and Forage Science 2011; 66 (2):243-250.
69. Denek N, Can A, Avci M, Aksu T. The Effect of Fresh and Frozen Pre-Fermented Juice on the Fermentation Quality of Alfalfa Silage. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2012; 18 (5):785-790.

70. Cao LM, Goto M, Ohshima M. Variations in the Fermentation Characteristics of Alfalfa Silage of Different Harvest Times As Treated with Fermented Juice of Epiphytic Lactic Acid Bacteria. *Grassland Science* 2002; 47 (6):583-587.
71. Wang J, Wang JQ, Zhou H, Feng T. Effects of Addition of Previously Fermented Juice Prepared from Alfalfa on Fermentation Quality and Protein Degradation of Alfalfa Silage. *Animal Feed Science and Technology* 2009; 151(3-4):280-290.
72. Ohshima M, Kimura E, Yokota HO. A Method of Making Good Quality Silage from Direct Cut Alfalfa By Spraying Previously Fermented Juice. *Animal Feed Science Technology* 1997b; 66:129-137
73. Nishino N, Uchida S. Laboratory Evaluation of Previously Fermented Juice As A Fermentation Stimulant for Lucerne Silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1999; 79 (10):1285-1288.
74. Ohshima M, Cao LM, Kimura E, Yokota HO. Influence of Addition of Previously Fermented Juice to Alfalfa Ensiled at Different Moisture Contents. *Grassland Science* 1997a; 43 (1): 56-58.
75. Ohshima M, Ohshima Y, Kimura E, Yokota HO. Fermentation Quality of Alfalfa and Italian Ryegrass Silages Treated with Previously Fermented Juice Prepared from Both the Herbage. *Animal Feed Science and Technology* 1997c; 68:41-44.
76. Öztürk S, Çakır İ. Mikroorganizma Kültürlerinin Korunmasında Kullanılan Kurutma Yöntemleri. *Academic Food Journal* 2015; 13:1.
77. Meryman HT. Principles of freeze-drying. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1960; 85 (2):630-640.
78. Lapage SP, Shelton JE, Mitchell TG, Mackenzie AR. Chapter II Culture Collections and the Preservation of Bacteria. *Methods in Microbiology*. Academic Press; 1970; 3:135-228.
79. Cemeroglu B. Gıda Maddelerinin Dondurarak Kurutulma Prensipleri. A. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları No: 501. Ankara Üniversitesi Basımevi; 1976.
80. Dolan Jr, James P. Use of Volumetric Heating to Improve Heat Transfer During Vial Freeze-Drying Diss. Virginia Polytechnic Institute and State University 1998.
81. Sadıkoğlu H, Özdemir M. Dondurarak Kurutma Teknolojisi. *Termoklima* 2001; 102:53-61.
82. Krokida MK, Karathanos VT, Maroulis ZB. Effect of Freeze-Drying Conditions on Shrinkage and Porosity of Dehydrated Agricultural Products. *Journal of Food Engineering* 1998; 35(4):369-380.
83. Sadıkoğlu H. Optimal Control of the Secondary Drying Stage of Freeze Drying of Solutions in Vials Using Variational Calculus. *Drying Technology* 2005; 23(1-2): 33-57.
84. Shishegarha F, Makhlof J, Ratti C. Freeze-Drying Characteristics of Strawberries. *Drying Technology* 2002; 20(1):131-145.
85. Özkara T. Dondurarak Kurutma Yöntemi ile Saklanan Greftlerin Mekanik Özellikleri Üzerine Radyasyonla Sterilizasyonun Etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2003.
86. Bâati L, Fabre-Gea C, Auriol D, Blanc PJ. Study of the Cryotolerance of *Lactobacillus Acidophilus*: Effect of Culture and Freezing Conditions on the Viability and Cellular Protein Levels. *International Journal of Food Microbiology* 2000; 59 (3):241-247.

87. Béal C, Fernanda F. Freezing of Probiotic Bacteria. *Advances in Probiotic Technology* 2015; 179-212.
88. Robson EM, Rowe TWG. *The Physics of Secondary Drying*. Parkes, AS. and Smith. AU (Eds), *Recent Research in Freezing and Dying*, Blackwell, Oxford 1960; 146-166.
89. Pınarkara Y. Liyofilizasyon İşlemi Esnasında Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Canlılıkları Üzerine Kriyojenik Koruyucu Maddelerin Etkileri. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Konya, 2008.
90. Sadikoglu H, Ozdemir M, Seker M. Freeze-Drying of Pharmaceutical Products: Research and Development Needs. *Drying Technology* 2006; 24(7):849-861.
91. Heckly RJ, Faunce K, Elberg SS. Lyophilization of *Brucella melitensis*. The Naval Biological Laboratory, School of Public Health, and the Department of Bacteriology. University of California, Berkeley, California 1959; 52-54.
92. Morichi T, Irie R, Yano N, Kembo H. Protective Effect of Arginine and its Related Compounds on Bacterial Cells during Freeze-Drying. *Agricultural and Biological Chemistry* 1965; 29 (1):61-65.
93. Halkman AK, Tunail N, Akyol E. Liyofilize Yoğurt Kültürü Kombinasyonlarının Canlılık ve Aktiviteleri Üzerine Vakumlu ve Vakumsuz Koruma Koşullarının Etkisi. TÜBİTAK-TOAG-TARMIK 5 Proje, 1987; Ankara.
94. Barbour EA, Priest FG. The Preservation of Lactobacilli: A Comparison of Three Methods. *Letters in Applied Microbiology* 1986; 2.4:69-71.
95. De Antoni GL, Perez P, Abraham A, Anon MC. Trehalose, A Cryoprotectant for *Lactobacillus Bulgaricus*. *Cryobiology* 1989; 26 (2):149-153.
96. Succi M, Tremonte P, Reale A, Sorrentino E, Coppola R. Preservation By Freezing of Potentially Probiotic Strains of *Lactobacillus Rhamnosus*. *Annals of Microbiology* 2007; 57(4):537-544.
97. Hansen EB. *Starter Cultures: Uses in the Food Industry*. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier 2014.
98. Cevher E. Liyofilizasyon. <https://docplayer.biz.tr/61451045-Liyofilizasyon-prof-dr-erdal-cevher-istanbul-universitesi-eczacilik-fakultesi-farmasotik-teknoloji-anabilim-dali.html>, 2019.
99. Masuko T, Hariyama Y, Takahashi Y, Cao LM, Goto M, Ohshima M. Effect of Addition of Fermented Juice of Epiphytic Lactic Acid Bacteria Prepared from Timothy and Orchardgrass on Fermentation Quality of Silages. *Japanese Journal of Grassland Science* 2002; 48 (2):120-125.
100. Polan CE, Stieve DE, Garrett JL. Protein Preservation and Ruminant Degradation of Ensiled Forage Treated with Heat, Formic Acid, Ammonia, or Microbial Inoculant. *Journal of Dairy Science* 1998; 81:765-776.
101. AOAC. 1990. *Official Method of Analysis*. Association of Official Analytical Chemistry pp.66-88. 15th.edition. Washington, DC. USA.
102. Suzuki M, Lund CW. Improved Gas-Liquid Chromatography for Simultaneous Determination of Volatile Fatty Acids and Lactic Acid in Silage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1980; 28(5):1040-1041.
103. Ashbell G, Weinberg ZG, Azrieli A, Hen Y, Horev B. A Simple System to Study the Aerobic Determination of Silages. *Canadian Agricultural Engineering* 1991; (34):171-175.

104. Dubois M, Giles KA, Hamilton JK, Rebes PA, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical chemistry* 1956; 28: 350-356.
105. Playne MJ, McDonald P. The Buffering Constituents of Herbage and of Silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1966; 17(6):264-268.
106. AOAC International, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, 2005, USA.
107. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods of Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber and Non Starch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science* 1991; 74:3583-3597.
108. Turan A, Önenç SS. Effect of Cumin Essential Oil Usage on Fermentation Quality, Aerobic Stability and in Vitro Digestibility of Alfalfa Silage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 2018; 31(8):1252.
109. Çotuk G. Yonca Silajına Kepek ve Puding İlavesinin Silaj Fermantasyonu, Aerobik Stabilite ve İn Vitro Sindirilebilirlik Üzerine Etkileri. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, 2016.
110. Zheng M, Niu D, Zuo S, Mao P, Meng L, Xu C. The Effect of Cultivar, Wilting and Storage Period on Fermentation and the Clostridial Community of Alfalfa Silage. *Italian Journal of Animal Science* 2018; 17(2):336-346.
111. Qinhua L, Zhihao D, Tao S. Dynamics of Change in Fermentation and Fatty Acid Profiles in High Moisture Alfalfa Silage during Ensiling at Different Temperatures. *Ciência Rural*, 2018; 48.3.
112. Filya İ. Silaj Yapımı, Teknolojisi ve Kullanımı. Süttaş Bursa: Hayvancılık serisi: 2. 2006.
113. Küçükersan KM, Ergün A, Çolpan İ, Yıldız G. (Editör). Ankara: Yemler Yem Hijyeni ve Teknolojisi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2. Baskı; 2004. 69-102.
114. Ward RT, Ondarza MB. Fermentation analysis of silage: use and interpretation. Retrieved May 29 (2008): 2015.
115. Bai C, Zhang R, Jiang C, Yan R, Han J, Zhu Y, Zhang Y. Characterization of Carbohydrate Fractions and Fermentation Quality in Ensiled Alfalfa Treated with Different Additives. *African Journal of Biotechnology* 2011; 10 (48):9958-9968.
116. Okuyucu B, Koç F, Özdüven ML. P08-Farklı Dozlarda Laktik Asit Bakteri ve Enzim Karışımı İnokulant Kullanımının Yonca Silajlarında Fermantasyon, Aerobik Stabiliteleri ve Yem Değeri Üzerine Etkileri. 2. Uluslararası Hayvan Besleme Kongresi; 1-4 Kasım 2018; Antalya, Türkiye
117. Haigh PM. Effect of Herbage Water-Soluble Carbohydrate Content and Weather Conditions at Ensilage on the Fermentation of Grass Silages Made on Commercial Farms. *Grass and Forage Science* 1990; 45 (3):263-271.
118. Mohd-Setapar SH, Abd-Talib N, Aziz R. Review on Crucial Parameters of Silage Quality. *APCBEE Procedia* 2012; 3:99-103.
119. Bureenok S, Namihira T, Kawamoto Y, Nakada T. Additive Effects of Fermented Juice of Epiphytic Lactic Acid Bacteria on the Fermentative Quality of Guinea Grass (*Panicum Maximum* Jacq.) Silage. *Japanese Society of Grassland Science* 2005; 51:243-248.

120. Baumann DP, Reinbold GW. Freezing of Lactic Cultures. *Journal of Dairy Science* 1966; 49.3:259-264.
121. Chang WTH. The Relationship of Freezing and Thawing Temperature to the Survival of Direct set Starter Culture. *Developments in Industrial Microbiology* 21. 1980.
122. Litvan GG. Mechanism of Cryoinjury in Biological Systems. *Cryobiology* 1972; 9 (3):182-191.
123. Ray B, Speck ML. Freeze-Injury in Bacteria, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 1973; 4:161
124. Greaves RIN. Fundamental Aspects of Freeze-Drying Bacteria and Living Cells. *Aspects Theoriques et Industriels De La Lyophilisation*, Rey L (Ed), Paris, Herman 1964; 410-412.
125. Güven MN. Starter Kültür (Saf Kültür) Üretim İşletmesi Dizaynı ve Fizibilite Raporu. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 82s, İzmir, 2008.
126. Serigo A, Rambhatla S, Pikal MJ. Heat and Mass Transfer Scale-Up Issues During Freeze Drying, I: Atypical Radiation and the Edge Vial Effect. *American Association of Pharmaceutical Scientists* 2003; 4(2):114-127.
127. Sparkes JD, Fenje P. The Effect of Residual Moisture in Lyophilized Smallpox Vaccine on Its Stability at Different Temperatures. *Bulletin of the World Health Organization* 1972; 46 (6):729-734.
128. Avcıoğlu Y. Attenüe Brucella Melitensis (Rev-1) aşısının farklı stabilizatörlerle liyofilizasyonu. Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Kilis, 2013.
129. Halkman A, Doğan HB. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını Ankara: Sim Matbaası; 2000. s. 522
130. Ferry RM. The Freeze-Drying of Bacteria and Viruses. *Methods in Molecular Biology* 1995; 38.2.
131. De Giulio B, Orlando P, Barba G, Coppola R, De Rosa M, Sada A, Nazzaro F. Use of Alginate and Cryo-Protective Sugars to Improve the Viability of Lactic Acid Bacteria After Freezing and Freeze-Drying. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2005; 21 (5):739-746.
132. Koc F, Aksoy SO, Okur AA, Celikyurt G, Korucu D, Ozduven ML. Effect of Pre-Fermented Juice, *Lactobacillus Plantarum* and *Lactobacillus Buchneri* on the Fermentation Characteristics and Aerobic Stability of High Dry Matter Alfalfa Bale Silage. *The Journal of Animal Plant Sciences* 2017; 27 (5):1426-1431.
133. Kung JrL. Silage Fermentation End Products and Microbial Populations: Their Relationships to Silage Quality and Animal Productivity. *Proc. Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners*; 2008 Sept 25-27; Charlotte, NC.
134. Kung JrL. Silage Fermentation Additives. 2000-2001 Direct-fed Microbial, Enzyme Forage Additive Compendium, Miller Publishing Co. Minnetonka, MN. 2000.
135. Kung L, Shaver R. Interpretation and Use of Silage Fermentation Analysis Reports. *Focus on Forage* 2001; 3 (13):1-5.
136. Keleş, G. Homofermantatif ve Heterofermantatif Laktik Asit Bakterilerinin Mısır Silajının Kimyasal Kompozisyonu ile Konya Merinosu Toklularda

- Performansa Etkileri. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Konya, 2009.
137. Blandino A, Al-Aseer ME, Pandiella SS, Cantero D, Webb C. Cereal-Based Fermented Foods and Beverages. *Food Research International* 2003; 36:527-543.
 138. Frazler WC, Westhoff DC. *Food Microbiology*. 4 th Edition. McGraw-Hill International Editions 1988; p. 539.
 139. Taylor CC, Ranjit NJ, Mills JA, Neylon JM, Kung JrL. The Effect of Treating Whole-Plant Barley with *Lactobacillus Buchneri* 40788 on Silage Fermentation, Aerobic Stability, and Nutritive Value for Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 2002; 85(7):1793-1800.
 140. Danner H, Holzer M, Mayrhuber E, Braun R. Acetic Acid Increases Stability of Silage Under Aerobic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; 69:562-567
 141. Spoelstra SF, Hindle VA. Influence of Wilting on Chemical and Microbiological Parameters of Grass Relevant to Ensiling. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 1989; 37:355-364.
 142. Aydın SS. Farklı Sukroz Seviyeleri Ve İnkubasyon Sürelerinde Hazırlanan Fermente Edilmiş Doğal Laktik Asit Sıvısının, Laktik Asit Bakterileri İle Yonca Silajı Kalitesine Etkisi. Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 2014
 143. Kung JrL, Ranjit NK. The Effect of *Lactobacillus Buchneri* and Other Additives on the Fermentation and Aerobic Stability of Barley Silage. *Journal of Dairy Science*. 2001; 84:1149–1155.
 144. Nsereko VL, Smiley BK, Rutherford WM, Spiel-bauer A, Forrester KJ, Hettlinger GH, Harman BR. Influence of Inoculating Forage with Lactic Acid Bacterial Strains That Produce Ferulate Esterase on Ensilage and Ruminant Degradation of Fiber. *Animal Feed Science and Technology* 2008; 145(1-4): 122-135.
 145. Carpintero CM, Henderson AR, McDonald P. The Effect of Some Pre-Treatments on Proteolysis During the Ensiling of Herbage. *Grass and Forage Science* 1979; 34 (4):311-315
 146. Weinberg ZG, Ashbell G, Azrieli A. The Effect of Applying Lactic Bacteria in Ensiling on the Chemical and Microbiological Composition of Vetch, Wheat and Alfalfa Silages. *Journal of Applied Bacteriology* 1988; 64, 1-8.
 147. Muck RE, Shinnors KJ. Conserved Forage (Silage and Hay): Progress and Priorities. In *International Grassland Congress*; 2001; Vol (19), pp. 753-762. São Pedro: SBZ.
 148. Kung L. Aerobic stability of silage. *Proc. California Alfalfa and Forage Symposium and Crop/cereal Conference*. Visalia, CA, USA. 2010. (2).
 149. Çayıroğlu H, Coşkun İ, Şahin A. Silajın Aerobik Stabilitelerini Etkileyen Faktörler ve İyileştirme Stratejileri. *Alınları Zirai Bilimler Dergisi* 2016; 31(2): 91-97.
 150. Beck T. The Microbiology of Silage Fermentation. in *Literature Review on Fermentation of Silage - A Review*. Grants-in-Aid Committee. National Feed Ingredients Association. One Corporate Place, Suite 360 West Des Moines, Iowa 1978; 50265, 61:115.


8. EKLER

EK.1. Etik Kurul Kararı

 <p style="text-align: center;">T.C. HARRAN ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI (HRÜ-HADYEK)</p>			
Oturum No	Karar	Tarih / Saati	Yeri
2017/006	01-10	23.10.2017/ 15:00	HADYEK Toplantı Salonu

KARAR 2017/006/09: 19/10/2017 tarih ve 22802 sayılı Etik Kurul başvuru dosyası incelendi. İnceleme sonucunda; Yürütücülüğünü Prof. Dr. Nihat DENEK'ın yapacağı “*Liyofilize edilmiş ve Dondurulmuş Doğal Laktik Asit Bakteri sıvılarının, Laktik Asit Bakteri Sayısı ve Yonca Silajı Kalitesi Üzerine Etkisi*” isimli çalışma için Etik Kurul iznine gerek olmadığına;

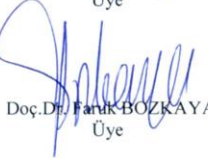
Oy birliğiyle karar verilmiştir.


Prof.Dr. Mustafa DENİZ
Üye


Prof.Dr. Mehmet AVCI
Başkan


Yrd.Doç.Dr. İsmail KOYUNCU
Üye


Doç.Dr. Sabri YURTSEVEN
Üye


Doç.Dr. Faruk BOZKAYA
Üye


Yrd.Doç.Dr. Evren BÜYÜK FIRAT
Üye


Yrd.Doç.Dr. Arif PARMAKSIZ
Üye


Yrd.Doç.Dr. Mustafa Enal
BOYRAZ
Üye


Arş.Gör.Egemen E. ÖZTÜRK
Üye


Ahmet Mevlüt BALIKÇI
Üye


Şahin APAYDIN
Üye


Doç.Dr. Füsün TEMAMOĞULLARI
Raportör

EK.2. Orjinallik Raporu



TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU VE BEYAN BELGESİ

Öğrencinin	
Numarası	: 155329003
Adı, Soyadı	: Sadık Serkan AYDIN
Anabilim Dalı (Bölümü)	: Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı
Programı	: <input type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input checked="" type="checkbox"/> Doktora
Tezin Adı:	“Liyofilize edilmiş ve Dondurulmuş Doğal Laktik Asit Bakteri Sıvılarının, Laktik Asit Bakteri Sayısı ve Yonca Silajı Kalitesi Üzerine Etkisi”

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yukarıda başlığı belirtilen **Doktora** çalışmamın; *kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç* kısımlarından oluşan toplam 53 sayfalık kısmına ilişkin, 14/05/2019 tarihinde şahsım/ danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, benzerlik oranı **%15'dir**.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kabul/Onay ve Bildirim sayfaları hariç,
- 2- Kaynakça hariç
- 3- Alıntılar hariç
- 4- 5 kelmeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Yukarıda bilgileri verilen tezin, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından kabul edilen lisansüstü orijinallik raporu alınması uygulama esasları ile belirlenen azami benzerlik oranlarını aşmadığımı ve bütün bilgilerin, akademik kurallara uygun olarak toplanıp sunulduğunu, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçları andığımı, blok şeklinde alıntılar yapmadığımı ve tüm alıntıların bilimsel atıf kuralları çerçevesinde kaynağını gösterdiğimi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ile Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesinin 8. maddesinde yer alan etik ihlallerden her hangi birisinin yer almadığını, etik ihlal tespiti halinde, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca, diplomamın iptal edilmesini kabul ediyorum.

Gereğini saygılarımla arz ederim. 14/05/2019

Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Adı-Soyadı: Sadık Serkan AYDIN

İmzası:

Yukarıda yer alan raporun ve beyanın doğruluğunu onaylarım. 14/05/2019

Danışmanın

Unvanı-Adı-Soyadı: Prof. Dr. Nihat DENEK

İmzası:

EK.3. İntihal Raporu

LİYOFİLİZE EDİLMİŞ VE DONDURULMUŞ DOĞAL LAKTİK ASİT BAKTERİ SIVILARININ, LAKTİK ASİT BAKTERİ SAYISI VE YONCA SİLAJI KALİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 15 BENZERLİK ENDEKSİ	% 13 İNTERNET KAYNAKLARI	% 5 YAYINLAR	% ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
----------------------------------	---------------------------------------	------------------------	-----------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	% 3
2	dosya.bdutae.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
3	web.harran.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	DEMİRGÜL, Furkan and SAĞDIÇ, Osman. "Laktik Starter Kültür Üretim Teknolojisi", Yıldız Teknik Üniversitesi, 2017. Yayın	% 1
5	fbetebankasi.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
7	dspace.trakya.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

EK.4. Tez Veri Giriş Formu

21.06.2019

Ulusal Tez Merkezi | Tez Form Yazdır

T.C.
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10216099
Yazar Adı / Soyadı	SADIK SERKAN AYDIN
T.C.Kimlik No	11851435378
Telefon	5056573030
E-Posta	serk_vet@msn.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	Liyofilize Edilmiş ve Dondurulmuş Doğal Laktik Asit Bakteri Sıvılarının, Laktik Asit Bakteri Sayısı ve Yonca Silajı Kalitesi Üzerine Etkisi.
Tezin Tercümesi	The Effect of Lyophilized and Frozen Natural Lactic Acid Bacteria Juice on the Count of Lactic Acid Bacteria and Quality of Alfalfa Silage
Konu	Veteriner Hekimliği = Veterinary Medicine
Üniversite	Harran Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı
Bilim Dalı	
Tez Türü	Doktora
Yılı	2019
Sayfa	102
Tez Danışmanları	PROF. DR. NİHAT DENEK
Dizin Terimleri	Hayvan besleme=Animal feeding
Önerilen Dizin Terimleri	

21.06.2019
İmza:.....